

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Detekce a identifikace bakterií patogenních pro rajče s použitím několika  
molekulárně biologických technik**

Ing. Pavel Beran

2012

**Konzultant: Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.**

**Školitel: doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.**

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 24.5.2012

## **Dedikace**

Výsledky uvedené v této disertační práci vznikly za finanční podpory grantu NAZV QH71229 a grantů GA JU: 029/2010/Z, 011/2011/Z, 012/2012/Z, 064/2010/Z.

## **Poděkování**

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli doc. Ing. Ivanu Mrázovi, CSc. za odborné vedení disertační práce a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu celého studia.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Ondřeji Lenzovi, Ph.D. za odborné konzultace a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za jeho častou trpělivou pomoc.

## Souhrn

Rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum*) je důležitá zemědělská plodina. S rozšiřováním rajčete však dochází i k rozšiřování patogenů, jejichž včasná detekce a identifikace hraje důležitou roli v jejich kontrole. Tato doktorská disertační práce je souhrnem originálních prací, které popisují výsledky dosažené na poli detekce a identifikace tří hlavních bakteriálních patogenů rajčete - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* - pomocí molekulárně biologických metod.

První publikovaná práce s názvem „A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*“ se zabývá problematikou detekce patovarů *Pseudomonas syringae*. V rámci této práce byl sestaven DNA čip, díky kterému je možné rozpoznat různé konfigurace ITS1 vyskytující se v rRNA operonu. Díky němu byla prokázána intragenomová variabilita ITS1, vyskytující se u několika patovarů *Pseudomonas syringae*. Výsledky získané pomocí mikročipu zpochybňují používání analýzy rRNA pro identifikaci bakteriálních kmenů a patovarů.

V rámci této disertační práce byly vyvinuty PCR primery pro detekci karanténní bakterie *Xanthomonas vesicatoria*. Pár primerů XV1F a XV1R byl navržen na základě DNA sekvence genu *atpD* tak, aby byl specifický pouze pro detekci *X. vesicatoria*. Specifičnost primerů byla testována na rozsáhlém souboru bakterií patogenních pro rajče (včetně xanthomonád). Dodržením popsaného protokolu lze rychle a spolehlivě identifikovat bakterii *X. vesicatoria*. Dle dostupných informací se jedná o první dvojici primerů, detekující specificky pouze bakteriální druh *X. vesicatoria*.

Nejvyšší počet publikovaných prací se zabýval různými aspekty detekce a identifikace bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Vzájemně bylo srovnáváno několik imunologických a molekulárně biologických metod detekce. Porovnávána byla také spolehlivost detekce *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* z různých rostlinných částí. Dále byl proveden plošný průzkum výskytu *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ve 22 lokalitách v České republice a v neposlední řadě byla prokázána schopnost tohoto patogena přežívat velmi dlouhou dobu na semenech rajčete.

Poznatky získané při řešení problematiky této doktorské disertační práce jsou využitelné v oblasti ochrany rostlin, rovněž pak i pro kontrolu rozšíření zkoumaných patogenů správnými úřady pro rostlinolékařskou péči.

## Summary

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) is an important agricultural crop. Most of the tomato pathogens are however disseminated with it. Therefore early detection and identification of the pathogens is vital for their control. This doctoral thesis is a summary of original papers that describe the results obtained in the field of detection and identification of three major bacterial pathogens of tomato - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* - using methods of molecular biology.

The work published entitled “A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*” deals with the detection of *Pseudomonas syringae* pathovars. In this work the DNA microarray that identifies various configurations of ITS1 (within rRNA operon) was constructed. Using the microarray it was proven that intragenomic variability of ITS1 occurs in several pathovars of *Pseudomonas syringae*. The findings presented in the study challenge the using of rRNA analysis for pathovar and strain determination.

As part of this thesis PCR primers for detection of quarantine bacterium *Xanthomonas vesicatoria* were developed. The primer pair XV1F and XV1R was designed based on DNA sequence of *atpD* gene, in order to be specific for detection of *X. vesicatoria* only. Specificity of the primers was tested on a large set of bacteria pathogenic for tomato (including xanthomonads). Following the described protocol the *X. vesicatoria* can be rapidly and reliably identified. According to available information, this is the first primer pair which allows specific detection of *X. vesicatoria*

The highest number of published papers dealt with various aspects of detection and identification of bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Several immunological and molecular biological detection methods have been mutually compared. Reliability of detection of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* from various plant parts has also been compared. Another part of the work was screening of occurrence of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in 22 localities of the Czech Republic and ability of the pathogen to survive on tomato seeds for long period of time was demonstrated.

The findings acquired during the work on this doctoral thesis are useful in the field of plant protection, or for control of the examined pathogens by phytosanitary services.

## Prohlášení o impaktovaných a recenzovaných publikacích

Prohlašuji, že moje role na přípravě publikací a rukopisů publikací, jenz jsou uvedeny v kapitole „Přílohy“, byla následující:

1. LENZ O., BERAN P., FOUSEK J., MRÁZ I. (2010): A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Microbiological Methods* 82: 90-94.

*Očkování a pěstování bakteriálních kultur, izolace DNA, PCR se značenými primery, elektroforéza DNA, přečišťování produktů PCR, sekvenování DNA, spolupráce při navrhování DNA sond pro microarray, spolupráce při interpretaci výsledků, spolupráce při přípravě publikace.*

2. MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P., POUVOVÁ D. (2010): Spolehlivost diagnostických technik pro detekci karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* v rostlinách a semenech rajčete. *Úroda – vědecká příloha* 12/2010: 309-312.

*Separace jednotlivých rostlinných částí, příprava vzorků pro testování, izolace DNA, příprava PCR, spolupráce při interpretaci výsledků, spolupráce při přípravě publikace.*

3. BERAN P., MRÁZ I. (2011): Návrh a testování specifických primerů pro detekci karanténní bakterie *Xanthomonas vesicatoria*. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 205-208.

*Návrh primerů, otestování vzorků pomocí PCR, elektroforéza DNA, vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace.*

4. KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I., POUVOVÁ D., BERAN P. (2011): Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete v ČR a spolehlivost detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z rajčat různými diagnostickými technikami. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 221-224.

*Separace jednotlivých rostlinných částí, příprava vzorků pro testování, spolupráce při izolaci DNA ze vzorků, spolupráce při interpretaci výsledků.*

5. MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P. (2011): Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers. *Acta Horticulturae* 914: 57-60.

*Separace jednotlivých rostlinných částí, příprava vzorků pro testování, spolupráce při izolaci DNA ze vzorků, spolupráce při interpretaci výsledků.*

6. BERAN P., MRÁZ I.: Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. Odesláno k opublikování do časopisu *Crop Protection*.

*Návrh primerů, otestování vzorků pomocí PCR, elektroforéza DNA, vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace.*

7. MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B., POUVOVÁ D.: Comparison of reliability of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* detection from various tomato plant parts using the several immunochemical and molecular techniques. Odesláno k opublikování do časopisu *African Journal of Biotechnology*.

*Separace jednotlivých rostlinných částí, příprava vzorků pro testování, spolupráce při izolaci DNA ze vzorků, spolupráce při interpretaci výsledků.*

8. MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B.: Detection of quarantine bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in old tomato plants and seeds by the selected molecular techniques. Odesláno k opublikování do časopisu *Crop Protection*.

*Separace jednotlivých rostlinných částí, příprava vzorků pro testování, spolupráce při izolaci DNA ze vzorků, spolupráce při interpretaci výsledků.*

Za spoluautory pravdivost prohlášení potvrzují:

.....

doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.

.....

Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.

V Českých Budějovicích dne 24. 5. 2012

.....

Ing. Pavel Beran

## Ostatní činnost

### Příspěvky na konferencích ve sborníku:

1. BERAN P., FOUSEK J., MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B.: Determination of genetic variability among *Pseudomonas syringae* pathovars by rep - PCR and PFGE. Proceedings of the XVIIIth Czech and Slovak Plant Protection Conference, Brno, September 2 - 4, 2009: 44.
2. BERAN P., MRÁZ I., LENZ O., FOUSEK J.: Screening of variability in 16S-23S rRNA spacer among pathovars of *Pseudomonas syringae* using microarray technique. Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Saint-Denis, Ile de la Réunion, France, June 7-11, 2010: 39.
3. BERAN P., MRÁZ I., LENZ O., KOKOŠKOVÁ B.: Detection of important pathogenic bacteria on tomato and pepper using microarray technique. Proceedings of the 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Saint-Denis, Ile de la Réunion, France, June 7-11, 2010: 55.
4. FOUSEK J., BERAN P., MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B: Coronatin, syringomycin and tabtoxin gene distribution in bacterial population and pathovars of *Pseudomonas syringae*. Proceedings of the XVIIIth Czech and Slovak Plant Protection Conference, Brno, September 2 - 4, 2009: 47.
5. KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I., POUVOVÁ D., BERAN P.: The survey of bacterial canker of tomato in Czech Republic and detection reliability of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants using various diagnostic techniques. Eucarpia Tomato 2011. Abstracts of the XVII Eucarpia Meeting, Section Vegetables, Working Group Tomato. Málaga, Spain, 11-14 April, 2011: 29.
6. MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P.: Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers. Abstract book. 3rd International Symposium on Tomato Diseases. July 25th - 30th, Ischia, Naples - Italy 2010: 110.

### Řešené granty:

1. Hlavní řešitel grantu GA JU (2010) na téma: „Detekce významných bakteriálních patogenů rajčete a papriky pomocí oligonukleotidového microarray“. (rozpočet 127 000,- Kč)
2. Hlavní řešitel grantu GA JU (2011) na téma: „Plošné testování bakterií patogenních pro rostliny rajčete a papriky pomocí oligonukleotidových mikročipů“. (rozpočet 173 000,- Kč)



3. Hlavní řešitel grantu GA JU (2012) na téma: „Genotypizace bakterií rodu *Xanthomonas* patogenních pro rajče a papriku metodou MLST“. (rozpočet 168 000,- Kč)
4. Spoluřešitel grantu GA JU (2010 - 2012) na téma: „Vývoj metod pro molekulární detekci patogenních mikroorganismů a izolace proteinů s potenciální mikrobiální aktivitou“. (rozpočet 2 922 000,- Kč)
5. Spoluřešitel grantu NAZV QH71229: „Diagnostika a metody integrované ochrany proti karanténním a dalším ekonomicky významným patogenům plodové a listové zeleniny“.
6. Spoluřešitel doktorského grantu GA ČR 521/08/H042: "Molekulární biologie, ekologie a taxonomie".

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Hypotézy a cíle práce</b> .....	<b>13</b>
<b>3. Literární přehled</b> .....	<b>14</b>
3.1. Bakterie rodu <i>Xanthomonas</i> patogenní pro rajče a papriku .....	14
3.1.1. Hostitelský okruh .....	14
3.1.2. Rozšíření.....	14
3.1.3. Morfologie.....	15
3.1.4. Symptomy .....	15
3.1.5. Biologie .....	15
3.1.6. Ekonomický dopad.....	16
3.1.7. Klasifikace.....	16
3.1.8. Molekulárně biologická charakteristika .....	17
3.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	18
3.2.1. Hostitelský okruh .....	18
3.2.2. Rozšíření.....	18
3.2.3. Morfologie.....	18
3.2.4. Symptomy .....	19
3.2.5. Biologie .....	19
3.2.6. Ekonomický dopad.....	20
3.2.7. Molekulárně biologická charakteristika .....	20
3.3. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	20
3.3.1. Hostitelský okruh .....	20
3.3.2. Rozšíření.....	21
3.3.3. Morfologie.....	21
3.3.4. Symptomy .....	21
3.3.5. Biologie .....	21
3.3.6. Ekonomický dopad.....	22
3.3.7. Molekulárně biologická charakteristika .....	22
3.4. Metody používané pro detekci a identifikaci bakterií.....	22
3.4.1. Mikroskopické metody.....	22
3.4.2. Kultivační metody .....	23
3.4.3. Gramovo barvení.....	23

3.4.4. Biolog .....	23
3.4.5. Sklíčková aglutinace .....	24
3.4.6. Dvojitá difuze v agaru .....	24
3.4.7. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	24
3.4.8. IFA (Immunofluorescence Assay) .....	24
3.4.9. PCR .....	25
3.4.10. Dot-blot hybridizace .....	25
3.4.11. Sekvenování .....	26
3.4.12. DNA čipy .....	26
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>28</b>
4.1. Variabilita ITS1 u <i>Pseudomonas syringae</i> .....	28
4.2. Primery pro detekci <i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	28
4.3. Spolehlivost detekce <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	29
4.4. Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete v ČR .....	30
4.5. Detekce <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ze starých semen rajčete ...	30
<b>5. Závěr .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Seznam použité literatury .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Obrázky .....</b>	<b>38</b>
<b>8. Přílohy .....</b>	<b>40</b>

# 1. Úvod

Rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum* Mill., resp. *Solanum lycopersicum* L.) je (z botanického hlediska) ovoce pocházející z Jižní Ameriky. Se španělskou kolonizací se však rajče rozšířilo po celém světě a běžně se dnes pěstuje i ve sklenících v zemích mírného klimatu.

Spolu s rozšiřováním porostů rajčat však také nezadržitelně dochází k rozšiřování jejich patogenů. Kromě četných onemocnění houbového a virového původu, jsou rajčata napadána několika bakteriálními patogeny. Mezi ně patří: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* corrig. (Smith 1910) Davis et al. 1984 (způsobující bakteriální vadnutí rajčete), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young, Dye & Wilkie 1978 (bakteriální tečkovitost rajčete), *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996 (bakteriální hnědá hniloba), *Pseudomonas corrugata* Roberts and Scarlett 1981 emend. Sutra et al. 1997 (stonková nekróza dřene), *Pectobacterium carotovorum* (Jones 1901) Waldee 1945 (Approved Lists 1980) emend. Gardan et al. 2003 (měkká hniloba) a několik druhů rodu *Xanthomonas* Dowson 1939 (Approved Lists 1980) emend. Vauterin et al. 1995 (bakteriální skvrnitost rajčete).

Ochrana porostů napadených bakteriální chorobou je velmi komplikovaná a často má nízkou účinnost a proto je základním předpokladem pro pěstování rajčat zdravé osivo. Pro kontrolu zmíněných patogenů je velmi důležitá správná a včasná detekce a identifikace. Tradiční detekční metody jako kultivace na agaru nebo test patogenity mnohdy bývají časově náročné a pracné. Je proto často výhodné používat molekulárně biologické metody (např. PCR, dot blot hybridizace, sekvenování, microarray aj.).

Cílem této doktorské disertační práce byl vývoj a optimalizace molekulárně biologických metod pro detekci nejvýznamnějších bakteriálních patogenů rajčete – tedy *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a bakterií rodu *Xanthomonas* které způsobují v rámci celosvětové produkce značné ztráty.

## 2. Hypotézy a cíle práce

Na základě dostupných dat byly navrženy následující hypotézy:

- DNA sekvence ITS1 vyskytující se v operonu pro tvorbu rRNA se může lišit v rámci jednotlivých patovarů *Pseudomonas syringae*.
- V rámci jediného genomu *Pseudomonas syringae* se mohou DNA sekvence ITS1 lišit a způsobovat tak nepřesnosti při detekci patogena.
- Genomy jednotlivých zkoumaných bakteriálních patogenů obsahují unikátní sekvence DNA, díky nimž je možné tyto patogeny spolehlivě detekovat s použitím metod molekulární biologie.
- Různé detekční postupy vykazují různou citlivost při detekci bakteriálních patogenů.
- Bakteriální patogeny jsou v rostlinách rajčete nerovnoměrně rozmístěny, což může ovlivnit výsledky jejich detekce.
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* může v semenech rajčete přežívat po velmi dlouhou dobu.

Cíle práce:

- Navržení mikročipů pro identifikaci různých variant ITS1 a otestování dostupných patovarů *Pseudomonas syringae*.
- Ověření výsledků mikročipů pomocí sekvenování.
- Navržení a otestování primerů pro specifickou detekci *Xanthomonas vesicatoria*, díky nimž bude možné tuto bakterii odlišit od ostatních xanthomonád patogenních pro rajče.
- Detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z různých částí rostliny pomocí několika molekulárně biologických a sérologických metod.
- Ověření detekovatelnosti *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ze semen rajčete po různě dlouhých dobách od inokulace patogena.
- Vytvoření bakteriální sbírky z ověřených kmenů *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a *Pseudomonas syringae*, zaočkování bakteriálních kultur do mikrobanek s jejich následným udržováním při teplotě -70°C.

## 3. Literární přehled

### 3.1. Bakterie rodu *Xanthomonas* patogenní pro rajče a papriku

#### 3.1.1. Hostitelský okruh

Hlavními hostiteli jsou rajče (*Lycopersicon* spp.) a paprika (*Capsicum* spp.). Bakteriální skvrnitost způsobená xanthomonádami však byla pozorována i na durmanu obecném (*Datura stramonium*), blínu (*Hyoscyamus* spp.), kustovnici (*Lycium* spp.), tabáku selském (*Nicotiana rustica*), lilíku mochyňovitém (*Nicandra physalodes*), mochyňi maličké (*Physalis minima*) a rostlinách rodu *Solanum* (Hayward a Waterston, 1964; Leyns et al., 1984).

#### 3.1.2. Rozšíření

Bakterie patogenní pro rajče se vyskytují všude, kde se tato plodina pěstuje, především pak v subtropickém a mírném podnebném pásu (Mitrev a Kovačević, 2006). V studenějších částech Evropy se však nevyskytují na rajčatech pěstovaných ve skleníku (Gitaitis et al., 1992). Podle Evropské a středomořské organizace pro ochranu rostlin (EPPO) se xanthomonády patogenní pro rajče vyskytují v následujících oblastech:

Evropa: Častý výskyt v Řecku, Maďarsku, Itálii (včetně Sardinie a Sicílie), Rumunsku, Rusku (evropská část), Jugoslávii. Výskyt zaznamenán v Rakousku, Bělorusku, Bulharsku, České republice, Polsku, Slovensku, Slovinsku, Španělsku, Švýcarsku (nepotvrzeno) a Turecku (evropská část).

Asie: Čína, Indie, Izrael, Japonsko, Severní Korea, Jižní Korea, Pákistán, Filipíny, Rusko, Tchaj-wan, Thajsko a Turecko.

Afrika: Egypt, Etiopie, Keňa, Malawi, Maroko, Mozambik, Niger, Nigérie, Réunion, Senegal, Seychely, JAR, Súdán, Togo, Tunisko, Zambie a Zimbabwe.

Severní Amerika: Bermudy, Kanada, Mexiko, USA (Arizona, Kalifornie, Florida, Georgia, Havaj, Iowa, Michigan, Severní Karolína, Ohio, Oklahoma).

Střední a jižní Amerika: Barbados, Kostarika, Kuba, Dominika, Dominikánská republika, Salvador, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Jamajka, Martinik, Nikaragua, Portoriko, Svatý Kryštof a Nevis, Svatý Vincenc a Grenadiny, Trinidad a Tobago, Americké Panenské ostrovy, Argentina, Brazílie, Chile, Kolumbie, Paraguay, Surinam, Uruguay, Venezuela.

Austrálie a Oceánie: Nový Jižní Wales, Queensland, Tasmánie, Victoria, Západní Austrálie, Fidži, Mikronésie, Nový Zéland, Palau a Tonga (OEPP/EPPO, 1988).

### 3.1.3. Morfologie

Xanthomonády jsou aerobní, mobilní, gramnegativní, tyčinkovité  $\gamma$ -proteobakterie o velikosti asi 0,6 x 1 – 1,5  $\mu\text{m}$ . Neprodukují poly- $\beta$ -hydroxybutyrátové inkluze, nemají pochvy ani prostěky či klidová stádia. Mají jeden polární bičík a vyskytují se samostatně nebo v párech. Jsou obligátně aerobní. Na masopeptonovém agaru s glukosou jsou kolonie velké, hladké, vyklenuté, mukoidní-fluidní a žluté. Na King-B médiu jsou nefluorescentní. Jsou citlivé na trifenyl tetrazolium chlorid a jsou oxidativní (Sedláček, 2007; Kúdela et al., 2002).

### 3.1.4. Symptomy

Na povrchu plodů se objevují oválné nebo nepravidelné korkové skvrny nebo strupy o průměru 2 – 10 mm s vodnatými okraji (obr. 1). Na paprice se symptomy objevují zřídka, mohou se však vyskytnout při rané infekci (Goode a Sasser, 1980).

Na listech papriky a rajčete se objevují nepravidelné vodnaté léze, které jsou zpočátku zelené a postupně hnědnou a nekrotizují. Bakteriální skvrnitost způsobená xanthomonádami podobně jako bakteriální tečkovitost způsobená *Pseudomonas syringae* pv *tomato* může způsobovat trhliny ve stonku podobné rakovině. Ty ale nejsou přítomny vždy a nelze na jejich základě přítomnost xanthomonád diagnostikovat (Stall, 1995; Bonas et al., 1991).

### 3.1.5. Biologie

Xanthomonády přežívají především na semenech (až 10 let), ale také na posklizňových zbytcích (např. stonek) (Gardner a Kendrick, 1921). Do určité míry mohou přežít i v půdě, třeba v rhizosféře nehostitelských rostlin. Jako alternativní hostitelé mohou sloužit lilkovité plevele (Bashan et al., 1982).

Pro rajčata a papriky pěstované ve skleníku lze brát v úvahu pouze možnost přežívání na semenech. Ve skleníku se pak bakterie přenáší systémem závlah nebo při mechanické manipulaci s rostlinami (Goode a Sasser, 1980). Životoschopné xanthomonády byly nalezeny i v aerosolech nad poli s komerční produkcí, což ukazuje na možnost přenosu vzduchem (McInnes et al., 1988; Dempsey a Chandler, 1963). Do listů se bakterie dostávají skrz průduchy. Do plodů (které průduchy nemají) se bakterie dostávají malými poraněními např. oděrkami nebo vpichy po hmyzu. Nakaženy mohou být pouze mladé plody. Xanthomonády se mohou množit i epifytně na mladých rostlinách, aniž by způsobovaly příznaky. K rozšiřování patogena může napomáhat i prořezávání porostu. Doporučuje se proto

provádět prořezávání odpoledne, když jsou rostliny suché a dodržovat hygienu (Pohronezny et al., 1990). K rozvoji choroby přispívají srážky, vysoká vlhkost a teplota mezi 30 až 35°C (Diab et al., 1982).

### 3.1.6. Ekonomický dopad

Xanthomonády patogenní pro rajče a papriku jsou široce rozšířeny. Velké škody způsobují především na polích v oblastech teplého a tropického klimatu, zvláště pak při horní zálivce. Ztráty produkce jsou největší, když je porost napaden brzy. I když jsou léze na plodech většinou jen povrchové, použitelnost takových plodů se snižuje jak pro další zpracování, tak i pro přímý prodej (Azaizeh a Bashan, 1984). Význam patogenů se zvyšuje i v severnějších částech Evropy, kde jsou rajčata a papriky pěstovány ve sklenících. Díky omezené možnosti přežívání patogenů v půdě je však možné infekci ve sklenících předcházet přísnou kontrolou osiva. Především kvůli zamezení šíření ve sklenících jsou *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin et al. 1995 a *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al. 2006 karanténními organismy podle legislativy ČR i EU (Dougherty, 1979).

### 3.1.7. Klasifikace

Bakteriální skvrnitost rajčete a papriky je způsobována relativně různorodou skupinou bakterií rodu *Xanthomonas*. Nomenklatura a klasifikace xanthomonád infikujících rajče a papriku prošla v posledních letech výraznými změnami. V současné době jsou tyto xanthomonády řazeny do čtyřech skupin (A, B, C a D) v rámci rodu *Xanthomonas* (Jones et al., 2000). Xanthomonády skupin A, B a D se vyskytují na paprice i rajčeti. Skupina C se je patogenní pouze pro rajče. Tyto genotypově i fenotypově odlišné skupiny jsou i různě geograficky rozmístěny. Skupiny A a B se vyskytují celosvětově. Xanthomonády ze skupiny C se nacházejí především v USA, Mexiku, Brazílii, Koreji a ve státech na pobřeží Indického oceánu a xanthomonády ze skupiny D se nacházejí na území bývalé Jugoslávie, v Kanadě, Kostarice, USA, Brazílii a v oblastech u Indického oceánu (Hamza et al., 2010; Bouzar et al., 1999). Skupiny A, B a C byly dříve klasifikovány jako různé rasy *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Xanthomonády skupiny D byly po mnoho let nazvány *Pseudomonas gardneri*. De Ley (1978) však dokázal jejich příslušnost k rodu *Xanthomonas*. Všechny čtyři skupiny byly následně podle svých fyziologických a molekulárně biologických charakteristik klasifikovány jako samostatné druhy následovně: *Xanthomonas euvesicatoria* (skupina A),



*Xanthomonas vesicatoria* (skupina B), *Xanthomonas perforans* (skupina C) a *Xanthomonas gardneri* (skupina D).

Na základě analýzy 16S ribozomální RNA tvoří kmen 85-10 *X. euvesicatoria* (skupina A) a *X. perforans* (skupina C) monofyletickou skupinu, zatímco *X. vesicatoria* (skupina B) a *X. gardneri* (skupina D) vytvářejí klastř s kmenem 33913 *X. campestris* pv. *campestris*. V nedávné době byla fylogenetická příslušnost jednotlivých skupin zkoumána pomocí MLST (multi-locus sequence typing). Na základě dat z MLST k sobě byly přiřazeny *X. euvesicatoria* a *X. perforans* spolu s kmenem 306 *X. citri*. *X. gardneri* byla podle MLST nejvíce příbuzná s *X. campestris* pv. *campestris* zatímco *X. vesicatoria* tvoří samostatnou větev. Rozdílnost těchto čtyř skupin a jejich přizpůsobení se jednomu hostiteli dělá ze systému *Xanthomonas*-rajče/paprika výborný příklad pro studium koevoluce patogenů (Jones et al., 2004).

### 3.1.8. Molekulárně biologická charakteristika

Celogenomová sekvence kmenu 85-10 *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) přinesla velmi přesné molekulárně biologické charakteristiky. *Xcv* má jeden cirkulární chromozom o velikosti 5 178 466 bp a čtyři extrachromozomální elementy. Přítomnost plazmidů pXCV2 (1 852 bp), pXCV38 (38 116 bp) a pXCV183 (182 572 bp) byla známa již dříve (nepublikovaná data). Projekt sekvenování *Xcv* odhalil existenci čtvrtého plazmidu nazvaného pXCV19 (19 146 bp).

Obsah C a G bazí u *Xcv* je průměrně 64,75 % u chromozomální DNA a od 56,59 % do 60,73 % u plazmidů. Počátek replikace je dobře zjištělný. Je zde lokalizován gen *dnaA* a jeho start kodon je charakterizován jako nulový bod chromozomu. Replikační mechanismus je oboustranný, ale chromozom není rozdělen na dva rovnocenné replichory. *Xcv* obsahuje celkem 4 726 potenciálních kódujících sekvencí (CDS). Biologická role byla pomocí manuální anotace přidělena 3 080 CDS. Ze zbylých 1 646 CDS je 697 hypotetických CDS a 949 CDS s neznámou funkcí.

*Xcv* obsahuje dva rRNA operony v pořadí 16S-23S-5S lokalizované v regionu přibližně 500 kb (mezi 4 600 000 a 5 100 000) levého replichoru. Bylo identifikováno celkem 56 tRNA pro všech 20 aminokyselin. Z toho 54 tRNA se nachází na chromozomu a zbylé dvě na plazmidech pXCV19 a pXCV183 (Thieme et al., 2005).

### 3.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

#### 3.2.1. Hostitelský okruh

Hlavním hostitelem *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, na kterého má patogen zároveň největší ekonomický dopad, je rajče. V přírodních podmínkách byl však výskyt *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* zaznamenán i na dalších rostlinách rodu *Lycopersicum* a planých rostlinách rodu lilek (*Solanum*) jako *Solanum nigrum*, *S. triflorum* nebo *S. douglasii*. Mnoho lilkovitých rostlin je náchylných k umělé infekci. Výskyt *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* byl dále zaznamenán na fazolu, hrachu, kukuřici, pšenici, ječmenu, žitu, ovsu, slunečnici, okurce (Stamova a Sotirova, 1987).

#### 3.2.2. Rozšíření

*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* byl poprvé popsán v Severní Americe a pravděpodobně odtud pochází. Podle EPPO se *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* vyskytuje v následujících oblastech:

EPPO oblast: Rakousko, Bělorusko, Belgie, Bulharsko, Česká republika, Egypt, Finsko (nepotvrzené), Francie, Německo, Řecko, Maďarsko, Irsko, Izrael, Itálie (včetně Sardinie a Sicílie), Libanon, Litva, Maroko, Nizozemsko, Norsko (vymýcena), Polsko, Portugalsko (vymýcena), Rumunsko, Rusko (evropská část, Sibiř), Slovinsko, Španělsko, Švýcarsko, Tunisko, Turecko, Velká Británie, Ukrajina, Jugoslávie.

Asie: Arménie, Ázerbájdžán, Čína, Indie (Madhya Pradesh), Írán, Izrael, Japonsko, Libanon, Turecko.

Afrika: Egypt, Keňa, Madagaskar, Maroko, Jižní Afrika, Tunisko, Togo, Uganda, Zambie, Zimbabwe (OEPP/EPPO, 2005).

#### 3.2.3. Morfologie

*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* je aerobní, nepohyblivá, gram-pozitivní, nesporulující, zahnutá tyčinka (Sedláček et al., 2007; Bradbury, 1986). Na živných půdách vytváří *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* hladké, lesklé, kulaté, pomalu rostoucí, žluté kolonie s rovnými okraji (Kúdela et al., 2002).

#### 3.2.4. Symptomy

Z kontaminovaného osiva obvykle vyrůstají bezpříznaké sazenice. Ve skleníku se za teplého počasí jako první objevuje nejdříve bělavé, později hnědé vadnutí listů. Pokud vadnutí dosáhne fáze kdy je nevratné, rostlina odumírá. Symptomy se většinou projevují až po dosažení zralosti.

V polních podmínkách bývá prvním příznakem osychání krajů (především spodních) listů (obr. 2). Rostlina pomalu odumírá, přičemž často nejeví známky vadnutí. V pokročilých stádiích se objevují drobné bělavé puchýře na listové nervatuře a na řapíku. Na stonku a řapíku se mohou objevit hnědé pruhy. Ty mohou přecházet ve žlutavé až červenohnědé rakovinné dutinky.

Plody mohou zaostávat ve vývoji a opadávat, případně nerovnoměrně dozrávat. Na povrchu plodů je obvyklé mramorování, uvnitř pak zbledávání tkání. Zřídka se na povrchu mohou objevit charakteristické skvrny.

V pokročilých stádiích nemoci je při rozříznutí stonku nebo řapíku patrné krémové bílé, žluté, nebo červenohnědé zbarvení vodivých pletiv. V raných stádiích nákazy nejsou na vodivých pletivech patrné žádné změny. Bakteriální vadnutí rajčete může být zaměněno za vadnutí způsobené houbami rodu *Verticillium* nebo *Fusarium* (OEPP/EPPO, 2005; Kúdela et al., 2002).

#### 3.2.5. Biologie

Patogen se ve skleníku i na poli rozšiřuje především mechanicky a srážkovou nebo závlahovou vodou. Do rostliny bakterie vniká průduchy a jinými přirozenými otvory, stejně jako přes poranění a kořeny. Přenos je možný i semeny, ale jeho četnost bývá do 1 % (Grogan a Kendrick, 1953).

Mladé rostliny jsou k nákaze více náchylné, nicméně v přírodních podmínkách je nákaza možná po celý život rostliny (Rat et al., 1991). Mezi nákazou a projevem prvních příznaků často uběhne dlouhá doba (2 – 3 a více týdnů), kdy je bakterie v latentní fázi. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* je typický okluzogen (kolonizuje především cévy). Patogen také produkuje toxický glykopeptid, který je biologicky aktivní.

K rozvoji patogena přispívá především vysoká vzdušná vlhkost a teploty okolo 25°C (Kúdela et al., 2002).

### 3.2.6. Ekonomický dopad

Výnosové ztráty způsobené *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se pohybují mezi 10 – 30 %, v některých letech však byly zaznamenány ztráty až 70 %. Vysoké ztráty vznikají zejména ve sklenících (Rat et al., 1991).

### 3.2.7. Molekulárně biologická charakteristika

Přesná molekulárně biologická data byla získána na základě celogenomového sekvenování kmene *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Ten má jeden cirkulární chromozom o velikosti 3 297 837 bp s 72,66% obsahem C a G bazí. Počátek replikace není zjistitelný a tak je za nulovou pozici v chromozomu považován start kodon genu *dnaA*, jak je u bakteriálních genomů obvyklé.

Chromozom *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* obsahuje celkem 2 984 potenciálních kódujících sekvencí (CDS). Na základě manuální anotace byla 2 029 z nich (68 %) přiřazena biologická funkce. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* obsahuje dva rRNA operony v pořadí 16S-23S-5S lokalizované v regionu mezi 2 240 000 a 2 870 000 bp. Bylo identifikováno 45 genů pro tRNA pro všech 20 aminokyselin.

Genom *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* může obsahovat dva plazmidy. Plazmid pCM1 je 27 357 bp dlouhý a obsahuje virulenční faktor *celA*. Plazmid pCM2 je dlouhý 69 989 bp a obsahuje virulenční faktor *pat-1*. Žádný z plazmidů neobsahuje další geny, které by bakterii poskytovaly selekční výhodu. Rovněž nebyl pozorován žádný efekt na růst bakterie, pokud byly plazmidy odstraněny (Gartemann et al., 2008).

## 3.3. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

### 3.3.1. Hostitelský okruh

Druh *Pseudomonas syringae* se běžně dělí na tzv. patovary, což je dělení zástupců jednoho druhu nebo poddruhu na základě patogenity k určitému hostiteli nebo hostitelskému okruhu (Louws et al., 2001). V přirozeném prostředí patogen způsobuje bakteriální skvrnitost rajčete, ale může infikovat i papriku (*Capsicum annuum*), huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), durman obecný (*Datura stramonium*) a některé další lilkovité a brukvovité rostliny (Whalen et al., 1991).

### 3.3.2. Rozšíření

Díky přenosu patogena osivem se *P. syringae* pv. *tomato* vyskytuje všude, kde se rajče pěstuje, především pak v následujících oblastech:

Afrika: Egypt, Maroko, Jižní Afrika.

Asie: Indie (Tamil Nadu), Izrael, Japonsko, Jordánsko, Tchaj-wan, Turecko.

Austrálie a Oceánie: Austrálie, Nový Zéland.

Evropa: Rakousko, Bulharsko, Česká republika, Francie, Německo, Řecko, Maďarsko, Itálie, Polsko, Portugalsko, Rumunsko, Rusko, Slovenská republika, Španělsko, Švýcarsko, Velká Británie, bývalá Jugoslávie.

Severní Amerika: Kanada, USA.

Jižní Amerika: Brazílie, Chile, Venezuela (McCarter et al., 1983).

### 3.3.3. Morfologie

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou krátké rovné tyčinky o velikosti 0,5 – 1 x 1,5 – 5 µm. Jsou gramnegativní, nesporulující, aerobní, mají aerobně respirační metabolismus (Miličević et al., 2009). Pohybují se pomocí jednoho nebo více polárních bičků. Kolonie jsou většinou šedobílé, průhledné a na King B médiu tvoří fluorescentní pigment (Kůdela et al., 2002).

### 3.3.4. Symptomy

Počátečními příznaky jsou malé (1–2 mm v průměru), vodnaté, tmavě hnědé až černé skvrny, rozvíjející se na mladých listech (obr. 3). Později se skvrny na starších listech a plodech zvětší a splynou, čímž způsobí jejich seschnutí a odbarvení. Charakteristické je tzv. chlorotické halo (žlutý dvůrek), které se objevuje na okraji skvrn. Podobné příznaky mohou být způsobeny i *P. syringae* pv. *syringae*. Na plodech se objevují povrchové vyvýšené léze okrouhlého nebo nepravidelného tvaru (Kůdela et al., 2002).

### 3.3.5. Biologie

Bakterie *P. syringae* pv. *tomato* se přenáší semeny a je schopna po velmi dlouhou dobu přežívat na rostlinných zbytcích, případně v půdě. Patogen navíc může přežívat na povrchu rostlin jako epifyt, aniž by vyvolal symptomy napadení a přejít do infekční fáze až když

k tomu má vhodné povětrnostní podmínky (McCarter et al., 1983). Pro rozvoj choroby je optimální chladné a vlhké počasí s teplotami okolo 18 – 25°C.

Do rostliny patogen proniká přes průduchy, v místech odlomených trichomů, případně přes jiná poranění (Schneider a Grogan, 1977). Patogen vniká pouze do zelených plodů a počet skvrn na plodech je v korelaci s počtem skvrn na listech (Wilson et al., 2002).

### 3.3.6. Ekonomický dopad

Od 70. let 20. století se počet a škodlivost napadení zvyšuje, což je pravděpodobně zapříčiněno zavedením nových odrůd náchylných k chorobě. Pravděpodobně díky přenositelnosti patogena semeny se v současné době *P. syringae* pv. *tomato* vyskytuje všude, kde se pěstují rajčata. Škodlivost choroby spočívá především ve snížení fotosyntetické aktivity napadených rostlin a neprodejnosti plodů s viditelnými příznaky. Ztráty způsobené *P. syringae* pv. *tomato* mohou dosahovat až 20 % (Obradovic et al., 2004).

### 3.3.7. Molekulárně biologická charakteristika

První celogenomová sekvence DNA *P. syringae* pv. *tomato* byla publikována již v roce 2003 (Buell et al.). Ta byla získána z kmenu DC3000 a přinesla velmi přesná molekulárně biologická data. Genom *P. syringae* pv. *tomato* obsahuje jeden cirkulární chromozom o velikosti 6 397 126 bp a různý počet plazmidů, které lze zařadit do pěti velikostních skupin. V genomu DC3000 bylo identifikováno celkem 5 763 otevřených čtecích rámců (CDS), z nichž 3 510 jsou domnělé geny a zbytek kóduje proteiny s neznámou funkcí nebo hypotetické proteiny. Vysoké procento genů (48 %, 2 735 genů) je v DC3000 duplikováno. V genomu *P. syringae* pv. *tomato* bylo nalezeno pět rRNA operonů a 63 genů pro tRNA (Buell et al., 2003).

## 3.4. Metody používané pro detekci a identifikaci bakterií

### 3.4.1. Mikroskopické metody

Slouží k přibližnému určení rodu bakterie, sledováním morfologických znaků (tvar, velikost, seskupení buněk, pohyblivost, počet a umístění bičků, struktura buněčné stěny, přítomnost pouzder, endospor, inkluzí a podobně). Díky morfologické podobnosti však nelze

pomocí této metody rozpoznat druhy a nižší taxonomické jednotky bakterií (Kůdela et al., 2002).

#### 3.4.2. Kultivační metody

Sledují makroskopickou morfologii (velikost, tvar, pigmentaci a podobně) kolonií na pevném živném médiu, případně v tekutém médiu. Pro některé druhy bakterií (včetně *X. vesicatoria*) jsou propracované protokoly pro přípravu semiselektivních a selektivních médií, jejichž pomocí lze poměrně spolehlivě identifikovat příslušný bakteriální druh. Bez použití (semi)selektivních médií je však identifikace pomocí této metody jen velmi orientační (Opara a Odibo, 2009).

#### 3.4.3. Gramovo barvení

Naprosto základní metoda, jejíž pomocí lze od sebe odlišit bakterie podle struktury buněčné stěny. Po obarvení bakteriální kultury trifenylnmethanovým barvivem (krystalovou violetí) a moření roztokem jodidu draselného (Lugolovým roztokem) se bakteriální kultura buď obarví (u grampozitivních bakterií), nebo neobarví (u gramnegativních bakterií). Pro identifikaci bakterií rodu *Xanthomonas* však tato metoda nemá příliš význam. Xanthomonády jsou totiž, stejně jako většina významných fytopatogenních bakterií, gramnegativní. Gramovo barvení lze nahradit testem rozpustnosti buněčných stěn v 3% roztoku hydroxidu draselného (Moaledj, 1986).

#### 3.4.4. Biolog

Biochemická metoda založená na schopnosti bakterií využívat různé zdroje uhlíku. V jamkách mikrotitrační destičky (obvykle 96 jamek) jsou nanášena živná média obsahující různé zdroje uhlíku. Do těchto jamek je nanášena bakteriální kultura určená k identifikaci. Po kultivaci (24 hodin) je spektrofotometricky (na speciálním přístroji) vyhodnoceno zabarvení jednotlivých jamek na destičce. Výsledný profil je porovnán s databází profilů typických pro jednotlivé bakterie. Biolog je jedna z mála biochemických metod využitelných pro identifikaci fytopatogenních bakterií. Použitím této metody lze většinou spolehlivě detekovat bakteriální rod, někdy druh (Verniere et al., 1993).

#### 3.4.5. Sklíčková aglutinace

Základní a nejjednodušší sérologická metoda využívající reakce bakteriální kultury se specifickým antisérem na podložním sklíčku. Po 3 – 5 minutách je reakce vyhodnocena pomocí světelného mikroskopu. Je-li antisérum homologní k antigenům (bakteriální buňce), vytvoří se na podložním sklíčku shluky (aglutinace, vločkování) (Myers et al., 1974).

#### 3.4.6. Dvojitá difuze v agaru

Antisérum a antigeny jsou nanášeny do jamek vytvořených v agarózové živné půdě (nejčastěji v Petriho misce). Do jamky uprostřed misky se obvykle nanáší antisérum a do jamek po obvodu misky se pak nanášou antigeny v podobě bakterií určených k identifikaci. Antisérum a antigeny difundují v agaru proti sobě. Při střetu antiséra s homologním antigenem se vytvoří makroskopicky viditelný precipitát (tzv. precipitační linie) (Kůdela et al., 2002).

#### 3.4.7. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

U této standardní sérologické metody se k vizualizaci antigenu testované bakterie s homologním antisérem využívá enzym alkalická fosfatáza (dříve často křenová peroxidáza). Ten je chemicky vázán s imunoglobuliny separovanými z antiséra. Jamky mikrotitrační destičky se potáhnou bakteriální suspenzí (antigenem) určené k identifikaci. Následně se do jamek přidá antisérum konjugované s alkalickou fosfatázou. Po vymytí přebytečného antiséra se do jamek přidá substrát (roztok sodné soli *p*-nitrofenylfosfátu), který je enzymem hydrolyzován. Činností enzymu se uvolňují chromogeny měnící zbarvení reakční směsi. Intenzita zbarvení reakce se měří spektrofotometricky a je přímo úměrná koncentraci enzymu (tedy i antigenu) (Tsuchiya a d'Ursel, 2004).

#### 3.4.8. IFA (*Immunofluorescence Assay*)

U této metody antisérum konjugované s fluorescenčním barvivem (např. fluorescein isothiokyanát – FITC) reaguje s homologním antigenem - bakteriální buňkou. Přítomnost antiséra je zkoumána fluorescenčním mikroskopem přímo na povrchu bakteriálních buněk. Tímto způsobem je možné detekovat bakterie i v hostitelských pletivech a lze zkoumat jejich velikost, tvar, případně rozmístění (Nemeth a Vuurde, 2006).



### 3.4.9. PCR

Základní a nejčastěji používaná molekulárně biologická metoda umožňuje *in vitro* amplifikaci specifického fragmentu DNA bez znalosti sekvence celého fragmentu. Při klasické PCR je potřeba znát pouze sekvenci cca 20 nukleotidů na začátku a konci fragmentu, aby bylo možné použít specifické primery (Arnheim, 1992). Na ně nasedá termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza (nejčastěji Taq polymeráza) a z volných nukleotidtrifosfátů vytváří řetězec DNA komplementární k templátovému. PCR sestává ze série cyklů: denaturace (teplotní denaturace dsDNA), annealing (nasedání komplementárních primerů) a elongace (prodlužování cílové sekvence DNA polymerázou). Tyto tři kroky se opakují v cyklech, až do vytvoření dostatečného množství produktu (tj. amplifikovaného fragmentu DNA). V praxi těmto cyklům předchází úvodní denaturace a po dokončení jsou následovány závěrečnou elongací. Pokud úvodní denaturace nebo závěrečná elongace není specificky vyžadována (jako například při použití hot-start polymerázy, kdy je nutná úvodní denaturace), je možné tyto dva kroky vypustit. Vizualizace výsledku se nejčastěji provádí elektroforézou fragmentů v agarózovém gelu a obarvením interkalačním činidlem (např. ethidium bromid, SYBR Green, apod.) (Porcar a Juarez-Perez, 2003).

Při detekci specifické DNA (např. DNA specifické pro určitou bakterii) je pozitivním výsledkem fragment DNA o známé velikosti. Pokud jsou navržené primery specifické a celá reakce je dobře optimalizována, lze dosáhnout při detekci pomocí PCR velmi přesných výsledků (White, 1996). Ze xanthomonád patogenních pro rajče a papriku, byly doposud publikovány sekvence specifických primerů jen pro *Xanthomonas euvesicatoria* (skupina A) (Park et al., 2009; Obradovic et al., 2004b).

Existuje velké množství modifikací PCR. Složitost jednotlivých modifikací se různí od jednoduchých (např. speciální sekvence primerů, úprava teplot) až po složité (různé fluorescenční značení, *in situ* PCR aj.). PCR je také nezbytnou součástí několika dalších molekulárně biologických metod, nebo jejich variant.

### 3.4.10. Dot-blot hybridizace

Jedná se o molekulárně biologickou metodu, která pro detekci cílové DNA využívá radioaktivně nebo neradioaktivně značenou sondu. Sonda se spojí s komplementární sekvencí denaturované cílové DNA a vytvoří tak hybridní molekulu DNA. Tato hybridní molekula je následně vizualizována podle typu použitého značení sondy. Například výsledek dot-blot hybridizace (tečkové hybridizace) se sondou značenou digoxigeninem je makroskopicky

rozeznatelný a pro vizualizaci není potřeba žádný speciální přístroj. Dot-blot hybridizace je dobře využitelná pro detekci velkého množství vzorků a jsou vypracovány postupy pro detekci bakterií (Šmarda et al., 2008).

#### *3.4.11. Sekvenování*

Sangerova metoda sekvenování je založena na syntéze DNA na jednovláknovém templátu a náhodné inkorporaci dideoxynukleotidů. Ty jsou stejné jako deoxynukleotidy, ale postrádají hydroxylovou skupinu na 3' konci. Dideoxynukleotid, který je v malém množství přítomen v reakci, může být DNA polymerázou inkorporován do prodlužujícího se vlákna DNA. Díky absenci hydroxylové skupiny však nedochází k dalšímu prodlužování vlákna. Takto je vytvářen soubor fragmentů různých délek. Délka fragmentu odpovídá místu přerušení syntézy. Starší techniky vyžadují čtyři reakce pro každý templát (Sanger et al., 1977). Každá obsahuje jiný dideoxynukleotid (A,C,T,G). Reakce jsou následně analyzovány na gelu pro identifikaci délek jednotlivých fragmentů. V devadesátých letech 20. století byla metoda zdokonalena označením dideoxynukleotidů různými fluorescenčními barvivy (Prober et al., 1987). Metoda tak může probíhat v jedné reakci. První sekvenační přístroje používaly tuto techniku v kombinaci s přístroji pro automatické čtení fragmentů rozdělených na polyakrylamidovém gelu. Později byla gelová elektroforéza nahrazena kapilární. Tím se dosáhlo zjednodušení separace a zvýšení délky čtení (Madabhushi, 1998). Za posledních 10 let se průměrná délka čtení zvýšila z cca 450 bp na asi 850 bp.

#### *3.4.12. DNA čipy*

DNA čipy (microarray) je moderní technologie používaná především v molekulární biologii a medicíně. Metoda je založena na umístění mnoha mikroskopických kapek DNA oligonukleotidů na speciální povrch. Mohou to být krátké úseky genů, nebo jiné části DNA, která je použita jako tzv. sonda pro hybridizaci s cDNA nebo cRNA vzorkem. Existuje několik způsobů výroby DNA čipů. Dvěma hlavními způsoby jsou „oligonukleotidové čipy“ a „syntetizované čipy“ (např. firma Affimetrix).

U „oligonukleotidových čipů“ může být sondou oligonukleotid, cDNA nebo malý PCR produkt. Vytvořené sondy jsou pak ukotveny na sklo. To je většinou prováděno speciální jehlou ovládanou robotickou rukou. Sondy jsou nanášeny v požadovaném pořadí a tvoří

určitý profil. Tento způsob je finančně méně náročný a čip tak může být připraven pro každý experiment zvlášť za použití vlastního vybavení.

„Syntetizované čipy“ jsou vyráběny syntézou oligonukleotidových proub přímo na povrchu čipu. DNA čip tak může obsahovat až 2,1 milionu sond v závislosti na způsobu výroby. Tento způsob je však velmi nákladný. Vzorek DNA je fluorescenčně označen (např. Cy3, Cy5) a za předepsaných podmínek hybridizován na DNA čipu. Čip je analyzován na microarray scanneru, který laserovým paprskem určité vlnové délky detekuje excitovanou fluorescenci (Bammler et al., 2005). Detekci pomocí DNA čipů lze tedy v určitém smyslu považovat za technicky zdokonalenou dot-blot hybridizaci.

## 4. Výsledky

### 4.1. Variabilita ITS1 u *Pseudomonas syringae*

Vnitřní přepisovaný mezerník (ITS1) vyskytující se v rámci operonu pro tvorbu rRNA je často používán pro rozlišování a identifikaci různých druhů i poddruhů bakterií. V minulosti však byla v jediném bakteriálním genomu prokázána přítomnost několika různých kopií ITS1. Takový druh mozaicismu může ovlivnit správnost identifikace mnoha bakterií a je proto nezbytná znalost konfigurace regionu ITS1 u příslušných genomů. Za účelem testování variability ITS1 u genomů *P. syringae* byl vyvinut DNA mikročip (DNA microarray) se sondami rozpoznávajícími různé konfigurace ITS1. Na základě dat získaných pomocí mikročipu bylo rozeznáno sedm různých variant ve 13 testovaných patovarech a u *P. syringae* patovarů *coronafaciens*, *pisi*, *syringae* a *tabaci* byl odhalen mozaicismus. Výsledky získané pomocí mikročipu poukazují na možné nepřesnosti při používání analýzy rRNA pro identifikaci bakteriálních kmenů a patovarů.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

LENZ O., BERAN P., FOUSEK J., MRÁZ I. (2010): A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Microbiological Methods* 82: 90-94.

### 4.2. Primery pro detekci *Xanthomonas vesicatoria*

V rámci této disertační práce byly vyvinuty PCR primery pro detekci karanténní bakterie *X. vesicatoria*. Pár primerů XV1F a XV1R byl navržen na základě DNA sekvence genu *atpD* (získané ze sbírkového kmenu Xv CCM 2102) tak, aby byl specifický pouze pro detekci *X. vesicatoria*. Tyto námi navržené primery poskytovaly výsledný amplifikační produkt o velikosti 356 bp a rovněž vykazovaly vysokou specifičnost. Soubor bakterií testovaných na specifičnost primerů zahrnoval 36 (resp. 45) bakterií patogenních pro rajče a papriku (včetně rodu *Xanthomonas*). K pozitivní PCR reakci však docházelo pouze tehdy, byla-li použita templátová DNA vyizolovaná z *X. vesicatoria*. Dodržením popsaného protokolu lze rychle a spolehlivě identifikovat bakterii *X. vesicatoria*. Dle dostupných informací se jedná o první dvojici primerů, detekující specificky pouze bakteriální druh *X. vesicatoria*.

Informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

BERAN P., MRÁZ I. (2011): Návrh a testování specifických primerů pro detekci karanténní bakterie *Xanthomonas vesicatoria*. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 205-208.

Rozšířené a upravené informace byly 30.1.2012 odeslány do tisku v rukopisu:

BERAN P., MRÁZ I.: Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*.

Odesláno k opublikování do časopisu *Crop Protection*.

#### **4.3. Spolehlivost detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***

*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* byl izolován z různých částí (báze, stonků řapíků, listů) silně napadených rostlin deseti odrůd tyčkových rajčat metodami PCR (dva páry primerů), PTA-ELISA, DAS-ELISA a IIF. Nejcitlivější metodou detekce se ukázala být optimalizovaná PCR (oba páry primerů byly srovnatelné). Metodami PTA-ELISA i DAS-ELISA byl patogen detekován do ředění 1:10<sup>3</sup>, metodou IIF byl pak patogen detekován do ředění 1:10<sup>4</sup>. Spolehlivost detekce patogena v bázi, stonku a řapíku rostlin je v rámci jednotlivých metod srovnatelná. Schopnost detekce patogena v listech rostlin však byla výrazně nižší u všech testovaných metod. Metodami PTA-ELISA, DAS-ELISA a IIF byl patogen detekován jen ve 30 – 70 % případů a pomocí PCR byl patogen detekován pouze ve 20 % případů.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty ve 2 publikacích a jednom rukopisu odeslaném k opublikování:

MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P., POUVOVÁ D. (2010): Spolehlivost diagnostických technik pro detekci karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* v rostlinách a semenech rajčete. *Úroda – vědecká příloha* 12/2010: 309-312.

MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P. (2011): Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers. *Acta Horticulturae* 914: 57-60.

MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B., POUVOVÁ D.: Comparison of reliability of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* detection from various tomato plant parts using the several immunochemical and molecular techniques. Odesláno k opublikování do časopisu *African Journal of Biotechnology*.

#### 4.4. Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete v ČR

Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete prováděný v letech 2009 - 2010 v 22 lokalitách ČR prokázal výskyt choroby celkem v 6 lokalitách jižní a střední Moravy a středních Čech na tyčkových rajčatech pěstovaných jak ve sklenících, tak na polích. Celkem ze 113 vzorků rajčat s příznaky choroby se u 68 % vzorků rostlin prokázalo onemocnění. Pomocí IIF byl *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* spolehlivě detekován do ředění 1:1000, zatímco pomocí ELISA do ředění 1:100 (nepřímá ELISA a DAS-ELISA) a 1:10 (PTA-ELISA). Nepřímá ELISA pomocí monoklonálních protilátek byla citlivější než PTA-ELISA s polyklonálními protilátkami. Optimalizovaná PCR s komerčními i námi navrženými primery byla srovnatelná.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I., POUVOVÁ D., BERAN P. (2011): Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete v ČR a spolehlivost detekce *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* z rajčat různými diagnostickými technikami. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 221-224.

#### 4.5. Detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ze starých semen rajčete

Semena 4 tyčkových a 4 keříčkových odrůd rajčete byla uměle infikována referenčními kmeny *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (BCCM/LMG 7333 a BCCM/LMG 5727). Semena rajčat byla máčena 48 hodin v bakteriální suspenzi ( $10^8$  CFU/ml). Patogen byl pozitivně detekován 24 hodin, 7 dnů, 3, 20 a 26 měsíců po inokulaci za použití PCR se dvěma dvojicemi primerů. Výsledky byly potvrzeny pomocí dot-blot hybridizace a sekvenování. Bylo ověřeno, že *C. michigaensis* subsp. *michiganensis* může na semenech hostitelské rostliny přežít měsíce i roky. Následným vypěstováním rostlin z těchto semen a detekcí přítomnosti *C. michigaensis* subsp. *michiganensis* pomocí PCR s negativními výsledky bylo potvrzeno, že přenos patogena z povrchu semen do rostliny není příliš častý.

Částečné informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P. (2011): Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers. *Acta Horticulturae* 914: 57-60.

Kompletní informace byly 16.12.2011 odeslány do tisku v rukopisu:

MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B.: Detection of quarantine bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in old tomato plants and seeds by the selected molecular techniques. Odesláno k opublikování do časopisu *Crop Protection*

## 5. Závěr

Předkládaná disertační práce je souhrnem výsledků dosažených při výzkumné práci v laboratoři doc. Ing. Ivana Mráze, CSc. na oddělení rostlinné virologie, Ústavu molekulární biologie rostlin Biologického centra Akademie věd České republiky.

Stěžejní prací je publikace v *Journal of Microbiological Methods* (IF v době publikace = 2,427) s názvem „A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*“. Ta se zabývá vývojem a testováním DNA mikročipu (microarray) pro zjišťování variability oblasti ITS1 v genomu *Pseudomonas syringae* a odhaluje několik případů vnitrogenomového mozaicismu některých patovarů.

Významných výsledků bylo dosaženo i při vývoji a testování molekulárně biologických postupů pro detekci *Xanthomonas vesicatoria* a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Pro *X. vesicatoria* byly navrženy první známé detekční primery, díky kterým je možné tuto bakterii odlišit od ostatních blízce příbuzných xanthomonád patogenních pro rajče. V rámci rozsáhlých prací na *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* byla otestována spolehlivost a citlivost několika nejpoužívanějších detekčních metod (naší laboratoří byly prováděny veškeré práce související s molekulárně biologickým testováním).

Potenciálně velmi úspěšná může být i práce na vývoji DNA mikročipu pro detekci hlavních bakteriálních patogenů rajčete a papriky. V kapitole „Výsledky“ však není uváděna, protože rukopis pro publikaci nebyl v době psaní této disertační práce dokončen. Předběžné výsledky však byly uveřejněny na mezinárodní konferenci „International Conference on Plant Pathogenic Bacteria“ konané v Saint-Denis, Ile de la Réunion.

Poznatky získané při řešení problematiky disertační práce jsou využitelné v oblasti ochrany rostlin a v neposlední řadě i pro kontrolu rozšíření studovaných patogenů správnými úřady pro rostlinolékařskou péči.



## 6. Seznam použité literatury

- Arnheim, N.** (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem*, **61**, 131-156.
- Azaizeh, M. a Bashan, Y.** (1984) Chemical control of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in inoculated pepper fields in Israel. *Ann Appl Biol*, **104**, 60-61.
- Bammler, T., Beyer, R.P., Bhattacharya, S., Boorman, G.A., Boyles, A., Bradford, B.U., Bumgarner, R.E., Bushel, P.R., Chaturvedi, K., Choi, D. et al.** (2005) Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods*, **2**, 351–356.
- Bashan, Y., Diab, S. a Okon, Y.** (1982) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant Soil*, **68**, 161-170.
- Bonas, U., Schulte, S., Fenselau, G., Minsavage, B., Staskawicz a Stall, R.** (1991) Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact*, **4**, 81–88.
- Bouzar, H., Jones, J., Stall, R., Louws, F., Schneider, M., Rademaker, J., de Bruijn, F. a Jackson, L.** (1999) Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology*, **89**, 328-335.
- Bradbury, J.F.** (1986) Guide to plant pathogenic bacteria. *CAB International, Wallingford, UK*.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., DeBoy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., et al.** (2003) The complete sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *P Natl Acad Sci Usa*, **100**, 10181–10186.
- De Ley, J.** (1978) Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects. Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. *Angers*, 347-357.
- Dempsey, A. a Chandler, W.** (1963) Disinfectant treatments for freshly harvested pepper seeds. *Plant Dis Rep*, **47**, 325-327.
- Diab, S., Bashan, Y. a Okon, Y.** (1982) Studies on infection with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial scab of pepper in Israel. *Phytoparasitica*, **10**, 183-191.

- Dougherty, D.** (1979) Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays. *P Fl St Horti Soc*, **91**, 291-293.
- Gardner, M. a Kendrick, J.** (1921) Bacterial spot of tomato. *J Agric Res*, **21**, 123-156.
- Gartemann, K.H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flugel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Grafen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Ruckert, C., Schneiker, S., Zellermann, E.M., Puhler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O. a Bartels, D.** (2008) The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol*, **190**, 2138-2149.
- Gitaitis, R., McCarter, S. a Jones, J.** (1992) Disease control in tomato transplants produces in Georgia and Florida. *Plant Dis*, **76**, 651-656.
- Goode, M. a Sasser, M.** (1980) Prevention - the key to controlling bacterial speck and bacterial speck of tomato. *Plant Dis*, **64**, 831-834.
- Grogan, R.G. a Kendrick, J.B.** (1953) Seed transmission, mode of overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathol Abstr*, **43**, 473.
- Hall, N.** (2007) Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol*, **210**, 1518–1525.
- Hamza, A., Robene-Soustrade, I., Jouen, E., Gagnevin, L., Lefeuvre, P., Chiroleu, F. a Pruvost, O.** (2010) Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Dis*, **94**, 993-999.
- Hayward, A. a Waterston, J.** (1964) *Xanthomonas vesicatoria*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. *CAB International, Wallingford*, **20**, .
- Jones, J., Bouzar, H., Stall, R., Almira, E., Roberts, P., Bowen, B., Sudberry, J., Strickler, P. a Chun, J.** (2000) Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *Int J Syst Evol Microbiol*, **50**, 1211-1219.
- Jones, J., Lacy, G., Bouzar, H., Stall, R. a Schaad, N.** (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol*, **27**, 755-762.
- Kůdela, V., Novacky, A. a Fucikovsky, L.** (2002) Rostlinolékařská bakteriologie. Vydání 1. 347 s. ISBN 80–200–0899–3
- Leyns, F., De Cleene, M., Swings, J. a De Ley, J.** (1984) The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot Rev*, **50**, 305-355.

- Louws, F.J., Wilson, M., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Jones, J.B., Shoemaker, P.B., Sahin, F. a Miller S.A.** (2001) Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Dis*, **85**, 481-488.
- Madabhushi, R.S.** (1998) Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions. *Electrophoresis*, **19**, 224–230.
- McCarter, S.M., Jones, J.B., Gitaitis, R.D. a Smitley D.R.** (1983) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed host in Georgia. *Phytopathology*, **73**, 1393-1398.
- McInnes, T., Gitaitis, R., McCarter, S., Jaworski, C. a Phatak, S.** (1988) Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Dis*, **72**, 575-579.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Rekanovic, E. a Potocnik, I.** (2009) Races and hosts of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Serbia. *Arch Biol Sci*, **61**, 93-102.
- Mitrev, S. a Kovačević, B.** (2006) Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* isolated from peppers in Macedonia. *J Plant Pathol*, **88**, 321-324.
- Moaledj, K.** (1986) Comparison of Gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: their application to numerical taxonomy. *J Microbiol Meth*, **5**, 303-310.
- Myers, D., Varela-Diaz, V. a Coltorti, E.** (1974) Comparative sensitivity of gel-diffusion and tube agglutination tests for the detection of *Brucella canis* antibodies in experimentally infected dogs. *Appl Microbiol*, **28**, 1–4.
- Nemeth, J. a Vuurde, J. v.** (2006) Development of immunofluorescence colony staining (IFC) for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* in tomato seeds. *Seed Sci Technol*, **34**, 85-100.
- Obradovic, A., Jones, J.B., Momol, M.T., Balogh, B. a Olson, S.M.** (2004) Management of tomato bacterial spot in the field by foliar application of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Dis*, **88**, 736-740.
- Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J., Arsenijevic, M., Jones, J., Minsavage, G. a Wang, J.** (2004b) Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *Eur J Plant Pathol*, **110**, 285-292.
- OEPP/EPPO** (1988) Data sheets on quarantine organisms No. 157, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, **18**, 521-526.
- OEPP/EPPO** (2005) Data sheets on quarantine organisms No. 50, *Clavibacter michiganensis*

- subsp. *michiganensis*. OEPP/EPPO Bulletin **35**: 275-283.
- Opara, E. a Odibo, F.** (2009) Studies and characterization of bacterial spot pathogen of tomato *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J Mol Genet*, **1**, 35-43.
- Park, D.S., Shim, J.K., Kim, J.S., Lim, C.K., Shrestha, R., Hahn, J.H. a Kim, H.G.** (2009) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on *rhs* family gene sequences. *Microbiol Res*, **164**, 36-42.
- Pohronezny, K., Moss, M., Dankers, W. a Schenk, J.** (1990) Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. *Plant Dis*, **74**, 800-805.
- Porcar, M. a Juarez-Perez, V.** (2003) PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, 419-432.
- Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A. a Baumeister, K.** (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, **238**, 336-341.
- Rat, B., Poissonnier, J., Goisque, M.J. a Burgaud, A.** (1991) Le point sur le chancre bactérien. *Fruit et Légumes*, **86**, 38-40.
- Sanger, F., Nicklen, S. a Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Sedláček, I.** (2007) Taxonomie prokaryot. Vydání 1. 272 s. ISBN 80-210-4207-9
- Schneider, R.W. a Grogan R.G.** (1977) Tomato leaf trichomes, a habitat for resident populations of *Pseudomonas tomato*. *Phytopathology*, **67**, 898-902.
- Stall, R.E.** (1995) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Pathogenesis and host-parasite specificity in plant diseases. **1**, 167-184.
- Stamova, L. a Sotirova, V.** (1987) Reaction of different crops to artificial inoculation with *Corynebacterium michiganense*. *Arch Phytopathol Pfl*, **23**, 211-216.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. a Koptíková, J.** (2008) Metody molekulární biologie., Vydání 1. 192 s. ISBN 978-80-210-3841-7
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D., Niesbach-Klösgen, U., Patschkowski, T., Rückert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S., Vorhölter, F., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D. a Kaiser, O.** (2005) Insights into genome plasticity and

pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol*, **187**, 7254-7266.

**Tsuchiya, K. a d'Ursel, C.** (2004) Development of a sensitive ELISA using three monoclonal antibodies against lipopolysaccharides to detect *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, the causal agent of bacterial spot of tomato and pepper. *J Gen Plant Pathol*, **70**, 21-26.

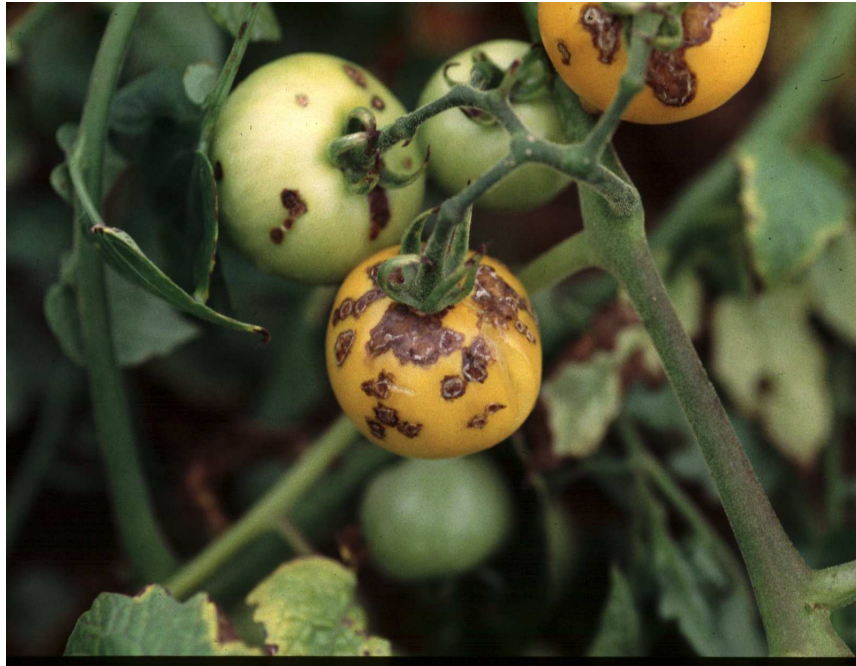
**Verniere, C., Pruvost, O., Civerolo, E.L., Gambin, O., Jacquemoud-Collet, J.P. a Luisetti, J.** (1993) Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 243-249.

**Whalen, M., Innes, R., Bent, A. a Staskawicz, B.** (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis thaliana* and a bacterial gene determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, **3**, 49-59.

**White, T.** (1996) The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *Trends Biotechnol*, **14**, 478-83.

**Wilson, M., Campbell, P.J., Jones, J.B. a Cuppels D.** (2002) Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. *Phytopathology*, **92**, 1284-1292.

## 7. Obrázky



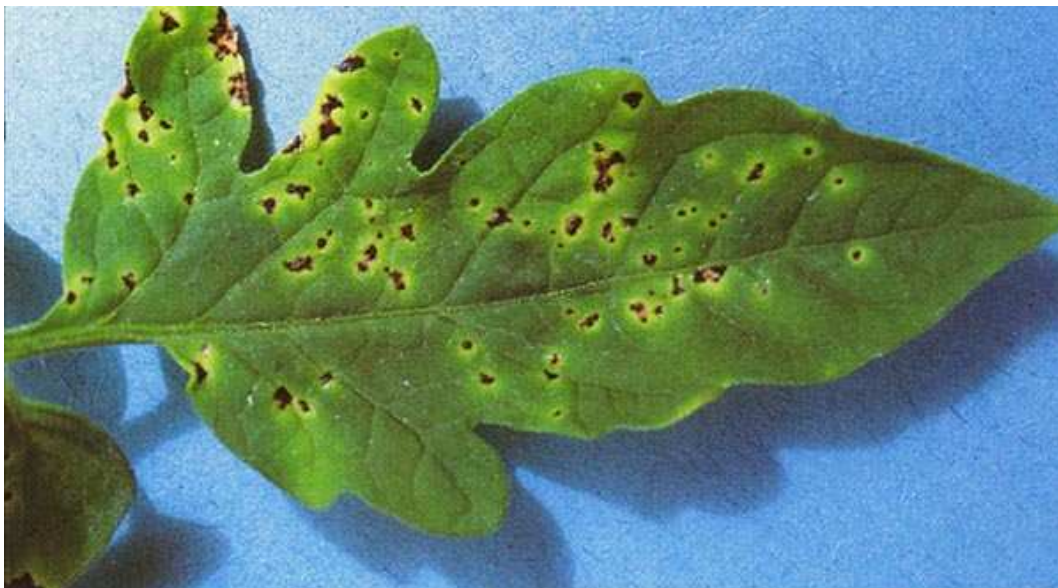
<http://plaza.ufl.edu/jbjones/joneslab/bacterial%20spot%203.jpg>

Obr. 1. Příznaky bakteriální skvrnitosti na plodech rajčete způsobené *Xanthomonas vesicatoria*.



[http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/images/tomatoes/diseases/tomato\\_D3b-Bac-canker--RPitblado\\_zoom.jpg](http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/images/tomatoes/diseases/tomato_D3b-Bac-canker--RPitblado_zoom.jpg)

Obr. 2. Příznaky bakteriálního vadnutí na listu rajčete způsobené *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.



[http://aggie-horticulture.tamu.edu/publications/tomatoproblemsolver/leaf/images/photos/bac\\_spec.jpg](http://aggie-horticulture.tamu.edu/publications/tomatoproblemsolver/leaf/images/photos/bac_spec.jpg)

Obr. 3. Příznaky bakteriální tečkovitosti na listu rajčete způsobené *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

## 8. Přílohy

### Seznam příloh:

1. LENZ O., BERAN P., FOUSEK J., MRÁZ I. (2010): A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Microbiological Methods* 82: 90-94.
2. MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P., POUVOVÁ D. (2010): Spolehlivost diagnostických technik pro detekci karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* v rostlinách a semenech rajčete. *Úroda – vědecká příloha* 12/2010: 309-312.
3. BERAN P., MRÁZ I. (2011): Návrh a testování specifických primerů pro detekci karanténní bakterie *Xanthomonas vesicatoria*. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 205-208.
4. KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I., POUVOVÁ D., BERAN P. (2011): Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete v ČR a spolehlivost detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z rajčat různými diagnostickými technikami. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 221-224.
5. MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P. (2011): Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers. *Acta Horticulturae* 914: 57-60.
6. BERAN P., MRÁZ I.: Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. Odesláno k opublikování do časopisu *Crop Protection*.
7. MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B., POUVOVÁ D.: Comparison of reliability of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* detection from various tomato plant parts using the several immunochemical and molecular techniques. Odesláno k opublikování do časopisu *African Journal of Biotechnology*.
8. MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B.: Detection of quarantine bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in old tomato plants and seeds by the selected molecular techniques. Odesláno k opublikování do časopisu *Crop Protection*.



LENZ O., BERAN P., FOUSEK J., MRÁZ I. (2010): A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Microbiological Methods* 82: 90-94.



# A microarray for screening the variability of 16S–23S rRNA internal transcribed spacer in *Pseudomonas syringae*

O. Lenz\*, P. Beran, J. Fousek, I. Mráz

Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Institute of Plant Molecular Biology, Branišovská 31/1160, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 6 April 2010

Received in revised form 3 May 2010

Accepted 7 May 2010

Available online 12 May 2010

### Keywords:

ITS1

Ribosomal spacer

Mosaicism

*Pseudomonas syringae*

## ABSTRACT

The 16S–23S ribosomal internal transcribed spacer (ITS1) is often used as a subspecies or strain-specific molecular marker for various kinds of bacteria. However, the presence of different copies of ITS1 within a single genome has been reported. Such mosaicism may influence correct typing of many bacteria and therefore knowledge about exact configuration of this region in a particular genome is essential. In order to screen the variability of ITS1 among and within *Pseudomonas syringae* genomes, an oligonucleotide microarray targeting different configurations of ITS1 was developed. The microarray revealed seven distinct variants in 13 pathovars tested and detected mosaicism within the genomes of *P. syringae* pv. coronafaciens, pisi, syringae and tabaci. In addition, the findings presented here challenge the using of rRNA analysis for pathovar and strain determination.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Pseudomonas syringae* is a common Gram-negative bacterium that can be found both as a harmless commensal on leaf surfaces or as an important plant pathogen that causes a range of blight, canker, speck and spot diseases in many important agricultural crops (Hirano and Upper, 2000). Approximately 50 different pathovars of this species can be distinguished today (Küdela et al., 2002) according to their pathogenicity on plants and phenotypic characteristics. To determine the divergence existing at the molecular level, two methodological approaches are routinely employed today: analysis of repetitive elements based on rep-PCR technique (e.g. Peters et al., 2004; Vicente and Roberts, 2007; Gilbert et al., 2009; for a general review see Ishii and Sadowsky, 2009) and analysis of the rRNA operon (*rrn*).

The *rrn* is composed of three rRNA genes and two internal transcribed spacers (ITS) in the order 16S rRNA–ITS1–23S rRNA–ITS2–5S rRNA. At the subspecies level, only the ITS1 region has been reported as a suitable strain and/or pathovar marker (Manceau and Horvais, 1997; Sawada et al., 1997; Peters et al., 2004; Oguiza et al., 2004; Kong et al., 2005; Olczak-Woltman et al., 2007). This region consists of species-conserved domains containing two tRNA genes and hypervariable DNA segments that could allow a strain's characterization (Garcia-Martinez et al., 2002).

There are nevertheless five *rrn* operons within the *P. syringae* genome, and strains possessing different variants of the ITS1 region within the given genome have been described (Milyutina et al., 2004;

Stewart and Cavanaugh, 2007). This intragenomic heterogeneity (mosaicism) is brought about by different combinations of the entire hypervariable segments of ITS1, possibly resulting from recombination and horizontal transfer (Milyutina et al., 2004). Similar mosaicism has been found also within other bacteria genomes (Stewart and Cavanaugh, 2007). This may significantly skew the diversity estimates and phylogenetic relationships based on *rrn* analysis.

Although the described variability can be revealed by conventionally used DNA-fingerprinting methods, these have some constraints when probing different versions of hypervariable segments (e.g. the need for several separate enzymes and reactions, sensitivity to point mutations). A competent method is to sequence all the ITS1 copies per genome, but this is too laborious for routine analysis. Therefore, a method that allows simple screening of inter- and intragenomic variability in parallel would be helpful.

DNA microarrays were initially designed for gene expression studies and single nucleotide polymorphism profiling, but since 2000 these have been widely used also for detecting plant pathogens, including viruses (reviewed in Boonham et al., 2008), bacteria (reviewed in Huyghe et al., 2009) or phytoplasmas (Nicolaisen and Bertaccini, 2007). The principle of a microarray is to selectively hybridize the sample sequences labeled fluorescently (targets) to the specific capture probes printed onto a solid surface. The main advantage of the method lies in its ability to detect many different sequences in parallel.

The aims of the study were to a) develop an oligonucleotide microarray for screening the variability of the ITS1 region among *P. syringae* strains, b) test the ability of the microarray to detect mosaicism present within some genomes, and c) assess the method's potential for pathovar differentiation.

\* Corresponding author.

E-mail address: [lenz@umbr.cas.cz](mailto:lenz@umbr.cas.cz) (O. Lenz).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and DNA isolation

Samples under study were well characterized strains obtained from several type collections (Table 1). Bacterial cultures were grown overnight on King's B (KB) medium (King et al., 1954) at 25 °C. Three passages in combination with standard streaking method were used to obtain the cell lineage of a single bacterial genome only. Genomic DNA was isolated using Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA) while following the manufacturer's original protocol. Genetic diversity among pathovars and genome homogeneity during the cell subculturing process were proven using the rep-PCR method (Louws et al., 1994) with the following modifications: annealing time was increased to 2 min and the extension step was shortened from 8 to 5 min.

### 2.2. Target preparation, cloning and sequencing

Purified DNA (1 µl) was amplified using PPP-MasterMix (TopBio, Czech Republic) according to the manufacturer's protocol; non-labeled forward and Cy5-labeled reverse primers (Table 2) were used

**Table 1**

Isolates in the study with configurations observed. BCCM/LMG = Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, Ghent University, Belgium; RIPC = Research Institute of Crop Production (since 2007 renamed to Crop Research Institute), Prague, Czech Republic; NCPPB = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, UK; CCM = Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno, Czech Republic. If multiple accession numbers are given for one strain, their order corresponds to the order of ITS1 versions found.

Collection number	Pathovar	Host	Locality	Version of ITS1 found	Accession number
BCCM/LMG 5060	Coronafaciens	Oat	UK	a + e	HM032069, HM032070
RICP 7001	Glycinea	Soybean	Czech Republic	e	HM032071
BCCM/LMG 5066	Glycinea	Soybean	New Zealand	e	HM032072
BCCM/LMG 5067	Helianthi	Sunflower	Mexico	f	HM032073
BCCM/LMG 5070	Lachrymans	Cucumber	USA	d	HM032074
BCCM/LMG 2245	Phaseolicola	Bean	Canada	a	HM032075
BCCM/LMG 5079	Pisi	Pea	New Zealand	a	HM032076
NCPPB 3496	Pisi	Pea	USA	a + e	HM032077, HM032078
BCCM/LMG 2330	Striafaciens	Oat	Unknown (Elliot)	a	HM032079
CCM 4073	Syringae	Cummin	Czech Republic	b + e	HM032081, HM032082
BCCM/LMG 1247	Syringae	Lilac	UK	a + e + g	HM032080, HM032083, HM032084
BCCM/LMG 5393	Tabaci	Tobacco	Hungary	a + e	HM032085, HM032086
BCCM/LMG 5090	Tagetis	Marigold	Zimbabwe	f	HM032087
BCCM/LMG 5092	Theae	Tea plant	Japan	c	HM032088
RICP 9921	Tomato	Tomato	Czech Republic	d	HM032089
RICP 9932	Tomato	Tomato	Czech Republic	d	HM032090
RICP 100	Tomato	Tomato	Czech Republic	d	HM032091
RICP 101	Tomato	Tomato	Czech Republic	d	HM032092
BCCM/LMG 5093	Tomato	Tomato	Guernsey - UK	d	HM032093
BCCM/LMG 2349	Ulmi	Elm tree	Yugoslavia	e	HM032094

in the reaction. The PCR conditions were as follow: 95 °C for 5 min, 35 times (94 °C for 1 min, 60 °C for 20 s, 72 °C for 1 min), 72 °C for 10 min and 4 °C for forever. Targets were then purified using GenElute PCR CleanUp Kit (Sigma-Aldrich, USA) into 70 µl of final volume. Targets showing mosaicism under the hybridization experiments were 1000-times diluted, PCR reamplified with non-labeled primers (same conditions as above), and cloned using CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) and NEB 10-beta competent *E. coli* cells (New England BioLabs, USA) according to the protocols supplied. Colonies were added directly to the PCR mix and targets were prepared as described above. Two microlitres of targets were sequenced (BigDye Terminator Kit, v.3.1, Applied Biosystems, USA) with corresponding non-labeled primers (Table 2). The alignment of the sequences obtained and comparison of targets to all probes was done in ClustalW (Thompson et al., 1994).

### 2.3. Probes design and microarray fabrication

The ITS1 sequences of *P. syringae* were retrieved from GenBank, aligned using the POA alignment programme (Lee et al., 2002), and then the alignment was justified manually. Required probe-to-target similarity was  $\geq 75\%$  homology and  $\geq 15$  nt of identity, and each probe designed was allowed to fulfill these criteria for targeted sequences only. The lengths of the probes were 35 to 40 nt, and the shorter specific probes were extended by random sequences on both ends (Table 2). The similarity between the probes themselves was checked by ClustalW in an all-against-all comparison. The probes were synthesized by Sigma-Aldrich and spotted (Lambda, Austria) onto aldehyde-coated plastic slides (HTA™ Slide12, Greiner Bio-One, Germany).

### 2.4. Hybridization, scanning and data analysis

The 15 µl of each target were mixed with 15 µl of preheated (42 °C) hybridization buffer (500 µl 100% formamide, 500 µl 20×SSC, 20 µl 10% SDS) and denatured at 95 °C for 3 min. After cooling to room temperature, targets were applied onto the microarray slide and hybridized at 42 °C for 45 min. The arrays were washed with pre-warmed (42 °C) buffers: 2×SSC and 0.1% SDS for 1 min, 1×SSC for 1 min and 0.1×SSC for 5 min. Air-dried slides were scanned using a Typhoon 9410 scanner and processed with ImageQuant TL v2003.02 software (Amersham Bioscience, USA). Signal-to-noise ratio (SNR) values were computed as the background subtracted signal of the particular spot divided by the standard deviation of the background. If a SNR  $\geq 3$  was obtained for both spots in the double-dot, the signal was considered to be positive.

## 3. Results

### 3.1. Probes and microarray design

Alignment of 78 sequences of *P. syringae* revealed three variable blocks of ITS1, denoted here as A, B and C (Fig. 1). Outside of these blocks, the alignment was highly conserved except for sequence AF209771, which differed from the consensus sequence onwards from block B. A BLAST-search found significant similarity only to *Xanthomonas* species, and this part of the sequence was therefore excluded from the alignment. Three different versions of each hypervariable block were found, and each was represented by a group of sequences with more than 70% nucleotide similarity. Nine probes were designed in order to have only one probe targeting each of the block versions found (Fig. 1, Table 2). The similarity between C2 and C3 versions did not allow the design of a unique probe, and 16 of 29 sequences targeted by probe C3 showed 75% homology also to probe C2. Similarity between probes did not exceed 55% homology in all-to-all comparison and maximal length of identity

**Table 2**

Probes and primers used in the study.  $\geq 15$  nt of identity = proportion of sequences having at least 15 nt long region identical with probe (e.g. 51/53 = 51 out of 53 targeted sequences share  $\geq 15$  nt long region of identity to probe);  $\geq 75\%$  homology = proportion of sequences having at least 75% homology to the probe; min. homology = minimal homology found within targeted sequences. Upper case, bold, underlined = probe; lower case = random sequence; n.e. = not evaluated.

Probe	Sequence 5' ->3'	$\geq 15$ nt of identity	$\geq 75\%$ homology	min. homology (%)
A1	<b>TTAAGCTCCAAGCTGATAGCTCAACGCTAGCGGCTACAAG</b>	12/12	12/12	95
A2	<b>GAGAAGCAGCTTTTGCTTTGCACACCCGATTITGG</b>	13/13	13/13	100
A3	cagaatctag <b>GAAGCAGCGCCGAGTTCGG</b> gatcgattga	51/53	52/53	70
B1	<b>AGATAGCTGGTCAGAGTAGACGCCCTCCCGGTATGTAGAA</b>	49/50	50/50	83
B2	<b>ACCTGGTGAAGTTGGTCAGAGCGCTACGACACCCGGA</b>	13/13	13/13	87
B3	<b>CCACCAATTTGTGTGGGAAACGCCTGTAGAAATA</b>	15/15	15/15	97
C1	<b>GCATTCCATTGATCCTGACGATCAGTGCCTGAATG</b>	15/18	18/18	91
C2	ctggatct <b>AGCATTCCACTGGATTGAAGGG</b> agatgcca	13/30	30/30	87
C3	ctggatctag <b>CCCTGAGAGATTGAAGGGT</b> gagatgcca	17/29	23/29	70
Primer-FWD	GTA AACGACGCGCCAGGTGCCAGCMGCCCGG	n.e.	n.e.	n.e.
Primer-REV	ACCGTATGCGCTTCTTCAC	n.e.	n.e.	n.e.

was 9 nt for probes C2 and C3. Four double-dots of each probe were printed per microarray (Fig. 2, scheme) consisting of  $6 \times 6$  double-dots.

### 3.2. Specificity and sensitivity of microarray

An identical hybridization pattern was observed for three replicate samples of each strain or clone. All targets hybridized exclusively to probes sharing at least 75% homology with them. Hybridization was indicated by  $\text{SNR} > 5$  in the case of all but probe A3, where the average SNR was 2.3. In this case, probe-to-target homology was 100% for each target. Nevertheless, the SNR of all hybridized probes was at least 3 times higher than the inner fluorescence of spots ( $\text{SNR} < 0.7$ ). All ITS1-uniform genomes and cloned targets hybridized specifically to one probe only per each hypervariable block (Fig. 2, Table 1), with two exceptions: a) strains of pv. lachrymans and pv. tomato hybridized occasionally to both probes C3 and C2, and b) some cloned targets of pv. syringae did not hybridize to any of the probes targeting hypervariable block C. These exceptions were due to the presence of a modified variant of block C having (in the case a) or lacking (in the case b) at least 75% homology to the particular probes (see Section 3.3).

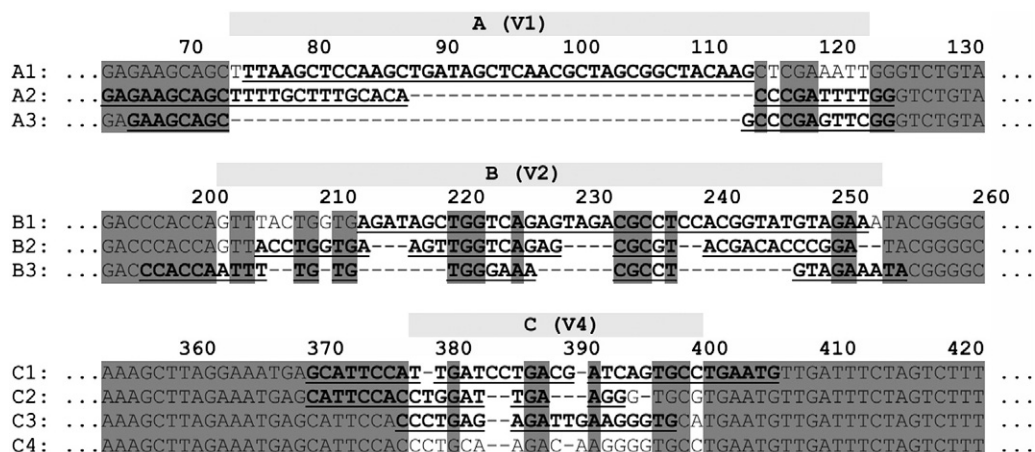
### 3.3. Detection of particular ITS1 configurations

Seven configurations of ITS1 were found within the genomes of 20 strains tested (Table 1, Fig. 2), based on the following versions of hypervariable blocks A, B, C: a (A1, B3, C1), b (A1, B3, C4), c (A2,

B2, C2), d (A2, B2, C3), e (A3, B1, C1), f (A3, B1, C2), and g (A3, B1, C4). The ITS1-uniform genome was detected in 15 strains investigated (Table 1). Configurations for nine of these strains were determined directly from the observed hybridization pattern (a, c, e, or f) and confirmed by sequencing of the targets. The other six strains hybridized as configuration d with occasional simultaneous hybridization to probe C2 (Fig. 2). These targets were cloned and individual clones were hybridized onto the microarray in order to elucidate possible ITS-mosaicism. No changes in hybridization patterns were observed and sequencing of the targets revealed a single ITS1 version having 100% and 75% homology to probes C3 and C2, respectively.

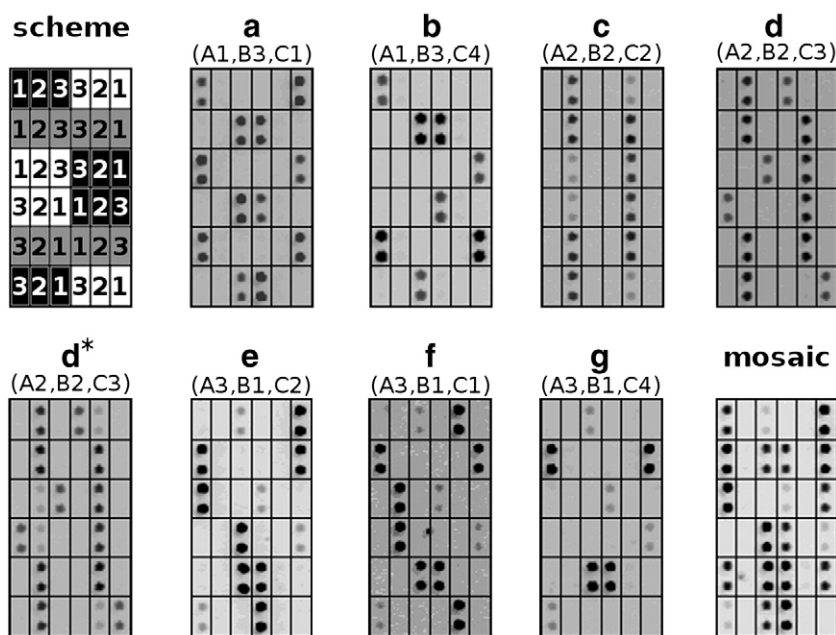
Another five strains in the study hybridized consistently to more than three different probes on the microarray (Fig. 2, mosaicism), suggesting the ITS1-mosaic genome. Hybridization of cloned targets revealed two or three different configurations of ITS1 within the single genomes (Table 1, Fig. 2). Furthermore, a novel variant of block C was found in configurations b and g (pv. syringae) having only 70% homology – and thus not hybridizing – to probe C3 (Fig. 2).

For each particular configuration of ITS1 detected, sequences with the same configuration were found in GenBank belonging either to the same pathovar or to a sequence from an unidentified pathovar. Moreover, configuration d was also found in pv. tagetis (AY342203), whereas only the f configuration was found in the study. The alignment of sequences obtained in the study with all sequences of the targeted pathovars from GenBank showed high conservation of ITS1 sequences for each particular configuration among different pathovars. Only a few nucleotide changes were observed, whereas variability between different strains of the same pathovar was higher



**Fig. 1.** Different versions of hypervariable segments (A, B, C) found within ITS1 and capture probes designed (bold, underlined). C4 = derivative of C3 which did not hybridize with C3 probe. Dark gray = nucleotides conserved in all three versions; gaps are depicted as “-” symbol.





**Fig. 2.** Hybridization patterns observed. Scheme = layout of the probes targeting block A (black), block B (gray), and block C (white); a, b, c, d, e, f, g = hybridization patterns of particular configurations of ITS1, \* = version of d with hybridization to both probes C3 and C2; mosaic = hybridization pattern of the ITS1-mosaic genomes (uncloned targets). Pictures were bleached, transformed to inverted colors, and contrast was enhanced.

than variability between pathovars with the same configuration of ITS1.

#### 4. Discussion

Variability of the bacterial ITS1 is usually connected with the presence or absence of particular tRNA genes and/or with combinations of several variants of hypervariable blocks. However, only the latter has been described for *P. syringae* (Milyutina et al., 2004; Stewart and Cavanaugh, 2007). Therefore, the microarray in the study targeted three hypervariable blocks, A, B and C, corresponding to regions V1, V2, and V4, respectively, as described by Milyutina et al. (2004). Region V3 described there was highly conserved and it did not allow for the design of discriminatory probes.

The basic task of the microarray developed was to find exact configurations of ITS1. The study proved that configuration of the ITS1-uniform genomes can be read directly from the hybridization pattern of a particular target. The ITS1-mosaic genomes had to be cloned and re-hybridized in order to reveal their exact compositions. The only constraint is seen in the relative similarity of the C3 and C2 versions of block C. This can lead to hybridization of some sequences to both probes C3 and C2, thereby mimicking the ITS1-mosaic genome. Unfortunately, the length of this region does not allow for designing more specific probes. The only solution is to hybridize a cloned target. In order unambiguously to determine the C4 version of block C found during microarray testing, an additional probe should be added to the microarray targeting this variant.

All seven configurations of ITS1 found in this study coincided with sequences already presented in GenBank. However, the microarray also was able to indicate the diversity of ITS1 sequences within a particular genome. Configurations *b* and *g* were found in the ITS1-mosaic genomes only. By contrast, configurations *c*, *d*, and *f* were linked to the ITS1-uniform genomes. Configuration *e* was presented in all the ITS1-mosaic genomes detected, although it was detected, too, in some of the ITS1-uniform genomes. Only two cases of ITS1-mosaicism within the *P. syringae* genomes have been reported to date, both corresponding to the configuration *e* + *b*. Milyutina et al. (2004) found mosaicism in two strains of unidentified pathovars, while Stewart and Cavanaugh (2007) reported mosaicism within the genome of

*pv. syringae*. The latter study mentioned three different versions of ITS1, although one of them was not created by block combinations considered here and was represented by only two nucleotide changes. In addition to these findings, the same type of mosaicism (*a* + *e*) was found by the developed microarray in *pv. coronafaciens*, *pv. phaseoliicola*, *pv. pisi*, and *pv. tabaci*, where it had not been reported before. Two other types of mosaicism (*b* + *e* and *a* + *e* + *g*) were found within the strains of *pv. syringae*.

The last question asked in this study regarded the determination of pathovar by ITS1 sequence. Kong et al. (2005) reported only very small genetic diversity of ITS1 within 24 strains of *pv. tagetis* collected worldwide. All sequences in the study cited belong to the *f* configuration of ITS1, and the same configuration of the pathovar was determined in this study. This suggests a possibility of determination for at least some pathovars. Nevertheless, sequence AY342203 of *pv. tagetis* found in GenBank was based on the *d* configuration of ITS1, and the *f* configuration was found also in *pv. helianthi*. A similar situation was observed for the other configurations. Furthermore, a particular configuration was not specific even for the same pathovar (*pisii*, *syringae*). The only exception was configuration *c*, which was unique to *pv. theae* in the study. Only 13 pathovars out of more than 50 existing were tested, however, and other pathovars with this configuration can be present in nature. These findings, together with the high conservation of particular configurations, imply that neither the ITS1 configuration nor the nucleotide changes are characteristic for individual pathovars.

Given that ITS1 has been reported as the only suitable subspecies marker on the *rrn* operon, moreover, it could be concluded that analysis of any part of *rrn* cannot properly characterize the pathovars of *P. syringae*. This conclusion challenges several studies reporting successful differentiation of pathovars *P. syringae* (e.g. Manceau and Horvais, 1997; González et al., 2000; Peters et al., 2004; Olczak-Woltman et al., 2007) or evaluating their phylogenetic relationships (Sawada et al., 1997; Kong et al., 2005) based on the analysis of ITS1/*rrn*. These results can be caused by including a few strains or a selected group of them in the studies mentioned. Therefore, more strains from each pathovar should be tested in future studies and further research is needed to improve our knowledge about ITS1 variability. The microarray presented here can improve and simplify

some parts of such research. The number of probes per microarray can be further extended to target another versions of hypervariable blocks found within the genomes of different bacterial species. Such a microarray would be a useful generic tool for screening the variability of the ITS1.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Blanka Kokošková (Crop Research Institute, Prague, Czech Republic) for kindly providing the *P. syringae* collection isolates. The work was supported by the Czech Science Foundation, grant no. 522/07/P338, and by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant no. AV0Z50510513. The research leading to these results also received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement no. 229518.

## References

- Boonham, N., Tomlinson, J., Mumford, R., 2008. Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 307–328.
- García-Martínez, J., Bescos, I., Rodríguez-Sala, J.J., Rodríguez-Valera, F., 2002. RISSC: a novel database for ribosomal 16S–23S RNA gene spacer regions. *Nucleic Acids Res.* 29, 178–180.
- Gilbert, V., Legros, F., Maraite, H., Bultreys, A., 2009. Genetic analyses of *Pseudomonas syringae* isolates from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate–host relationships within the pathovar *syringae*, and help identify both races of the pathovar *morsprunorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 124 (2), 199–218.
- González, A.J., Landeras, E., Mendoza, M.C., 2000. Pathovars of *Pseudomonas syringae* causing bacterial brown spot and halo blight in phaseolus vulgaris L. are distinguishable by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2), 850–854.
- Hirano, S.S., Upper, C.D., 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 624–653.
- Huyghe, A., Francois, P., Schrenzel, J., 2009. Characterization of microbial pathogens by DNA microarrays. *Infect. Genet. Evol.* 9 (5), 987–995.
- Ishii, S., Sadowsky, M.J., 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ. Microbiol.* 11 (4), 733–740.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307.
- Kong, H., Blackwood, C., Buyer, J.S., Gulya Jr., T.J., Lydon, J., 2005. The genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on the 16S–23S rDNA intergenic spacer regions. *Biol. Control* 32 (3), 356–362.
- Kúdela, V., Nováček, A., Fucík, L., 2002. *Phytopathology* (in Czech). Academia Praha. 347 pp.
- Lee, Ch., Grasso, C., Sharlow, M.F., 2002. Multiple sequence alignment using partial order graphs. *Bioinformatics* 18, 452–464.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Taylor Stephens, C., de Bruijn, F.J., 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2286–2295.
- Manceau, C., Horvais, A., 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (2), 498–505.
- Milyutina, I.A., Bobrova, V.K., Matveeva, E.V., Schaad, N.W., Troitsky, A.V., 2004. Intragenomic heterogeneity of the 16S rRNA–23S rRNA internal transcribed spacer among *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 239 (1), 17–23.
- Nicolaisen, M., Bertaccini, A., 2007. An oligonucleotide microarray-based assay for identification of phytoplasma 16S ribosomal groups. *Plant Pathol.* 56 (2), 332–336.
- Oguiza, J.A., Rico, A., Rivas, L.A., Sutra, L., Vivian, A., Murillo, J., 2004. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. *Microbiology* 150, 473–482.
- Olczak-Woltman, H., Masny, A., Bartoszewski, G., Płucienniczak, A., Niemirówicz-Szczytt, K., 2007. Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathol.* 56 (3), 357–364.
- Peters, B.J., Ash, G.J., Cocher, E.J., Hailstones, D.L., Noble, D.H., Urwin, N.A.R., 2004. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity. *Plant Pathol.* 53 (1), 73–79.
- Sawada, H., Takeuchi, T., Matsuda, I., 1997. Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyltransferase gene (*argK*) and 16S–23S rRNA intergenic spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1), 282–288.
- Stewart, F.J., Cavanaugh, C.M., 2007. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in bacteria. *J. Mol. Evol.* 65 (1), 44–67.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Vicente, J.G., Roberts, S.J., 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 117 (4), 383–392.

MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P., POUVOVÁ D. (2010): Spolehlivost diagnostických technik pro detekci karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* v rostlinách a semenech rajčete. *Úroda – vědecká příloha* 12/2010: 309-312.

## **SPOLEHLIVOST DIAGNOSTICKÝCH TECHNIK PRO DETEKCI KARANTÉNNÍ BAKTERIE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* V ROSTLINÁCH A SEMENECH RAJČETE**

### **Reliability of diagnostic techniques for detection of quarantine bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato plants and seeds**

**Mráz I.<sup>1</sup>, Kokošková B.<sup>2</sup>, Beran P.<sup>1</sup>, Pouvová D.<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Biologické centrum AV ČR

<sup>2</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha

<sup>3</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze

#### **Abstrakt**

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) byl spolehlivě detekován a izolován z různých částí (báze, stonky, řapíky) silně napadených rostlin deseti odrůd tyčkových rajčat diagnostickými metodami PCR, PTA-ELISA a IIF. Nejcitlivější metodou se ukázala být optimalizovaná PCR s komerčními a vlastními primery. Tato metoda se také osvědčila pro detekci patogena ze suchých, dva roky starých rostlin rajčete a pro detekci *Cmm* z uměle infikovaných semen čtyř tyčkových a pěti keříčkových odrůd. *Cmm* byl metodu PCR v semenech rajčat potvrzen nejen po 24 hodinách, ale i po jednom týdnu a jednom měsíci po inokulaci.

**Klíčová slova:** bakteriální vadnutí rajčete, detekce, ELISA, IF, PCR, rep-PCR, hybridizace

#### **Abstract**

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) was reliably detected and isolated from various parts (base, stem and petiole) of strongly infected plants of ten indeterminate tomato varieties using diagnostic techniques PCR, PTA-ELISA and IIF. The most sensitive technique was optimized PCR with commercial and own PCR primers. This method was also convenient for detection of pathogen from dried, two years old tomato plants and for detection of *Cmm* from artificially infected tomato seeds of four indeterminate and five determinant varieties. Using PCR, *Cmm* was proved in tomato seeds not only after 24 hours, but also after one week and one month after inoculation.

**Key words:** tomato bacterial canker, detection, ELISA, IF, PCR, rep-PCR, hybridization

#### **Úvod**

Jedním z nejzávažnějších patogenů rajčete, zejména pak skleníkových porostů, je karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [(Smith) Davis et al.] (dále jen *Cmm*), způsobující bakteriální vadnutí rajčete. Tato bakterie se může vyskytovat rovněž na planě rostoucích rostlinách z rodu *Solanum* (OEPP/EPPO, 2005).

K detekci a identifikaci fytopatogenních bakterií se používají různé diagnostické metody založené na odlišných principech účinku. V případě *Cmm* to bývá nejčastěji sklíčková aglutinace, ELISA, imunofluorescence, PCR a biologické testy na rajčeti (OEPP/EPPO, 2005). Úspěch sérologických metod závisí na typu a kvalitě specifických protilátek, které jsou buď polyklonální, monoklonální nebo kombinované (Alvarez, 2004). Dreier et al. (1995) uvádějí, že PCR se jeví jako rychlý test pro detekci *Cmm* v infekčním rostlinném pletivu.

Tato práce byla zaměřena na porovnání spolehlivosti imunochemických a molekulárně biologických metod pro detekci *Cmm* v přirozeně a uměle infikovaných rostlinách a semenech rajčete.



## **Materiál a metody**

Báze, stonky, řapíky a listy rostlin deseti tyčkových odrůd rajčete s příznaky *Cmm* byly testovány několika diagnostickými metodami (PTA-ELISA, IIF, SA, PCR). V sérologických testech byly použity polyklonální protilátky od skotské firmy Neogen Europe Ltd. Pro PTA-ELISA (nepřímá ELISA) byly rostlinné vzorky připraveny v ředění 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup> a pro IIF (nepřímá imunofluorescence) v ředění 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>. Vzorky byly rovněž testovány sklíčkovou aglutinací (SA) s použitím vyizolované bakteriální kultury v koncentraci cca 10<sup>9</sup> CFU/ml. Pro PCR byla vždy použita bakteriální DNA vyizolovaná z rozdrceného čerstvého (popř. usušeného) pletiva za použití kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle přiloženého návodu.

Metodou PCR bylo testováno pět rostlinných vzorků tyčkových odrůd rajčete s příznaky *Cmm* bezprostředně po odběru. Následně byly rostliny usušeny a po dvou letech opět stejným způsobem testovány.

Čtyři tyčkové (Perun, Sláva Porýní, Orfea F1, Pedro F1), pět keříčkových (Diana, Minigold, Karla, Pavlína, Denár) rostlin rajčete a semena těchto odrůd byly uměle infikovány bakteriální suspenzí (10<sup>9</sup> CFU/ml) dvou sbírkových kmenů *Cmm* (LMG 7333 a LMG 5727). Poté byl patogen detekován pomocí PCR.

Vlastní PCR reakce proběhla na přístroji Mini Cyclor (MJ Research, Watertown, MA, USA). Byly použity dvě dvojice primerů, a to komerční primery Cmm5/Cmm6 podle Dreier et al. (1995) s výsledným produktem 609 bp a vlastní primery Cmm1F/Cmm1R, poskytující výsledný amplifikační produkt 500 bp (Kokošková et al., 2010). Amplifikační produkt (1 μl) byl smíchán s 1 μl vkladacího pufru a barvivem SybrGreen (Lonza) a následně analyzován na 1% agarosovém gelu.

Jako doplňkové metody pro ověření výsledků PCR jsme použili rep -PCR s primery BOXA1R a REP1, REP2 (Versalovic et al., 1994) a dot blot hybridizaci se sondou značenou digoxigeninem (Kessler, 1992). Amplifikační protokol byl sestaven dle Louws et al. (1998). Elektroforéza PCR produktů probíhala na 1,5% agarosovém gelu po dobu tří hodin.

## **Výsledky a diskuse**

Patogen byl spolehlivě detekován oběma imunochemickými testy ve všech deseti odrůdách rajčete (Tab 1). Pomocí PTA-ELISA byl *Cmm* zjištěn v ředěních 1:1 a 1:10 (100 % pozitivních vzorků - báze, stonky, řapík), v ředění 1:10<sup>2</sup> byl patogen detekován ve stoncích všech deseti odrůd (Tab 1). V IIF testech byl *Cmm* zjištěn v ředěních 1:10 a 1:10<sup>2</sup> (100 % pozitivních vzorků - báze, stonky, řapík), v ředění 1:10<sup>3</sup> byl patogen detekován v bázích a stoncích všech deseti odrůd (Tab 1). V listech patogen detekován nebyl žádnou z imunochemických metod. Podle našich výsledků byla citlivost IIF testu 10x vyšší než citlivost PTA-ELISA, což je v souladu s údaji uváděnými Schaad et al. (1990). Ze všech vzorků byly získány izoláty *Cmm* ověřené v SA a ve zmíněných třech diagnostických metodách (PTA-ELISA, IIF, PCR) vyjma vzorku č. 3, z něhož izolát získán nebyl (Tab 1).

Nejcitlivější metodou se ukázala optimalizovaná PCR s komerčními (Dreier et al., 1995) i vlastními primery odvozenými z genu pro tomatinázu (Kokošková et al., 2010). Všechny vzorky odebrané z báze, stonku a řapíku testovaných rostlin deseti odrůd tyčkových rajčat vykazovaly v PCR pozitivní reakci s oběma dvojicemi primerů, ale vzorky odebrané z listů byly až na jednu výjimku negativní (Tab 1). Okrajové nekrózy na listech, které byly analyzovány, nemusely být patogenního původu či rostlinné pletivo bylo odumřelé, a proto patogen v listech nebyl detekován.

Metodou PCR s oběma dvojicemi primerů bylo prokázáno *Cmm* v pěti čerstvých vzorcích tyčkových odrůd rajčete s příznaky patogena pěstovaných ve skleníku. Po dvou letech byla z usušených rostlinných vzorků vyizolována bakteriální DNA a opakován PCR test. Ve všech

prověřovaných vzorcích byl *Cmm* opětovně prokázán. Svědčí to o schopnosti dlouhodobého přežívání patogena v rostlinných zbytcích.

V semenech byl patogen (vyizolovaná bakteriální DNA) detekován pomocí PCR s oběma výše uvedenými dvojicemi primerů po 24 hodinách, jednom týdnu a jednom měsíci ve všech případech s pozitivním výsledkem. To svědčí o snadné schopnosti patogena přežít na semenech. V uměle infikovaných rostlinách rajčete se žádnou z dvojic primerů nepodařilo detekovat patogena ani v jednom z testovaných vzorků. Předpokládáme, že během pěstování ve skleníku mohlo dojít k ozdravení rostlin či koncentrace patogena v rostlinách byla pod detekčním limitem PCR. Citlivost PCR v našich testech korespondovala s výsledky při detekci fytopatogenních bakterií uváděnými např. Luo et al. (2008).

Lze konstatovat, že výsledky získané v rep - PCR a dot blot hybridizaci byly až na drobné výjimky shodné s klasickým PCR.

Tato práce potvrdila naši dřívější zkušenost, že pro detekci patogena z rostlinného materiálu pomocí PCR je nezbytné použít vhodný izolační kit (Kokošková et al., 2007), čímž se PCR analýza stává sice pracnější i časově a finančně náročnější, ale mnohem přesnější.

**Tabulka 1:** Detekce a izolace *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z napadených rostlin deseti odrůd tyčkových rajčat

Vzorek č.	Detekce												Izolace		Celk. výsl.
	PTA-ELISA				IIF				PCR				SA	Izolát	
	1:10/1:100				1:100/1:1000				komerční/vlastní primery						
	b	s	ř	l	b	s	ř	l	b	s	ř	l			
1	+/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+++	ano	+
2	+/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+++	ano	+
3	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-	ne	+
4	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+++	ano	+
5	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+++	ano	+
6	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+++	ano	+
7	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	++	ano	+
8	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+++	ano	+
9	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+++	ano	+
10	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+	ano	+
Poz. vz. (%)	100/80	100/100	100/80	0/0	100/100	100/100	100/90	0/0	100/100	100/100	100/100	10/10	90	90	100

PTA-ELISA: Absorbance<sub>405</sub> : (-) negativní ( $\leq 20$ ); (+) pozitivní ( $\geq 0.21$ ); první sloupec - výsledky ředění 1:10 (shodné s výsledky v ředění 1:1), druhý sloupec - výsledky ředění 1:100  
 IIF: Počet fluorescentních buněk v jamce: (-) negativní (žádná); (+) pozitivní ( $\geq 1$  buňka); první sloupec - výsledky ředění 1:100 (shodné s výsledky v ředění 1:10), druhý sloupec - výsledky ředění 1:1000

SA: intenzita aglutinace (+) slabá, (++) střední, (+++) silná

PCR: První sloupec: výsledky s komerčními primery (Cmm5,6); druhý sloupec: výsledky s vlastními primery (Cmm1F,R)

## Závěr

Karanténní fytopatogenní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* byla spolehlivě detekována dvěma na sobě nezávislými metodami, a to nepřímou imunofluorescencí (IIF) za použití polyklonálních protilátek od skotské firmy Neogen Europe Ltd. a metodou optimalizovaného PCR s komerčními (Dreier et al., 1995) i vlastními primery odvozenými z genu pro tomatinázu (Kokošková et al., 2010). Na základě našich výsledků byla citlivost IIF testu 10x vyšší než citlivost PTA-ELISA, což je v souladu s údaji

uváděnými některými autory (Schaad et al., 1990). Nebezpečnost patogena především pro rajčata pěstovaná ve skleníku byla potvrzena jeho pozitivní detekcí pomocí PCR ve dva roky starých suchých vzorcích skleníkových rajčat, což svědčí o schopnosti dlouhodobého přežívání *Cmm* v rostlinných zbytcích. Citlivost PCR v našich testech korespondovala s výsledky při detekci fytopatogenních bakterií uváděnými např. Luo et al. (2008). Rovněž v uměle infikovaných semenech rajčete byl patogen detekován pomocí PCR nejen po jednom týdnu, ale i po jednom měsíci od data inokulace a je reálný předpoklad, že tato doba bude ještě mnohem delší. Toto zjištění svědčí o snadné schopnosti *Cmm* přežít na semenech. Délka doby přežívání patogena na semenech rajčat bude dále sledována v naší další práci.

**Tato práce byla podporována grantem č. QH71229 Ministerstva zemědělství ČR a grantem č. AV0Z50510513 Grantové agentury AV ČR.**

### **Použitá literatura**

- Alvarez, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.
- Dreier, J., BERPohl, A., Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462-468.
- Kessler, Ch. 1992. Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 436 pp.
- Kokošková, B., Mráz, I., Fousek, J. 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiol.* 55(3): 239-244.
- Kokošková, B., Mráz, I., Hýblová, J. 2007. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for reliable detection of *Erwinia amylovora*. *Folia Microbiol.* 52(2): 175-182.
- Louws, F.J., Bell, J., Medina-Mora, C.M., Smart, C.D., Opgenorth, D., Ishimaru, C.A., Hausbeck, M.K., de Bruijn, F.J., Fullbright, D.W. 1998. Rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: A rapide and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 88: 862 - 868.
- Luo, L.X., Walters, C., Bolkan, H., Liu, X.L., Li, J.Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Path.* 57: 332-337.
- OEPP/EPPO. 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. OEPP/EPPO Bull. 35: 275-283.
- Schaad, N. W., Sule, S., van Vuurde, J. W. L., Vrugink, H., Alvarez, A. M., Benedict, A. A., de Wael, L., van Laere, O. 1990. Serology. In: Klement F., Rudolf K., Sands D.C. (eds) *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest: 153-190.
- Versalovic, J., Schneider, M., Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth. Cell. Mol. Biol.* 5: 25 - 40.

**Kontaktní adresa:** Doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.

Biologické centrum AVČR, Ústav molekulární biologie rostlin, oddělení rostlinné virologie  
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
e-mail: mraz@umbr.cas.cz

BERAN P., MRÁZ I. (2011): Návrh a testování specifických primerů pro detekci karanténní bakterie *Xanthomonas vesicatoria*. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 205-208.

## NÁVRH A TESTOVÁNÍ SPECIFICKÝCH PRIMERŮ PRO DETEKCI KARANTÉNNÍ BAKTERIE *XANTHOMONAS VESICATORIA*

### Design and testing of primers specific for detection of quarantine bacterium *Xanthomonas vesicatoria*

Beran P.<sup>1,2</sup>, Mráz I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biologické centrum AV ČR, České Budějovice

<sup>2</sup>Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

#### Abstrakt

V této studii popisujeme vývoj metody PCR pro detekci karanténní bakterie *Xanthomonas vesicatoria*, která je patogenní pro rajče a papriku. Pár primerů XV1F a XV1R byl navržen na základě DNA sekvence genu atpD (získané ze sbírkového kmenu *Xv* CCM 2102) tak, aby byl specifický pouze pro detekci *Xanthomonas vesicatoria*. Tyto námi navržené primery poskytovaly (výsledný) amplifikační produkt o velikosti 356 bp a rovněž vykazovaly vysokou specifčnost. Při testování primerů na specifčnost soubor testovaných bakterií zahrnoval mnoho bakterií patogenních pro rajče a papriku (včetně rodu *Xanthomonas*) a některé další bakterie. K pozitivní PCR reakci však docházelo pouze tehdy, byla-li použita templátová DNA vyizolovaná z *Xanthomonas vesicatoria*. Dodržením protokolu popsáném v tomto článku lze rychle a spolehlivě identifikovat bakterii *Xanthomonas vesicatoria*. Dle dostupných informací se jedná o první dvojici primerů, detekující specificky pouze bakteriální druh *Xanthomonas vesicatoria*.

**Klíčová slova:** *Xanthomonas vesicatoria*, PCR, primery, detekce

#### Abstract

In this study we present development of PCR method for detection of *Xanthomonas vesicatoria*, the bacteria pathogenic for tomato and pepper. Primer pair XV1F and XV1R was designed based on DNA sequence of atpD gene (obtained from *Xv* CCM 2102 collection strain) in order to be specific for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. PCR product of 326 bp was observed only if DNA isolated from *Xanthomonas vesicatoria* was used as a template. Collection of bacteria tested contained a lot of bacteria pathogenic for tomato and pepper (including *Xanthomonas* genus) and some other bacteria. Following the protocol described in this article *Xanthomonas vesicatoria* can be identified rapidly and reliably. To date, there is no report of such primers for specific detection of *Xanthomonas vesicatoria*.

**Keywords:** *Xanthomonas vesicatoria*, PCR, primers, detection

#### Úvod

Bakteriální skvrnitost papriky a rajčete se vyskytuje v mnoha zemích po celém světě. Největší ekonomický význam má v oblastech teplého a vlhkého klimatu (Jones et al., 1998). Hlavním příznakem tohoto onemocnění jsou nekrotické léze, vyskytující se na listech, stoncích, plodech a květech (Pohronezny, Volin, 1983).

Bakteriální skvrnitost papriky a rajčete způsobuje poměrně různorodá skupina fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas*. Taxonomická nomenklatura a klasifikace bakterií rodu *Xanthomonas*, které infikují rajčata a papriky, prošla v minulých letech značnými změnami. V současné době jsou tyto patogeny řazeny do čtyř skupin (A, B, C a D) v rámci rodu *Xanthomonas*. Zatímco skupiny A a B jsou celosvětově rozšířeny, xanthomonády ze skupiny C se nacházejí především v USA, Mexiku, Brazílii, Koreji a ve státech na pobřeží Indického oceánu a xanthomonády ze skupiny D se nacházejí na území bývalé Jugoslávie, v Kanadě, Kostarice, USA, Brazílii a v oblastech u Indického oceánu. Uvedené čtyři skupiny byly na základě fyziologických a molekulárně biologických charakteristik klasifikovány jako jednotlivé druhy *Xanthomonas* následovně: *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al. 2006 (skupina A), *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920)

Vauterin et al. 1995 (skupina B), *Xanthomonas perforans* Jones et al. 2006 (skupina C), a *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic 1957) Jones et al. 2006 (skupina D) (Jones et al., 2004).

Vzhledem k potenciálním ekonomickým ztrátám při propuknutí bakteriální skvrnitosti, je důležitá včasná a spolehlivá detekce patogena. Metody jako sklíčková aglutinace, biochemické testy, analýza mastných kyselin, metabolické analýzy, ELISA nebo průtoková cytometrie jsou pro detekci patogena použitelné, ale jsou časově náročné a pracné (Doorn et al., 1999; Chase et al., 1992; Chitarra et al., 2002). Polymerázová řetězová reakce (PCR) však nabízí možnost rychlé, specifické a citlivé detekce určité sekvence DNA a je proto velice vhodná pro detekci patogena v rostlině (Hartung et al., 1993).

V tomto článku prezentujeme analýzu založenou na PCR, kterou lze pomocí specifických primerů detekovat DNA sekvenci typickou pro *Xanthomonas vesicatoria* (skupina B). Tato sekvence se nachází uvnitř genu *atpD*, který je nezbytný pro produkci energie.

## **Materiál a metody**

### Bakteriální kmeny a jejich kultivace

Bakteriální kmeny (Tab. 1.) byly získány z Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG), National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Gent, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), Beaucauze, České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM) a sbírky Výzkumného ústavu rostlinné výroby (CRI) v Praze. Všechny kmeny byly kultivovány na MPAg (masopeptonovém agaru s glukosou: 40g živného agaru č.2, 5,2 g kvasničného autolyzátu, 10 g glukózy, 20 g agaru, doplněno dH<sub>2</sub>O do 1 litru) při 28°C po dobu 1 až 3 dnů.

### Izolace DNA

DNA z čerstvě narostlých bakteriálních kultur byla izolována pomocí komerčně dostupného kitu Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA). Bylo postupováno podle protokolu přiloženého výrobcem.

### Návrh primerů a PCR

Oligonukleotidové primery nazvané XV1F (5' – CAGTCCTCCAGCACCGAAC – 3') a XV1R (5' – TCTCGTCGCGGAAGTACTCA – 3') byly navrženy (syntetizováno Generi-Biotech, ČR) do oblasti genu *atpD* podle sekvence DNA námi získané z *Xanthomonas vesicatoria* (Xv CCM 2102). Očekávaný PCR produkt vykazoval velikost 326 bp. Reakční směs PCR byla připravována do celkového objemu 15 µl v následujícím složení: 7,5 µl 2x PPP MasterMix Combi (Top-Bio, ČR), 4,5 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O, 1 µl templátové DNA a 1 µl každého z primerů (10 pmol). Program PCR se skládal z úvodní denaturace při 94°C trvající 5 minut následované 25 cykly, z nichž každý sestával ze 3 fází: 45 s při 94°C, 45 s při 69°C a 40 s při 72°C. Celý program byl zakončen závěrečnou elongací při 72°C po dobu 10 minut. Po dokončení programu byly vzorky zchlazeny a udržovány při 4°C.

### Elektroforéza

Po PCR byla každá z reakcí smíchána s interkalačním činidlem SYBR Green I (Lonza, USA) a nanášena na 1% agarózový gel. Elektroforéza probíhala 70 minut při 90 V (4 V / cm). Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení od firmy Kodak.

**Tab. 1.** Použité bakteriální kmeny pro testování specifčnosti primerů XV1F a XV1R

Pořadí	Název bakteriálního izolátu uváděný ve sbírce	Sbírka a číslo	Geografický původ	Detekováno primery
1.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 916	Nový Zéland	ANO
2.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 919	Zimbabwe	ANO
3.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 920	Itálie	ANO
4.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 925	Maďarsko	ANO
5.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CCM 2101	Maďarsko	ANO
6.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CFBP 2537	Nový Zéland	ANO
7.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	NCPPB 2595	Brazílie	ANO
8.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 667	Nový Zéland	NE
9.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 668	Cookovy ostrovy	NE
10.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 909	Pobřeží slonoviny	NE
11.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 922	Florida, USA	NE
12.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 931	USA	NE
13.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 933	Brazílie	NE
14.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CCM 2101	Maďarsko	NE
15.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP 1604	Guadeloupe	NE
16.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP 3274	Guadeloupe	NE
17.	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 918	Indie	NE
18.	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 921	Long Island, USA	NE
19.	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 927	Zambie	NE
20.	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 928	USA	NE
21.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	BCCM/LMG 5727	Bulharsko	NE
22.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	BCCM/LMG 7333	Maďarsko	NE
23.	<i>Dickeya</i> sp.	CCM 989		NE
24.	<i>Erwinia amylovora</i>	CCM 1133		NE
25.	<i>Pantoea agglomerans</i>	CCM 2406	Česká republika	NE
26.	<i>Pantoea dispersa</i>	CCM 4414	Česká republika	NE
27.	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	CCM 322	Francie	NE
28.	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	CCM 1008	Dánsko	NE
29.	<i>Pseudomonas corrugata</i>	CRI 8892-85Re	Česká republika	NE
30.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCM 2115	Velká Británie	NE
31.	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	BCCM/LMG 2210	USA	NE
32.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	CRI 186/2	Česká republika	NE
33.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pti</i>	NCPPB 3496	USA	NE
34.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 2/1/99Re	Česká republika	NE
35.	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	BCCM/LMG 2352	Švýcarsko	NE
36.	<i>Rahnella aquatilis</i>	CCM 4086	Česká republika	NE

### Výsledky a diskuse

Primery XV1F (19-mer) a XV1R (20-mer) byly testovány s DNA vyizolovanou z *Xanthomonas vesicatoria*. Podle očekávání se v PCR tvořil produkt o velikosti 326 bp u všech 7 testovaných kmenů *Xanthomonas vesicatoria*. K otestování specifity primerů byl použit soubor bakterií dalších druhů i rodů (Tab. 1). Z nich většina je patogenních pro rajče nebo papriku, nicméně otestovány byly i další bakterie, které se na rajčeti nebo paprice nenacházejí. U žádné z necílových bakterií však nebyl výsledek pozitivní.

Vývoj specifických detekčních primerů byl již publikován pro mnoho fytopatogenních bakterií včetně *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xanthomonas euvesicatoria*, skupina A) (Park et al., 2009). Pomocí dosud publikovaných primerů však nelze spolehlivě detekovat bakterii *Xanthomonas vesicatoria* (skupina B), která se podobně jako *Xanthomonas euvesicatoria* vyskytuje celosvětově.



Dvojice primerů XV1F a XV1R byla navržena do oblasti genu *atpD* podle sekvence DNA získané z *Xanthomonas vesicatoria* (sbírkový kmen *Xv* CCM 2102). Sekvence toho genu je hojně využívána pro fylogenetické analýzy mnoha bakterií včetně bakterií rodu *Xanthomonas* (Young et al., 2008). Odlišnost sekvencí DNA tohoto genu je u různých bakteriálních kmenů dostatečná k navržení specifických primerů.

### **Závěr**

Primery XV1F a XV1R byly navrženy do oblasti genu *atpD* tak, aby byly specifické pro detekci *Xanthomonas vesicatoria*. Jedná se o první primery detekující pouze *Xanthomonas vesicatoria*.

### **Dedikace**

Tato práce byla podporována grantem č. QH71229 Ministerstva zemědělství ČR a grantem č. AV0Z50510513 Grantové agentury AV ČR.

### **Použitá literatura**

- Chase AR, Stall RE, Hodge NC, Jones JB. (1992) Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analyses. *Phytopathology*, 82, 754–9.
- Chitarra LG, Langerak CJ, Bergervoet JHW, van den Bulk RW. (2002) Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flowcytometry. *Cytometry*, 47, 118–26.
- Doorn J, Ojanen-Reuhs T, Hollinger TC, Reuhs BL, Schots A, Boonekamp PM, et al. (1999) Development and application of pathovar-specific monoclonal antibodies that recognize the lipopolysaccharide O antigen and the Type IV fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 4171–80.
- Hartung JS, Daniel JF, Pruvost OP. (1993) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. *Appl Environ Microbiol*, 59, 1143–8.
- Jones JB, Bouzar H, Stall RE, Almira EC, Roberts PD, Bowen BW, Sudberry J, Strickler PM, Chun J. (2000) Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 1211–1219.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol*, 27, 755–762.
- Jones JB, Stall RE, Bouzar H. (1998) Diversity among Xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu Rev Phytopathol*, 36, 41–58.
- Park DS, Shim JS, Kim JS, Lim CK, Shrestha R, Hahn JH, Kim HG. (2009) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on *rhs* family gene sequences. *Microbiological Research*, 164, 36–42.
- Pohronezny K, Volin RB. (1983) The effect of bacterial spot on yield and quality of fresh market tomatoes. *Hort Science*, 18, 69–70.
- Stall RE. (1995) Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. K, K., eds., Pergamon Press, 167–84.
- Young J, Park DC, Shearman H, Fargier E. (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 366 - 377.

**Kontaktní adresa:** Ing. Pavel Beran, Biologické centrum AV ČR, Ústav molekulární biologie rostlin, oddělení rostlinné virologie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, e-mail: [pavel.beran@centrum.cz](mailto:pavel.beran@centrum.cz)



KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I., POUVOVÁ D., BERAN P. (2011): Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete v ČR a spolehlivost detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z rajčat různými diagnostickými technikami. *Úroda – vědecká příloha* 12/2011: 221-224.

## PRŮZKUM BAKTERIÁLNÍHO VADNUTÍ RAJČETE V ČR A SPOLEHLIVOST DETEKCE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* Z RAJČAT RŮZNÝMI DIAGNOSTICKÝMI TECHNIKAMI

**The survey of bacterial canker of tomato in CR and detection reliability of  
*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants using  
various diagnostic techniques**

**Kokošková B.<sup>1</sup>, Mráz I.<sup>2</sup>, Pouvová D.<sup>3</sup>, Beran P.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha - Ruzyně

<sup>2</sup>Biologické centrum AV ČR, České Budějovice

<sup>3</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze

### **Abstrakt**

Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete prováděný v letech 2009-2010 v 22 lokalitách ČR prokázal výskyt choroby celkem v 6 lokalitách Jižní a Střední Moravy a Středních Čech na indeterminantních rajčatech pěstovaných jak ve sklenicích, tak na polích. Celkem ze 113 vzorků rajčat s příznaky choroby se u 68 % vzorků rostlin prokázalo onemocnění. Pomocí IIF byl *C. m.* subsp. *michiganensis* spolehlivě detekován do ředění 1:1000, zatímco pomocí ELISA do ředění 1:100 (nepřímá ELISA a DAS-ELISA) a 1:10 (PTA-ELISA). Nepřímá ELISA pomocí MAbs byla citlivější než PTA-ELISA s PAbs. Optimalizovaná PCR s komerčními i našimi vlastními primery byly srovnatelné. Patogen byl spolehlivěji detekován z bází, stonků a řapíků než z listů nemocných rostlin rajčat.

**Klíčová slova:** bakteriální vadnutí rajčete, detekce, ELISA, IF, PCR

### **Abstract**

Based on the surveys of disease in 22 localities over 2009-2010 vegetation seasons, *C. m.* subsp. *michiganensis* was found in 6 localities of the South and the Central Moravia and the Central Bohemia in total on indeterminate tomatoes planted in greenhouses and fields. In total, 113 symptomatic tomato samples were tested, from which 68 % were positive samples. Using IIF *Cmm* was reliably detected to dilution 1:1000, but using ELISA to dilution 1:100 (Indirect ELISA and DAS-ELISA) and 1:10 (PTA-ELISA). Indirect ELISA using MAbs was more sensitive than PTA-ELISA using PAbs. Optimized PCR with commercial and our laboratory-generated primers were comparable. The pathogen was more reliably detected from bases, stems and petioles than from leaves of diseased tomato plants.

**Key words:** bacterial canker of tomato, detection, ELISA, IF, PCR

### **Úvod**

Bakteriální vadnutí rajčete, jehož původcem je karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) je významnou chorobou způsobující vážné hospodářské škody v oblastech produkčního pěstování rajčat v celém regionu EPPO včetně České republiky (Gleason et al. 1993; EPPO/CABI 1997).

Patogen se specializuje na kolonizaci cévních svazků rajčete. Prvotním příznakem onemocnění je unilaterální vadnutí jednotlivých lístků zpeřených listů, které je zpočátku reverzibilní, později ireverzibilní. Následně dochází k vadnutí, usychání a hnědnutí celých listů, stonků a nakonec celé rostliny. Při napadení starších rostlin způsobuje bakterie nekrózy listů a skvrnitost plodů (Kokošková 2008).

Bakterie *Cmm* přežívá dlouhodobě na infikovaných rostlinných zbytcích v půdě a šíří se i kontaminovaným nářadím a nádobami (Gleason et al. 1993). Za hlavní zdroj nákazy je však

považováno infikované osivo a sazenice (OEPP/EPPO 2005). Proto semena a sazenice podléhají fytosanitární kontrole a jejich zásilky musí obsahovat osvědčení o zdravotním stavu. Inspekční metody zahrnující detekci patogena z rostlin a semen jsou většinou založeny na imunochemických, molekulárních a biologických testech (OEPP/EPPO 2005; Dreier et al., 1995; Kokoskova et al., 2010).

Cílem práce byl průzkum bakteriálního vadnutí rajčete v České republice a posouzení spolehlivosti detekčních metod používaných pro určení původce choroby.

### **Materiál a metody**

Sledování choroby bylo prováděno v hlavních produkčních oblastech indeterminálních rajčat pěstovaných ve skleníkových i polních podmínkách v celé ČR. Příznaky napadení byly hodnoceny podle čtyřbodové stupnice (viz mapa). Vzorky byly připraveny z různých částí příznakových rostlin jako báze, stonků, řapík (příčné řezy) a list (okrajové nekrózy) v ředěních 1:10 až 1:10.000 (viz graf). Detekce *Cmm* byla prováděna různými diagnostickými technikami podle diagnostických protokolů uvedených firm.

První z použitých technik byla optimalizovaná PCR (polymerázová řetězová reakce) s komerčními (Dreier et al. 1995) a vlastními primery (Kokoskova et al. 2010). Druhou technikou byla nepřímá imunofluorescence (IIF) s polyklonálními protilátkami (PABs) od firmy Neogen Europe Ltd. (UK). Dalšími metodami byly PTA-ELISA (nepřímá enzymatická imunosorpční analýza) s PABs od firmy Neogen Europe Ltd. (UK), nepřímá ELISA s monoklonálními protilátkami (MABs) a DAS-ELISA (dvojitá sendvičová ELISA) s PABs od firmy Agdia Inc. (USA).

### **Výsledky a diskuse**

Průzkum bakteriálního vadnutí rajčete prováděný v letech 2009-2010 v 22 lokalitách ČR prokázal výskyt choroby celkem v 6 lokalitách Jižní a Střední Moravy a Středních Čech na indeterminálních rajčatech pěstovaných jak ve sklenících, tak na polích. Celkem bylo testováno 113 podezřelých vzorků rajčat, z nichž 68 % se prokázalo jako vzorky pozitivní.

Pomocí IIF bylo *Cmm* spolehlivě detekováno do ředění 1:1000 a pomocí ELISA do ředění 1:100 (nepřímá ELISA a DAS-ELISA) a 1:10 (PTA-ELISA). Všechny tři typy ELISA technik jsou doporučovány pro prověření příznakových vzorků rajčat na přítomnost *Cmm*. Na základě našich výsledků však nepřímá ELISA pomocí MAB byla citlivější než PTA-ELISA s PAB. IIF byla cca 10x citlivější než ELISA techniky, což odpovídá literárním údajům (Alvarez 2004). Optimalizovaná PCR s komerčními (Dreier et al. 1995) i našimi vlastními primery pro PCR z genu tomatinázy bakterie *Cmm* (Kokoskova et al. 2010) byly srovnatelné.

Patogen byl spolehlivěji detekován z bází, stonků a řapíků než z listů nemocných rostlin rajčat. Mohlo to být způsobeno tím, že analýzy infikovaných rostlin byly prováděny na konci vegetační sezóny a u některých rostlin byly k dispozici už jen seschlé listy. Bakterie *Cmm* se nacházely ještě v hojně míře ve vaskulárních svazcích, ale nikoliv v listových pletivech.

### **Závěr**

Bez ohledu na detekční techniku pro rutinní rozборы rostlinných vzorků rajčat podezřelých na přítomnost *Cmm*, které se provádějí v laboratořích Státní rostlinolékařské správy, doporučujeme analyzovat cévní svazky, v nichž patogen přežívá mnohem déle než v listech.

Mapa: Rozšíření bakteriálního vadnutí rajčete v České republice v letech 2009-2010



Práce byla podporována MZE ČR, projektem QH71229.

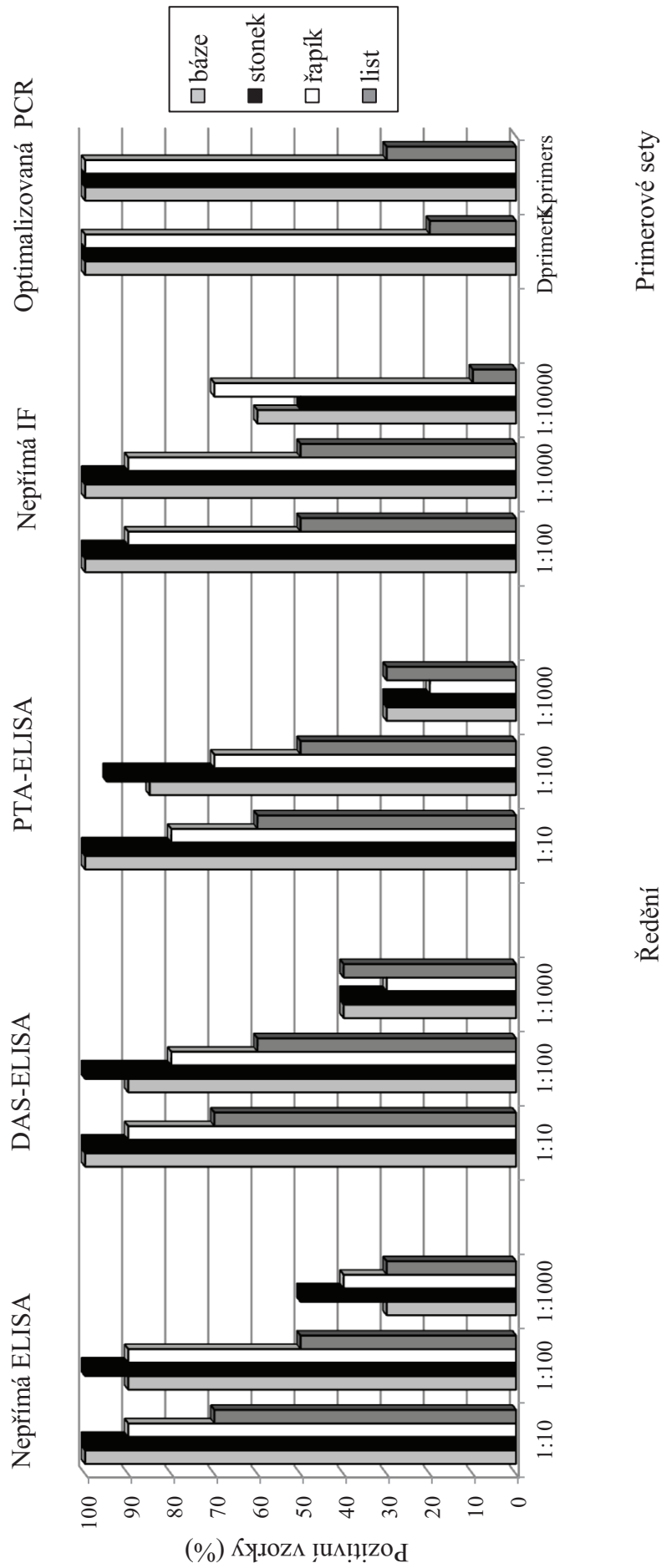
#### Použitá literatura

- Alvarez, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.
- Dreier, J., Bermpohl, A., Eichenlaub, R.. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462-468.
- EPPO/CABI: Quarantine pests for Europe, 2nd. Ed. (J.M.Smith, D.G. Mc Namara, P.R. Scott, M. Holderness Eds), pp. 981- 984. CAB International, Wallingford (UK) 1997.
- Gleason, M.L., Gitaitis, R.D., Ricker, M.D. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Pl. Dis.* 77: 1069-1075.
- Kokošková, B. 2008. bakteriální choroby plodové zeleniny. *Zahradnictví*, 11: 20-21.
- Kokošková, B., Mráz, I., Fousek, J. 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiol.* 55: 239-244.
- OEPP/EPPO. 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *OEPP/EPPO Bull.* 35: 275-283.

#### Kontaktní adresa:

Ing. Blanka Kokošková, CSc.  
Laboratoř diagnostiky a epidemiologie mikroorganismů  
Odbor rostlinolékařství  
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507  
16106 Praha 6  
e-mail: bkokoskova@vurv.cz

Detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* z rostlin rajčat



MRÁZ I., KOKOŠKOVÁ B., BERAN P. (2011): Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, IF and PCR with commercial and own primers. *Acta Horticulturae* 914: 57-60.

# Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from Tomato Plants and Seeds Using ELISA, IF and PCR with Commercial and Own Primers

I. Mraz and P. Beran  
Department of Plant Virology  
Institute of Plant Molecular Biology  
Biological Centre of Academy of Sciences  
of the Czech Republic  
370 05 České Budějovice  
Czech Republic

B. Kokoskova<sup>a</sup>  
Diagnostic and Epidemiological Laboratory  
of Microorganisms  
Plant Medicine Division  
Crop Research Institute  
161 06 Prague 6  
Czech Republic

**Keywords:** bacterial canker of tomato, detection, ELISA, IF, PCR

## Abstract

Bacterial canker of tomato, caused by bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) is a well-known disease resulting in serious losses to both greenhouse and field tomato crops in areas where tomatoes are planted. *Cmm* was detected and isolated from various parts of strongly infected plants of 10 indeterminate tomato cultivars. The most sensitive technique was optimized PCR with Dreier's and laboratory-generated PCR primers from the *Cmm* tomatinase gene. All samples taken from base, stem and petiole of tomato plants were positive in PCR with both primer pairs, and also using IIF and PTA-ELISA in contrast to the samples taken from leaves. Using IIF and PTA-ELISA with PABs of Neogen Europe Ltd. (UK), *Cmm* was reliably detected to dilution 1:1000 and 1:100 respectively. Seeds of 4 indeterminate and 4 determinate cultivars were consecutively artificially infected by the mixture of the two reference *Cmm* strains (BCCM/LMG 7333 and 5727) soaking 48 hours in inoculum ( $10^8$  CFU/ml). Isolation of bacterial DNA from crushed seeds was performed by DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol with subsequent PCR with two primer sets (Dreier's and own pairs) about 24 hours, one week and one month after inoculation. Detection of *Cmm* by PCR with both commercial and our own primer sets was comparable.

## INTRODUCTION

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), the causal agent of bacterial canker of tomato, is a quarantine bacterium causing economically significant losses to both greenhouse and field tomato crops. The pathogen is present in all main cultivation areas of tomato, including the EPPO region (EPPO/CABI, 1997).

*Cmm* can survive for several months on various greenhouse structures and implements, but survival of *Cmm* in soil for long periods of time is possible only when the bacteria are associated with plant debris (Gleason et al., 1993). Seed transmission appears to be very low, but latently infected young plants are considered very important for spread of *Cmm* (OEPP/EPPO, 2005). A lot of control measures are used to avoid the disease, but the most reliable of these is using certified seed or transplants that have been tested to be free from pathogen (Jahr et al., 1999).

Detection methods for *Cmm* include disease diagnosis and identification of the pathogen usually based on a combination of SA (slide agglutination), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), IF (immunofluorescence), PCR (polymerase chain reaction) and bioassay on tomato (OEPP/EPPO, 2005). The PCR assay provides a rapid test for detection of *Cmm* in infected plant tissue (Dreier et al., 1995; Santos et al., 1997; Kokošková et al., 2010).

The study was focused on comparison of the reliability of immunochemical and

<sup>a</sup> bkokoskova@vurv.cz



molecular techniques for detection of *Cmm* from infected plants of indeterminate tomato cultivars and from artificially infected tomato seeds.

## MATERIALS AND METHODS

All plant samples originated from symptomatic plants of 10 indeterminate tomato cultivars analysed at the end of vegetation season (Table 1). Using selected diagnostic methods, the bases, stems, petioles (cross sections) and leaves (marginal necroses) of diseased tomato plants were tested according to the manufacturer's protocol. For ELISA and IF tests plant samples were prepared in dilution 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup> and 1:10<sup>3</sup>, and 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup> and 1:10<sup>4</sup> respectively. Isolation of bacterial DNA for PCR from crushed fresh tissues of plants and from seeds was performed by DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Detection of *Cmm* was conducted by PTA-ELISA (plate-trapped antigen ELISA) and IIF (indirect IF). Commercial PABs from Neogen Europe Ltd. (UK) were used for both immunochemical tests according to the manufacturer's instructions. Positive/negative reactions in PTA-ELISA were recorded with an ELISA reader. The ELISA absorbance threshold level was 0.2 at A<sub>405</sub>. IF slides were observed under a light microscope fitted for epifluorescence at 1000× magnification using a mercury lamp and a suitable filter system (Kokošková et al., 2010).

PCR was performed with a Mini Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). Primer sets *Cmm*IF/*Cmm*1R designed in our laboratory which give a 500 bp long product and primer pairs *Cmm*5/*Cmm*6 (Dreier et al., 1995) which give a 609 bp long product, were used in PCR. The reaction mix and the PCR protocol were performed according to Kokošková et al. (2010). Amplified PCR products (1 µl) were mixed with 1 µl of loading buffer with the SybrGreen stain (Lonza) and run on 1% agarose gel.

Detection of *Cmm* from seeds was carried out just by means of PCR. Seeds of four indeterminate ('Perun', 'Sláva Porýní', 'Orfea F1', 'Pedro F1') and four determinate ('Diana', 'Minigold', 'Karla', 'Denár') tomato cultivars were artificially infected by soaking for 48 h in inoculum (10<sup>8</sup> cfu/ml) of the two reference *Cmm* strains (BCCM/LMG 7333 and BCCM/LMG 5727). After periods of 24 h, one week and one month *Cmm* detection was attempted.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Detection of *Cmm* from Plants

Detection of *Cmm* was conducted from strongly infected plants of 10 indeterminate tomato cultivars, two plants were tested from each cultivar. Altogether 120 analyses were carried out by molecular (PCR) and immunochemical (PTA-ELISA and IIF) tests including screening of bases, stems, petioles and leaves of infected plants.

Pathogen was reliably detected by both immunochemical tests in all 10 tested cultivars. Using PTA-ELISA and IIF, *Cmm* was reliably detected to dilution 1:10<sup>2</sup> and 1:10<sup>3</sup>, respectively (Fig. 1). Sensitivity of PTA-ELISA reached 1:10<sup>3</sup> (53.3% of positive samples), however sensitivity of IIF was 10-fold higher, and reached 1:10<sup>4</sup> (56.6% of positive samples) (Fig. 1). Pathogen was also detected in all tomato samples by means of PTA-ELISA and IIF in dilution of 1:1 and 1:10, respectively (not shown).

In our experiments, the most sensitive technique was optimized PCR with Dreier's et al. (1995) and our laboratory-generated PCR primers (Kokošková et al., 2010). All samples taken from base, stem and petiole of tomato plants were positive in PCR comparably with both primer pairs (Table 1).

Using all three diagnostic tests, *Cmm* was reliably detected from bases, stems and petioles of infected tomato plants, but the bacterium was not detected in leaves, except in one case (10% of positive samples), when using PCR. Marginal necroses of leaflets that were analysed might not be of pathogenic origin or *Cmm* was not present there or its low concentration was under detection limit of used methods and hence the bacterium from leaves was not detected.



### Detection of *Cmm* from Seed

Pathogen was detected in infected seeds of all 8 tomato cultivars after 24 hours, one week and one month from the date of inoculation using PCR with both primer sets, optimized commercial (Dreier et al., 1995) and our laboratory-generated PCR primers from the *Cmm* tomatinase gene (Kokošková et al., 2010) (data not shown).

When PCR was performed with seeds crushed in crushing plate and with distilled water added, results were negative in all cases. This confirmed our previous experience, that a DNA isolation kit is necessary for well prepared samples.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Ministry of Agriculture of CR, grant No. QH71229 and by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the CR, grant No. AV0Z50510513.

### Literature Cited

- Dreier, J., Bempohl, A. and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85:462-468.
- EPPO/CABI. 1997. p.981-984. In: J.M Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott and M. Holderness (eds.), *Quarantine pests for Europe*, 2<sup>nd</sup> ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Gleason, M.L., Gitaitis, R.D. and Ricker, M.D. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Pl. Dis.* 77:1069-1075.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J. and Eichenlaub, R. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and its host plants. *Envir. Microbiol.* 1(2):113-118.
- Kokošková, B., Mráz, I. and Fousek, J. 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiol.* 55:239-244.
- OEPP/EPPO. 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *OEPP/EPPO Bull.* 35:275-283.
- Santos, M.S., Cruz, L., Norskov, P. and Rasmussen, O.F. 1997. Rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Sci. Technol.* 25:581-584.

## Tables

Table 1. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in strongly infected indeterminate tomato cultivars using PCR by own and commercial primers.

Sample no./cultivar	Plant part							
	Base		Stem		Petiole		Leaf	
	<i>Cmm</i> primers							
	1F,R <sup>a</sup>	5,6 <sup>b</sup>	1F,R	5,6	1F,R	5,6	1F,R	5,6
1 Radana	+	+	+	+	++	+(+)	-	-
2 Pedro F1	+	+	++	+(+)	++	+(+)	-	-
3 Rop	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
4 Brutus	+++	+++	++	+(+)	+	+	-	-
5 Citrina	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
6 Robs	++	+(+)	+++	+++	+++	+++	-	-
7 Dafne	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
8 Akron	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
9 Duo	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
10 Zlatava	+	+	+	+	+	+	-	-
Positive samples (%)	100	100	100	100	100	100	10	10

<sup>a</sup> own primers (Kokoskova et al., 2010).

<sup>b</sup> commercial primers (Dreier et al., 1995).

Intensity of band: - negative (no band), + weakly positive band, ++ moderately intensive band, +++ strongly intensive band.

## Figures

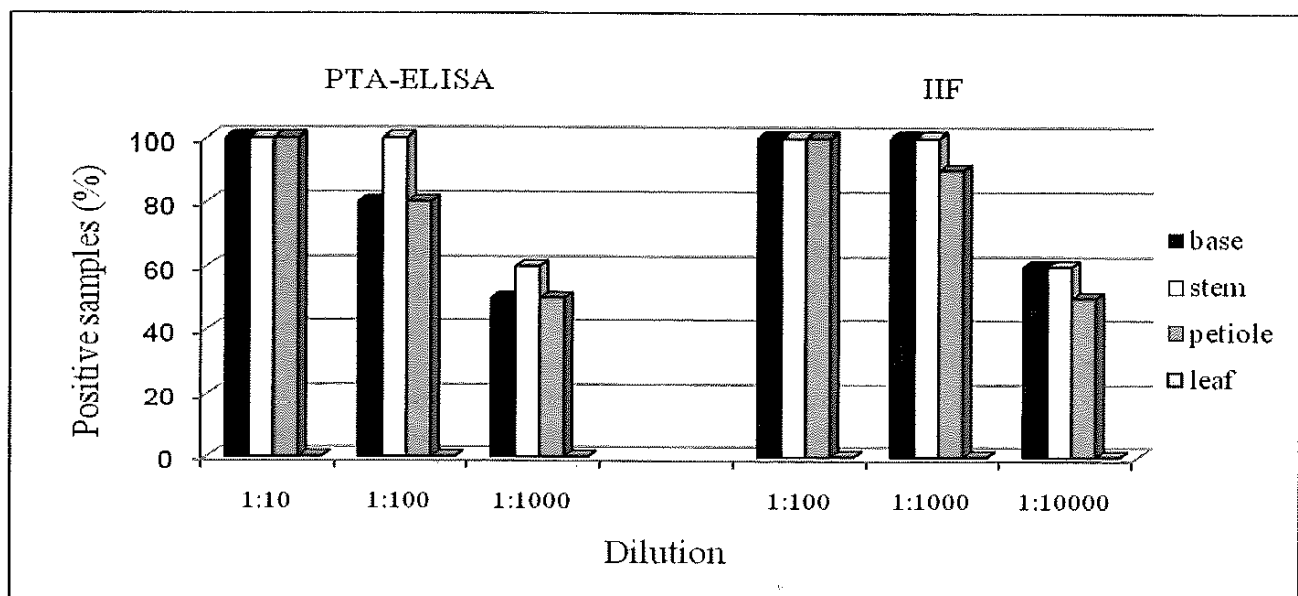


Fig. 1. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in different parts of strongly infected indeterminate tomato cultivars using PTA-ELISA and IIF techniques.

BERAN P., MRÁZ I.: Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. Odesláno k opublikování do časopisu *Crop Protection*.

## **Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria***

**Pavel Beran<sup>a,\*</sup> and Ivan Mráz<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Faculty of Agriculture, Biotechnological Centre, University of South Bohemia, Studentska 13, 370 05 České Budejovice, Czech Republic

<sup>b</sup>Department of Plant Virology, Institute of Plant Molecular Biology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic

**Corresponding author:** Pavel Beran, Faculty of Agriculture, Biotechnological Centre, University of South Bohemia, Studentska 13, 370 05 České Budejovice, Czech Republic, Tel: +420 387 775 521, e-mail: [pavel.beran@centrum.cz](mailto:pavel.beran@centrum.cz)

## **Abstract**

Development of the PCR method for specific detection of *Xanthomonas vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of tomato and pepper, is presented in this study. Primer pair XV1F and XV1R was designed based on DNA sequence of *atpD* gene and tested using collection of various bacteria pathogens mainly for tomato and pepper. After optimization of the PCR conditions, the 365 bp long fragment was only produced for *Xanthomonas vesicatoria* samples. Therefore, described primers and protocol allow rapid and species-specific detection of *Xanthomonas vesicatoria*, which has not been reported so far.

**Keywords:** bacterial spot, tomato, pepper, atpD, xanthomonads

## 1. Introduction

Gram-negative bacterium *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters and Swings 1995 VP is the causal agent of bacterial spot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and pepper (*Capsicum annuum* L.). The disease causes considerable losses in productivity and fruit quality especially in areas of warmer and humid climate (Al-Dahmani et al. 2003; Jones et al. 1998). There are four phenotypically and genotypically distinct *Xanthomonas* species causing the bacterial spot of tomato and pepper - *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al. 2006 (group A, which contains most of the strains previously known as *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* or *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*), *Xanthomonas vesicatoria* (group B), *Xanthomonas perforans* Jones et al. 2006 (group C) and *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic 1957) Jones et al. 2006 (group D). While strains belonging to groups A, B and D are pathogenic for tomato and pepper, group C strains are pathogenic for tomato only. Also geographic distribution varies among the groups. Groups A and B are distributed worldwide, whereas distribution (and resulting economical importance) of groups C and D seems to be limited (Jones et al. 2004).

Considering the economical losses of tomato and pepper production caused by *Xanthomonas vesicatoria* and limited options of the pathogen suppression in later stages of the disease, rapid and accurate detection of the pathogen is vital for the tomato and pepper production (Al-Dahmani et al. 2003). Biochemical tests, serological assays, metabolic profiling, immunological techniques and flow cytometry are all used for identification of the pathogen. These methods are however laborious, time-consuming and results are sometimes inaccurate (Park et al. 2009). Although some PCR primer sequences for detection of the bacterial spot on tomato and pepper have been published (Leite et al. 1994; Moretti et al. 2009; Obradovic et al. 2004; Park et al. 2009), none is capable of accurate *Xanthomonas vesicatoria* (group B) detection. In this study we present sequences of a new primer pair for

specific detection of *Xanthomonas vesicatoria* (group B) designed from partial DNA sequences of the catalytic subunit of the ATP synthase (*atpD*) gene. *AtpD* is a well characterized housekeeping gene with high degree of sequence conservation (Christensen and Olsen, 1998) which makes it suitable for design of specific primers. Also this gene is frequently used for MLSA – the multilocus sequence analysis (Fargier et al. 2011).

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Bacterial strains*

A total of 45 strains (Table 1) used in this study were obtained from Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms – Bacteria Collection, Gent (BCCM/LMG), French Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Beaucouze Cedex (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes - CFBP), Czech Collection of Microorganisms, Brno (CCM), Crop Research Institute Collection, Czech Republic, Prague - Ruzyne (CRI) and National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP). All strains were cultured on MPAg medium (meat-peptone agar with glucose: 40 g of nutrient agar no. 2, 5.2 g of yeast extract, 10 g of glucose, 20 g of agarose, added to 1 l of distilled H<sub>2</sub>O, pH adjusted to 7.2) at 27°C for 24 – 48 h.

### *2.2 Isolation of total DNA*

Freshly grown bacterial strains were harvested with a bacteriological loop. Extraction of total DNA was performed by Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA) according to the manufacturer protocol.

### *2.3 DNA sequences*

Partial sequences of *atpD* gene were obtained from *Xanthomonas vesicatoria* type strain BCCM/LMG 911 (GenBank ID: JQ359021) and *Xanthomonas euvesicatoria* strains BCCM/LMG 667 (GenBank ID: JQ359022), BCCM/LMG 922 (GenBank ID: JQ359023), BCCM/LMG 926 (GenBank ID: JQ359024) according to Fargier et al. (2011). Sequencing of the gene was performed on ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies, USA). Additional 37 partial sequences of *atpD* gene were obtained from GenBank (IDs: AB622347, EF673145, EU015130, EU015149, EU015160, EU015171, EU015180, EU015190, EU015194, EU015199, EU015200, EU015201, EU015206, EU015211, EU015212, EU015213, EU015214, EU015215, GU322722, GU322742, GU322752, GU322766, GU322767, GU322768, GU322779, GU322788, GU322798, GU322799, GU322800, GU322801, GU322802, GU322803, GU322804, GU322805, HM048893, HM048895, HM048896).

#### 2.4 Primer design

Partial DNA sequences of *atpD* gene were used for *in silico* (Oligo 7 software, Molecular Biology Insights, Inc., USA) primer design. Theoretical specificity of primers was assessed by nucleotide BLAST (NCBI) analysis. Primers with the theoretically best specificity, and also with the lowest possible presence of secondary structures, were synthesized by Geni Biotech s.r.o. (Czech Republic).

#### 2.5 PCR and primer optimization

The composition of reaction was following: 10 µl of PPP MasterMix Combi (Top-Bio s.r.o., Czech Republic), 7 µl of PCR water, 1 µl of each primer (10 pmol), 1 µl of template DNA. Annealing temperature was optimized using gradient PCR. Adequate number of cycles was determined manually. All reactions were performed on MJ Mini – Personal Thermal



Cycler (BioRad, USA), GeneQ Thermal Cycler (Bioer) and PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research). The amplified PCR products were analyzed using 1% agarose gel (Promega, USA) electrophoresis in 1x TBE buffer at 90 V ( $4 \text{ V cm}^{-1}$ ) for 1 h and visualized using SYBR Green I (Lonza, Switzerland) staining under UV illumination.

### 3. Results and discussion

The primers XV1F (5' – CAGTCCTCCAGCACCGAAC – 3') and XV1R (5' – TCTCGTCGCGGAAGTACTCA – 3') were designed based on alignment of *atpD* gene sequences. Their theoretical specificity was tested by BLAST analysis, which showed 100% homology of primers to *Xanthomonas vesicatoria* sequences. Similarity to the other relative sequences even from *Xanthomonas* genus was below 95%. Actual specificity of the primers was tested by PCR with bacterial samples from various collections of microorganisms (Table 1). Standard PCR conditions (30 cycles, each consisting of 45 s at 94°C, 45 s at 58°C, and 40 s at 72°C, with initial 5 minutes denaturation at 94°C and final extension of 10 minutes at 72°C) were not discriminatory enough and 365 bp long fragment was produced in most of the tested samples. After optimization of PCR conditions, however, only *Xanthomonas vesicatoria* samples were identified as positives (365 bp products). All other, even closely related bacteria including *Xanthomonas euvesicatoria* (targeted DNA sequence differs in one nucleotide on 3' end of each primer) were negative.

Best specificity of the primers was achieved with the following PCR program: 25 cycles, each consisting of 45 s at 94°C, 45 s at 69°C, and 40 s at 72°C, with initial 5 minutes denaturation at 94°C and final extension of 10 minutes at 72°C. To infer reproducibility of the PCR (Park et al. 2009) three different PCR cyclers from three different manufacturers were used with consistent results.

Several publications reporting sequences of PCR primers for identification of *Xanthomonas* pathogenic for tomato and pepper are available (Leite et al. 1994; Moretti et al. 2009; Obradovic et al. 2004; Park et al. 2009). All of these primers are however used for detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. Primers presented in this article are the first *Xanthomonas vesicatoria* specific primers published. Furthermore, the primers also enable previously difficult (Stall et al. 1994) differentiation between *Xanthomonas euvesicatoria* and *Xanthomonas vesicatoria* species.

In conclusion, the primers XV1F and XV1R presented in this study are useful for simple, inexpensive, rapid and species-specific detection of *Xanthomonas vesicatoria*.

### **Acknowledgements**

This study received financial support from Grant agency of University of South Bohemia (GA JU) grants: 064/2010/Z and 011/2011/Z, from Grant Agency of the Czech Republic (GA CR) grant: 521/08/H042, from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant: QH71229 and from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant: AV0Z50510513

### **References**

- Al-Dahmani, J.H., Abbasi, P.A., Miller, S.A., Hoitink, H.A.J., 2003. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse conditions. *Plant. Dis.* 87, 913-919.
- Christensen, H., Olsen, J.E., 1998. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of *atpD* encoding the  $\beta$  subunit of ATP synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* 161, 89-96.
- Fargier, E., Sauxa, M.F.L, Manceaua, C., 2011. A multilocus sequence analysis of

- Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 156–165.
- Jones, J.B., Stall, R.E., Bouzar, H., 1998. Diversity among *Xanthomonads* pathogenic on pepper and tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 41–58.
- Jones, J., Lacy, G., Bouzar, H., Stall, R., Schaad, N., 2004. Reclassification of the *xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 755-762.
- Leite, R.P. Jr., Minsavage GV, Bonas, U., Stall, R.E., 1994. Detection and Identification of Phytopathogenic *Xanthomonas* Strains by Amplification of DNA Sequences Related to the *hrp* Genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microb.* 60, 1068-1077.
- Moretti, C., Amatulli, M.T., Buonauro, R., 2009. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 466–471.
- Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J., Arsenijevic, M., Jones, J., Minsavage, G., Wang, J., 2004. Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *Eur. J. Plant. Pathol.* 110, 285-292.
- Park, D.S., Shim, J.K., Kim, J.S., Lim, C.K., Shrestha, R., Hahn, J.H., Kim, H.G., 2009. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on *rhs* family gene sequences. *Microbiol. Res.* 164, 36 - 42.
- Stall, R.E., Beaulieu, C., Egel, D., Hodge, N.C., Leite, R.P., Minsavage, G.V., Bouzar, H., Jones, J.B., Alvarez, A.M., Benedict, A.A., 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 47–53.

**Table 1** List of bacterial strains used to test specificity of XV1F and XV1R primers

Name of bacteria listed in collection	Collection and number	Detected by primers
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 911	YES
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 916	YES
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 919	YES
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 920	YES
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 923	YES
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 925	YES
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG 934	YES
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CCM 2835	NO
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	CRI 12/5/98	NO
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	BCCM/LMG 5727	NO
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	BCCM/LMG 7333	NO
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	BCCM/LMG 3697	NO
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPPB 3467	NO
<i>Curtobacterium albidum</i>	CCM 2296	NO
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	BCCM/LMG 3651	NO
<i>Dickeya</i> sp.	CCM 989	NO
<i>Erwinia amylovora</i>	NCPPB 696	NO
<i>Pantoea agglomerans</i>	CCM 2406	NO
<i>Pantoea dispersa</i>	CCM 4414	NO
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	BCCM/LMG 2396	NO
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	BCCM/LMG 2404	NO
<i>Pseudomonas corrugata</i>	CRI 8892-85Re	NO
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCM 2115	NO
<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	BCCM/LMG 2210	NO
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	CRI 186/2	NO
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	NCPPB 3496	NO
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	BCCM/LMG 1247	NO
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI 2/1/99Re	NO
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	BCCM/LMG 2352	NO
<i>Rahnella aquatilis</i>	CCM 4086	NO
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NCPPB 2505	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 667	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 668	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 909	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 922	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 926	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 931	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 933	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP 1604	NO
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CFBP 3274	NO
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 918	NO
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 921	NO
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 927	NO
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG 928	NO
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	BCCM/LMG 7192	NO

BCCM/LMG = Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms – Bacteria Collection; CFBP = French Collection of Plant Pathogenic Bacteria; CCM = Czech Collection of Microorganisms; CRI = Crop Research Institute Collection; NCPPB = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria

MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B., POUVOVÁ D.: Comparison of reliability of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* detection from various tomato plant parts using the several immunochemical and molecular techniques. Odesláno k opublikování do časopisu *African Journal of Biotechnology*.

**Comparison of reliability of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* detection from various tomato plant parts using the several immunochemical and molecular techniques**

**Ivan Mráz<sup>1</sup>, Pavel Beran<sup>2\*</sup>, Blanka Kokošková<sup>3</sup> and Dagmar Pouvová<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Plant Molecular Biology, Department of Plant Virology, České Budějovice, Czech Republic

<sup>2</sup>University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, Department of Plant Production and Agroecology, České Budějovice, Czech Republic

<sup>3</sup>Crop Research Institute, Plant Medicine Division, Laboratory of Diagnostics and Epidemiology of Microorganisms, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Plant Protection, Prague, Czech Republic

**\*Corresponding author:** Pavel Beran, University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, Department of Plant Production and Agroecology, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Tel.: +420723289647; Fax: +420385310356

e-mail: pavel.beran@centrum.cz

***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* was detected and isolated from various plant parts of 10 strongly infected indeterminate tomato varieties grown in field crops. The pathogen was more reliably detected from bases, stems and petioles than from leaves of the diseased tomato plants. Using IIF with PAbs *Cmm* was detected in dilutions up to 1:10<sup>4</sup>, while using ELISA (Indirect ELISA with MAbs**

and DAS-ELISA with PABs) *Cmm* was detected in dilutions up to 1:10<sup>3</sup>. Both ELISA techniques were comparable. The most sensitive technique was the optimized PCR with Dreier's and laboratory-generated PCR primers from the *Cmm* tomatinase gene. Using PCR with both primer pairs, *Cmm* was reliably detected from bases, stems and petioles, while using ELISA and IIF pathogen was reliably detected only from bases and stems of the diseased tomato plants. In PCR with DNA isolated from leaves *Cmm* was detected in 20 % samples only, while using ELISA and IF in 70-30 % leaf samples corresponding to dilutions 1:10 – 1:10<sup>3</sup> and 50-30 % leaf samples corresponding to dilutions 1:10<sup>2</sup> – 1:10<sup>4</sup> respectively.

**Key words:** DNA isolation, PCR, ELISA, immunofluorescence, sequencing.

## INTRODUCTION

The phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (1984) (*Cmm*), causing bacterial canker of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), is the most serious bacterial tomato pathogen in all main cultivation areas worldwide. The European Plant Protection Organisation even considers it a quarantine organism (EPPO/CABI, 1997). Plant diseases caused by bacteria such as *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. (1995), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge 1920) Dye (1978) represent important agricultural constraints in tropical and subtropical regions (Moguel-Salazar et al., 2011). The pathogen can survive for several months on various greenhouse structures and implements, in contaminated plant debris in soil or on the soil surface (Gleason et al., 1991) as well as in seeds (Ftayeh et al., 2004) causing serious losses to both greenhouse and field tomato crops (EPPO/CABI, 1997).

Infection of the host plant (Figures 1 and 2) usually occurs via wounds, followed by invasion of the xylem vessels causing a systemic vascular disease (Wallis, 1977; Dreier et al., 1995). Seed transmission appears to be limited, but the pathogen can be present as a contaminant on the seed surface (OEPP/EPPO, 2005). Latently infected transplants are considered very important for transmission of the *Cmm* infection (Chang et al., 1991).

Despite the importance of *Cmm* as a debilitating crop pathogen with a significant economic impact on agricultural production, little is known about its ecology in/on tomato plants in modern propagation and production practices. This lack of knowledge is partly attributable to the difficulty to genetically manipulate this Gram-positive bacterium (Xu et al., 2010).

An important step in controlling the disease depends on the fast and exact detection of the pathogen. Rapid and accurate methods are continually sought capable to simultaneously identify and differentiate the pathogen (Kaneshiro et al., 2006).

Nucleic acid based tests offer greater sensitivity, specificity, reliability and may be quicker than many of the conventional methods used for detection of plant-pathogenic bacteria in different plant hosts and environments. With the development of polymerase chain reaction (PCR), and especially real-time PCR much higher sensitivity is achieved, improving the accuracy of pathogen detection and identification (Vincelli, Tisserat, 2008). The PCR assay thus provides a rapid test for identification of *Cmm* in infected plant tissue (Dreier et al., 1995).

In general, this study was intended to monitor the occurrence of quarantine bacterium *Cmm* in some promising indeterminate tomato varieties grown in the Czech Republic. Particular focus was aimed upon the comparison of detection reliability of the pathogen from various plant parts of symptomatic tomato plants using several immunochemical (double-antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay - DAS-ELISA, Indirect



ELISA and indirect immunofluorescence - IIF) and molecular (PCR, DNA sequencing) techniques.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant samples**

All plant samples originated from symptomatic plants of 10 indeterminate tomato varieties (Table 1) grown in field conditions from which two plants with typical symptoms of bacterial wilt per one variety were analysed. Selected diagnostic methods were used for detection of *Cmm* from the bases, stems, petioles (cross sections) and leaves (marginal necroses) of the diseased tomato plants.

### **Bacterial strains**

Suspected *Cmm* isolates obtained from plant tissue samples were grown on nutrient beef extract agar and incubated at 25°C (Schaad et al., 2001). The identity of all isolates suspected as *Cmm* was confirmed using immunochemical (ELISA and IF) and molecular (PCR) tests.

### **ELISA and IF tests**

For ELISA and IF tests plant samples were prepared in dilutions from 1:10 to 1:10<sup>3</sup> and from 1:10<sup>2</sup> to 1:10<sup>4</sup> respectively. Detection of *Cmm* was conducted by DAS-ELISA, Indirect ELISA and IIF (indirect IF). Commercial MAbs (monoclonal antibodies, Indirect ELISA) and PABs (polyclonal antibodies, DAS-ELISA) from Agdia Inc. (USA) and PABs (IIF) from NeogenEurope Ltd. (UK) were used for immunochemical tests according to the manufacturer's instructions. Positive/negative reactions in ELISA were recorded with an ELISA reader. The ELISA absorbance threshold level was 0.2 at A<sub>405</sub>. IF slides were

observed under a light microscope fitted for epifluorescence at 1000x magnification using a mercury lamp and a suitable filter system (Kokošková et al., 2010).

### **Isolation of bacterial DNA with subsequent PCR**

Isolation of bacterial DNA for PCR from plant tissue was performed by DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol.

PCR was performed with a Mini Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). Primer set Cmm1F/Cmm1R (Cmm1F– 5' GAC AAG CAC CTC TAC ACC TGG 3' and Cmm1R – 5' TTG ATC CCT GAC TTC AGC GT 3') designed in our laboratory (GenBank accession no. AM711867) which give a 500 bp long product and primer pair Cmm5/Cmm6 (Dreier et al., 1995) which give a 614 bp long product, were used in PCR. Both primer sets were synthesized by Generi Biotech (Czech Republic). The PCR reaction was performed according to Kokošková et al. (2010). Amplified PCR products (1 µl) were mixed with 1 µl of loading buffer with the SYBR Green I stain (Lonza) and run on 1 % agarose gel.

### **Sequencing**

Consequently DNA samples isolated from the base of all ten tomato plant varieties (Table 1) were sequenced. Sequencing was performed on the ABI PRISM 3130xl automatic sequencing machine using DNA Sequencing Kit (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, Version 3.1.) from Applied Biosystem, Warrington, UK according to the manufacturer's protocol. The acquired sequences were compared with the mentioned *Cmm* sequences in GeneBank (NCBI) database.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The detection of *Cmm* was conducted from symptomatic plants of 10 varieties of indeterminate tomatoes (Table 1), where tests were performed on two plants from each

variety. A total of 200 analyses were carried out by immunochemical (DAS-ELISA, Indirect ELISA and IIF) (Tables 1-3) and molecular (PCR) (Table 4) tests including screening of bases, stems, petioles and leaves of the investigated plants.

### **Bacteriological analyses of plant tissue samples**

Performing bacteriological analyses of plant tissue samples from different parts of symptomatic tomato plants, *Cmm* suspicious isolates were obtained from all 10 tomato varieties. The identity of all isolates was confirmed using immunochemical (ELISA and IF) and molecular (PCR) tests (results not shown).

### **Immunochemical methods**

The pathogen was reliably detected in at least one analysed plant part (from base, stem, petiole, leaf) in all 10 tested varieties using any of the three immunochemical tests (DAS-ELISA, Indirect ELISA and IIF). In general, *Cmm* was more reliably detected from bases and stems (100 % positive samples) of the infected tomato plants than from petioles (90 % positive samples) and leaves (70-50 %). In bases and stems, *Cmm* was reliably detected in dilution 1:10 (100 % positive samples) using DAS-ELISA and Indirect ELISA, which were comparable (Tables 1 and 2). However, using IIF, *Cmm* was reliably detected in dilutions up to 1:10<sup>3</sup> (100 % positive samples) in bases and stems (Table 3). Regardless of the plant organ, sensitivity of ELISA techniques reached value 1:10<sup>3</sup> (30-40 % positive samples in DAS-ELISA and 30-50 % positive samples in Indirect ELISA), while the sensitivity of IIF reached the value of 1:10<sup>4</sup> (10-70 % positive samples) (Figure 3). IF techniques are commonly sensitive up to concentrations of 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> CFU/ml, which is 10-100-fold more sensitive than ELISA (Janse and Kokošková, 2009) and our results were in accordance with literature data.

Gleason et al. (1993) stated that sensitivity of commercial antibodies (Agdia, Inc., Elkhart, IN) for ELISA reached a detection limit of  $10^3$  -  $10^4$  CFU/ml. Nario et al. (2001) reported results where DAS-ELISA using the biotin - avidin system showed a detection limit of  $10^3$  CFU/ml for *Cmm* from tomato field samples.

## **PCR**

In our experiments, except for the detection of *Cmm* from leaves, the most sensitive technique was PCR with Dreier's (Dreier et al., 1995) and laboratory-generated PCR primers targeting the *Cmm* tomatinase gene (Kokošková et al., 2010). All samples taken from bases, stems and petioles of the symptomatic tomato plants were positive when compared by PCR with both primer pairs (Table 4, Figure 3). Sensitivity of the PCR method used in our tests corresponds to other studies focused on detection of phytopathogenic bacteria (Luo et al., 2008).

A number of specific PCR primers for the detection of *Cmm* has been described in the literature (Dreier et al., 1995; Santos et al., 1997). Unfortunately, false positives and false negatives are still to be anticipated when using immunodiagnostic tests as well as PCR assays (Kaneshiro and Alvarez, 2001).

## **Comparison of immunochemical and PCR methods**

In PCR with DNA isolated from leaves, *Cmm* was detected in variety 1 (Ateron) and 9 (SU 86/08) only (Table 4). Of all the ten tested varieties, using DAS-ELISA and Indirect ELISA, *Cmm* was detected in leaves of 7 varieties in dilution 1:10, 6 varieties in dilution 1:10<sup>2</sup> and also in 4 varieties in dilutions 1:10<sup>3</sup>, and in leaves of 7 varieties in dilution 1:10, 5 varieties in dilution 1:10<sup>2</sup> and also 3 varieties in dilution 1:10<sup>3</sup>, respectively (Tables 1 and 2). Using IIF, *Cmm* was detected in leaves of 5 varieties in dilutions 1:10<sup>2</sup> and 1:10<sup>3</sup> and also in 1 variety in dilution 1:10<sup>4</sup> (Table 3).

### **Reliability of *Cmm* detection from different parts of symptomatic tomato plants**

The pathogen was more reliably detected from bases, stems and petioles than from leaves of the diseased tomato plants (Figure 3). This could be caused by the fact that the bacteriological analysis of the diseased tomato plants were carried out at the end of the vegetation period and some tomato plants had already partially or totally shrivelled leaves. *Cmm* bacteria were still abundant in vascular bundles of the analysed plant samples, but not longer in the leaf tissues. Another possibility is that the concentration of pathogen in leaves was too low for detection by the used techniques.

The lower number of *Cmm* positive samples from leaves using PCR in contrast to the immunochemical methods (Figure 3) could be caused by an inhibition of PCR by an excess amount of host DNA isolated along with the *Cmm* DNA (Opel et al., 2010).

### **Sequencing**

No differences were found among DNA sequences of the ten *Cmm* samples isolated from bases of the tomato plants. The DNA sequences were queried in the GenBank database (BLAST, NCBI) where only *Cmm* sequences were found as a result. These results confirmed the presence of *Cmm* bacteria in all ten tested tomato plant varieties (results not shown).

Based on our results from routine analyses of plant tomato samples with suspected infection of the causal agent of bacterial canker of tomato in diagnostic laboratories, we recommend that the tissue samples from vascular bundles be used rather than leaves as *Cmm* bacteria seem to be capable of surviving longer there and the detection of the pathogen is therefore more probable as compared to samples from other plant parts.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant No. QH71229, Grant Agency of University of South Bohemia, grant No. 064/2010/Z and by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant No. AV0Z50510513.

## REFERENCES

- Alvarez AM (2004). Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.
- Chang RJ, Ries SM, Pataky JK (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81: 1276-1281.
- Davis MJ, Gillaspie Jr. AG, Vidaver AK, Harris RW (1984). *Clavibacter*, a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 107-117.
- Dreier J, Bempohl A, Eichenlaub R (1995). Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462-468.
- EPPO/CABI (1997). Quarantine pests for Europe, 2nd. ed. (J.M. Smith, D.G. Mc Namara, P.R. Scott, M. Holderness Eds), pp. 981- 984. CAB International, Wallingford (UK).
- Fatmi M, Schaad NW (1988). Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* 78: 121-126.
- Ftayeh R, Mavridis A, Rudolph K (2004). Überleben des Erregers der bakteriellen Tomatenwelke, *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, im Boden bei

unterschiedlichen Bedingungen. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fuer Land - und Forstwirtschaft 396: 348.

Gitaitis RD, Beaver RW, Voloudakis AE (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Dis. 5: 834-838.

Gleason ML, Braun EJ, Carlton WM, Peterson RH (1991). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. Phytopathology 81: 1519-1523.

Gleason ML, Gitaitis RD, Ricker MD (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. Plant Dis. 77: 1069-1075.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by using the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88: 7276-7280.

Janse JD, Kokošková B (2009). Indirect immunofluorescence microscopy for the detection and identification of plant pathogenic bacteria (in particular for *Ralstonia solanacearum*), in: Burns, R. (Ed.), Plant Pathology. Techniques and Protocols. Scottish Agricultural Science Agency, Diagnostics and Molecular Biology Section, Edinburg, UK, pp. 89-100.

Kaneshiro WS, Alvarez AM (2001). Specificity of PCR and ELISA assays for hypovirulent and avirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 91: 46.

Kaneshiro WS, Mizumoto CY, Alvarez AM (2006). Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. Eur. J. Plant Pathol. 116: 45-56.

- Kokošková B, Mráz I, Fousek J (2010). Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiol.* 55: 239-244.
- Kůdela V, Novacky A, Fucikovsky L (2002). *Rostlinolékařská bakteriologie*. Academia Praha, 347 pp. (In Czech).
- Luo LX, Walters C, Bolkan H, Liu XL, Li JQ (2008). Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathol.* 57: 332-337.
- Moguel-Salazar F, Brito-Argáez L, Díaz-Brito M, Islas-Flores I (2011). A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: Antimicrobial peptides from *Capsicum* sp. *Afr. J. Biotech.* 10: 19918-19928.
- Mullis K (1987). Process for amplifying nucleic acid sequences. U.S. Patent No. 4683202.
- Nario K, Fumihiro Y, Takahiro K, Yuji N (2001). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the biotin-avidin system. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu* 47: 9-12.
- OEPP/EPPO (2005). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *OEPP/EPPO Bulletin* 35: 275-283.
- Opel KL, Chung D, McCord BR (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J. Forensic Sci.* 55: 25-33.
- Pánková I, Kokošková B (2002). Sensitivity and specificity of monoclonal antibody Mn-Cs1 for detection and determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato. *Plant Prot. Sci.* 38: 117-124.
- Santos MS, Cruz L, Norskov P, Rasmussen OF (1997). A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Sci. Tech.* 25: 581–584.



- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Ed.), The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA: 218-234.
- Schaad NW, Sule S, van Vuurde JW, Vrugink H, Alvarez AM, Benedict AA, de Wael L, van Laere O (1990). Serology, in: Klement, F., Rudolf, K., Sands, D.C. (Eds.), Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 153-190.
- Strider DL (1969). Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*, a literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station, Technical Bulletin No. 193, 110 pp.
- Vincelli P, Tisserat N (2008). Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. Plant Dis. 92: 660-669.
- Wallis FM (1977). Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. Physiol. Plant Pathol. 11: 333–342.
- Xu X, Miller SA, Baysal-Gurel F, Gartemann KH, Eichenlaub R, Rajashekara G (2010). Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. Appl. Environ. Microbiol. 76 : 3978–3988.

**Table 1.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in different parts of symptomatic plants of indeterminate tomato varieties using DAS-ELISA.

Sample/Variety	DAS-ELISA											
	Base			Stem			Petiole			Leaf		
	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>
1 Ateron	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
2 Spencer	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
3 Rooz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4 Tastier	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
5 Stupické	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
6 Corfu F1	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
7 Perun	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
8 Herodes	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9 SU 86/08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 Radana	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Positive samples (%)	100	80	40	100	90	40	90	80	30	70	60	40

DAS-ELISA: Absorbance<sub>405</sub> level: (-) negative ( $\leq 20$ ); (+) positive ( $\geq 0.21$ ); polyclonal antibody from Agdia Inc. (USA).

**Table 2.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in different parts of symptomatic plants of indeterminate tomato varieties using indirect ELISA.

Sample/Variety	Indirect ELISA											
	Base			Stem			Petiole			Leaf		
	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>
1 Ateron	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
2 Spencer	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
3 Rooz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4 Tastier	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 Stupické	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
6 Corfu F1	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
7 Perun	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8 Herodes	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9 SU 86/08	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
10 Radana	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Positive samples (%)	100	80	30	100	90	50	90	90	40	70	50	30

Indirect ELISA: Absorbance<sub>405</sub> level: (-) negative ( $\leq 20$ ); (+) positive ( $\geq 0.21$ ); monoclonal antibody from Agdia Inc. (USA).

**Table 3.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in different parts of symptomatic plants of indeterminate tomato varieties using indirect IF.

Sample/Variety	Indirect IF											
	Base			Stem			Petiole			Leaf		
	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>	1:10 <sup>2</sup>	1:10 <sup>3</sup>	1:10 <sup>4</sup>
1 Ateron	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2 Spencer	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
3 Rooz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4 Tastier	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5 Stupické	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
6 Corfu F1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7 Perun	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
8 Herodes	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9 SU 86/08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 Radana	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Positive samples (%)	100	100	60	100	100	50	90	90	70	50	50	10

Indirect IF: Number of fluorescent cells in socket: (-) negative (none); (+) positive ( $\geq 1$  cell); polyclonal antibody (FLUORISCAN) from NeogenEurope Ltd. (UK).

**Table 4.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from symptomatic plants of indeterminate tomato varieties using PCR by own (Cmm1F,R) and commercial (Cmm 5,6) primers.

Sample No./ Variety		Plant part							
		base		stem		petiole		leaf	
		Cmm primers							
		1F,R <sup>a</sup>	5,6 <sup>b</sup>	1F,R	5,6	1F,R	5,6	1F,R	5,6
1	Ateron	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Spencer	+	+	+	+	+	+	-	-
3	Rooz	+	+	+	+	+	+	-	-
4	Tastier	+	+	+	+	+	+	-	-
5	Stupické	+	+	+	+	+	+	-	-
6	Corfu F1	+	+	+	+	+	+	-	-
7	Perun	+	+	+	+	+	+	-	-
8	Herodes	+	+	+	+	+	+	-	-
9	SU 86/08	+	+	+	+	+	+	+	+
10	Radana	+	+	+	+	+	+	-	-
Positive samples (%)		100	100	100	100	100	100	20	20

<sup>a</sup>own primers (Kokoskova et al., 2010)

<sup>b</sup>commercial primers (Dreier et al., 1995)

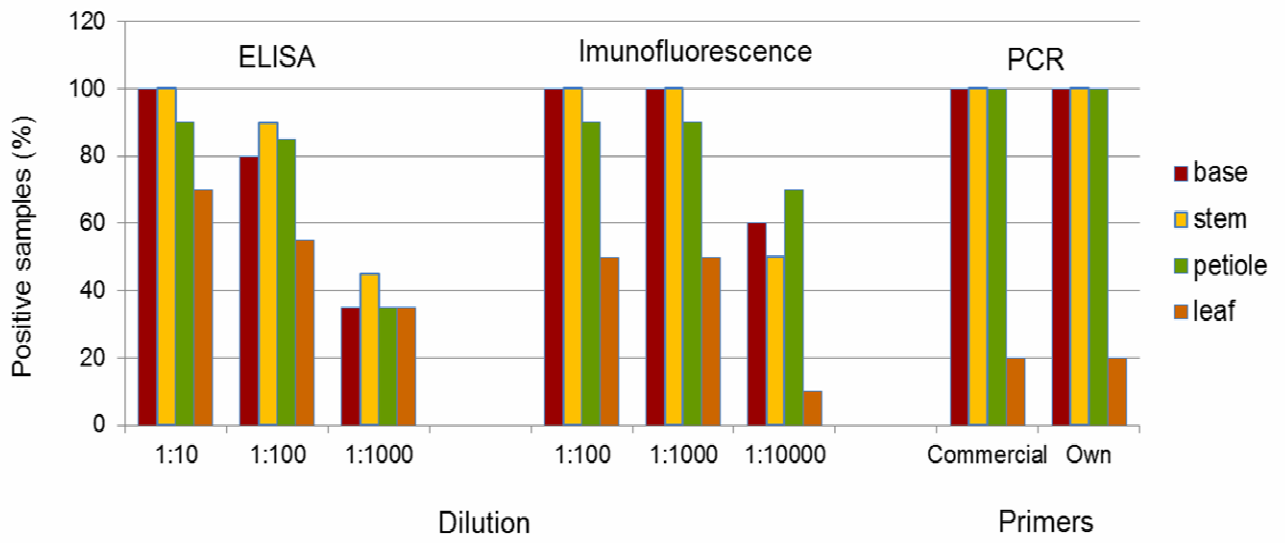
- : negative reaction (no band); + : positive reaction



**Figure 1.** Tomato plants in glasshouse infected with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (Middle Moravia, photo J. Fousek).



**Figure 2.** Longitudinal section of tomato plant stem infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (Photo J. Fousek).



**Figure 3.** Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in various tomato plant parts.



MRÁZ I., BERAN P., KOKOŠKOVÁ B.: Detection of quarantine bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in old tomato plants and seeds by the selected molecular techniques. Odesláno k opublicování do časopisu *Crop Protection*.

Detection of quarantine bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp.  
*michiganensis* in old tomato plants and seeds by the selected  
molecular techniques

I. Mráz<sup>a</sup>, P. Beran<sup>a\*</sup>, B. Kokošková<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Department of Plant Virology, Institute of Plant Molecular Biology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic, e-mail: mraz@umbr.cas.cz; pavel.beran@centrum.cz*

<sup>b</sup>*Diagnostic and Epidemiological Laboratory of Microorganisms, Plant Medicine Division, Drnovská 507, Crop Research Institute, 161 06 Prague 6, Czech Republic, e-mail:*

*bkokoskova@vurv.cz*

\*Corresponding author. Tel.: +420723289647; Fax: +420385310356.

*E-mail address: pavel.beran@centrum.cz (Pavel Beran)*

**Abstract**

PCR with two *Cmm* primer sets (own and Dreier's primers) was used for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) from dried, four years old indeterminate tomato plants from glasshouse (variety Barbados, Central Moravia) and for detection of *Cmm* in 26 months old tomato seeds artificially infected (four indeterminate and five determinate varieties) by *Cmm* LMG 7333 and 5727 strains. Five dried, four years old tomato plants were positive in PCR with both primer sets. Infected tomato seeds were tested by PCR with two primer sets after 24 hours, 7 days, 3, 20 and 26 months after inoculation. In tomato seeds, the pathogen was detected with primers Cmm 5,6 (Dreier's primers) in tomato varieties artificially infected by more virulent *Cmm* LMG 7333 strain, but not in seeds infected by less virulent strain *Cmm* LMG 5727. Using primer pair Cmm1F, R (own primers)

*Cmm* was detected regardless the strain of pathogen used for infection of the tomato seeds. This artificially infected tomato seeds and seeds of variety Admiro (glasshouse, Central Bohemia) naturally infected by *Cmm* were grown in greenhouse. About 25 these three months old tomato plants of one variety (isolated DNA) were tested by PCR with both primer sets for the presence of *Cmm*. All samples of these tomato plants gave negative results. Dot blot hybridization with probes labeled with digoxigenin was used as an additional method for confirmation of PCR results. Obtained results were in accordance with results from PCR for both primer sets. Presence of *Cmm* in naturally infected seeds of tomato plants variety Admiro was confirmed by sequencing. We verified that causal agent of the bacterial tomato canker can survive for several months or years in infected dry tomato plants and tomato seeds. Our results confirmed that *Cmm* transmission from seeds into tomato plant is not too frequent.

*Keywords:* *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; polymerase chain reaction; dot blot hybridization; sequencing; tomato seed; dry tomato plant

## **1. Introduction**

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. (*Cmm*) causes bacterial canker of tomato (Strider, 1969; Davis et al., 1984) which is one of the most frequent bacterial disease of tomato causing substantial economic losses to both greenhouse and field crops worldwide. This quarantine bacterium is present in most tomato production areas, including the EPPO region (Gleason et al., 1993; EPPO/CABI, 1997). Bacterial canker of tomato is a vascular disease, so bacteria spread throughout the plant via the xylem vessels and gradually infect the whole plant (Rothwell, 1968).

In general, *Cmm* is transmitted by contaminated seeds (Fatmi and Schaad, 1988; Tsiantos, 1987) or transplants (Gitaitis, 1990; Gitaitis et al., 1991), and therefore, there is great demand

for a sensitive and specific diagnostic method that could reliably detect this important pathogen. Seed transmission appears to be limited, but the pathogen can be present as a contaminant on the seed surface (OEPP/EPPO, 2005). Latently infected transplants are considered very important for transmission of the *Cmm* infection.

*Cmm* can survive for several months on various greenhouse structures and implements and/or in contaminated plant debris in soil and/or on the soil surface (Gleason et al., 1991). A lot of control measures are used to avoid the disease, but the most reliable of them is to use certified seed or transplants that have been tested and are pathogen free (Jahr et al., 1999). Chang et al. (1991) and Mansfeld-Giese (1997) also mentioned that it is necessary to certify that seed and cuttings of tomato are free from *Cmm*.

An important step in control of the disease depends on the fast and specific detection of the pathogen. The methods employed in the bio-control of pathogens have to be fast, sensitive and specific. In contrast to classical microbiological detection of *Cmm* based on the use of selective or semi-selective media (Fatmi and Schaad, 1988; Gitaitis et al., 1991; Gleason et al., 1993) or on species determination and plant assays for virulence, using immunological assays with monoclonal antibodies and ELISA is much faster (Gartemann et al., 2003).

Nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction (PCR) offer alternatives for rapid, highly sensitive, and specific identification of pathogenic bacteria (Henson and French, 1993; Schneider et al., 1993; Firrao and Locci, 1994). The PCR assay provides a rapid test for identification of *Cmm* strains in infected plant tissue (Dreier et al., 1995). A number of specific PCR primers for the detection of *Cmm* have been described in the literature (Dreier et al., 1995; Santos et al., 1997). Unfortunately, false positives and false negatives are still to be anticipated when using immunodiagnostic tests as well as PCR assays (Kaneshiro and Alvarez, 2001).

New molecular methods as real-time PCR (Salm and Geider, 2004) and PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) (Jock et al., 2002) can also be used. Real-time PCR has many important advantages over classical PCR, the main being the ability to quantify the amount of target organism and the second is the increase of specificity when internal fluorescent probes are used (Schaad and Frederick, 2002).

This study was focused on PCR detection of *Cmm* in dry, four years old naturally infected indeterminate tomato varieties from glasshouse, *Cmm* detection in 26 months old artificially and naturally infected seeds of some tomato varieties and on PCR detection of *Cmm* in tomato plants growing from this infected tomato seed.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Dried, four years old naturally infected tomato plant samples and 26 months old artificially infected tomato seed by Cmm*

PCR method with two *Cmm* primer sets was used for detection of pathogen from five dried, four years old indeterminate naturally infected tomato plants of variety Barbados from glasshouse (Central Moravia) and for detection of *Cmm* in 26 months old artificially infected tomato seeds originating from four indeterminate (Perun, Sláva Porýní, Orfea F1, Pedro F1) and five determinate (Diana, Minigold, Karla, Pavlína, Denár) varieties soaked for 48 hours in *Cmm* LMG 7333 and *Cmm* LMG 5727 strains inoculum ( $10^9$  CFU/ml). Infected tomato seeds were tested by PCR with two primer sets after 24 hours, 7 days, 3, 20 and 26 months after inoculation. This tomato seed artificially infected by *Cmm* (positive control) and naturally infected seed of tomato variety Admiro (glasshouse, Central Bohemia) were used also for the cultivation of tomato plants in greenhouse. These tomato varieties were when three months old tested (isolated DNA) by PCR with both primer sets for the presence of *Cmm*.

## 2.2. Bacteria

Bacterial strains *Cmm* LMG 7333 and *Cmm* LMG 5727 (BCCM/LMG Bacteria Collection, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium) used for artificial inoculation of tomato seed were grown on nutrient meat-peptone medium (Schaad et al., 2001) and incubated in thermostat at 25°C.

## 2.3. Isolation of bacterial DNA with subsequent PCR

Isolation of genomic DNA from bacterial cultures was performed by Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega), DNA isolation from dry tomato plant tissue and artificially infected tomato seeds was performed by DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) with subsequent purifying by Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according to the manufacturer's protocol.

PCR was performed with a Mini Cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). Primer set *Cmm*1F/*Cmm*1R (*Cmm*1F– 5' GAC AAG CAC CTC TAC ACC TGG 3' and *Cmm*1R – 5' TTG ATC CCT GAC TTC AGC GT 3') designed in our laboratory which give a 500 bp long product (Kokošková et al. 2010) and primer pair *Cmm*5/*Cmm*6 (Dreier et al. 1995) which give a 614 bp long product, were used in PCR. Both primer sets were synthesized by Generi Biotech (Czech Republic). The reaction mix contained 10.0 µl of 2x PPP Master Mix (75 mmol/l TrisHCl, pH 8.8; 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.01% Tween 20; 2.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; dNTP 200 µmol/l each; 2.5 U Taq Purple DNA Polymerase and stabilization additives) obtained from TopBio (Czech Republic); 0.5 µl of each primer (20 pmol/µl); 1.0 µl of DNA template and 8.0 µl double-distilled H<sub>2</sub>O. PCR reaction with primers *Cmm*1F, R started with the DNA denaturation step (95°C, 5 min) and continued in 25 cycles (30 cycles with primers *Cmm*5 and *Cmm*6) consisting of 94°C for 60 s, 63°C for 10 s (55°C for 90 s with primers *Cmm*5 and *Cmm*6) and extension 72°C, 9 s (72°C, 60 s with primers *Cmm*5 and *Cmm*6). The final

extension proceeded for 15 min at 72°C. Amplified PCR products (1 µl) were mixed with 1 µl of loading buffer with the SYBR Green I stain (Lonza) and run on 1 % agarose gel.

#### 2.4. Dot blot hybridization

Dot blot hybridization was used as an additional method for confirmation of PCR results. Four non-radioactive hybridization probes (Kessler, 1992) of the PCR products of 500 respective 614 bp (DNA from more virulent *Cmm* LMG 7333 and DNA from more weakly virulent *Cmm* LMG 5727 strain amplified by own and Dreier's primers) were prepared by labeling these amplicons using Klenow enzyme and the digoxigenin (DIG) DNA Labeling Kit (Roche) with dUTP<sup>11</sup>-DIG according to the manufacturer's protocol. Dot blot hybridization was performed on positively charged nylon membrane (Roche) and a Biospot blotter DB-1000 (BIOS Corporation, New Haven, CT) was used in dot blot following the standard protocol from Roche. DNA isolated from four artificially infected indeterminate (Perun, Sláva Porýní, Orfea F1, Pedro F1) and five determinate (Diana, Minigold, Karla, Pavlína, Denár) varieties by DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) was tested in dot blot using these four probes.

#### 2.5. Sequencing

Consequently, to verify *Cmm* presence in naturally infected seed of tomato variety Admiro used as positive control, the isolated DNA was sequenced. Sequencing was performed on the ABI PRISM 3130 xl automatic sequencing machine using DNA Sequencing Kit (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, Version 3.1.) from Applied Biosystem, Warrington, UK according to the manufacturer's protocol. The acquired sequences were compared to published *Cmm* sequences in GeneBank (NCBI) database (Fig.4).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Dried, four years old naturally infected tomato samples

PCR method with primer set Cmm1F/Cmm1R designed in our laboratory (Kokošková et al., 2010) and primer pair Cmm5/Cmm6 (Dreier et al., 1995) was used for detection of *Cmm* in five dried, four years old tomato varieties Barbados from glasshouse (Central Moravia). All tomato samples tested by PCR gave positive results with Cmm1F, R and Cmm5, 6 primers (Fig. 2). We have therefore verified that the causal agent of bacterial canker of tomato can survive for several months or even years in dry naturally infected tomato plants.

### 3.2. Detection of *Cmm* in tomato seed

PCR method with both primer sets was also used for detection of *Cmm* in artificially infected tomato seed with strongly virulent reference *Cmm* LMG 7333 and weakly virulent *Cmm* LMG 5727 strains (Fig. 1) of four varieties of indeterminate (Perun, Sláva Porýní, Orfea F1, Pedro F1) and five varieties of determinate (Diana, Minigold, Karla, Pavlína, Denár) tomato plants after 24 hours, 7 days, 3, 20 and 26 months after inoculation.

Pathogen was detected with primers *Cmm* 5, 6 (Fig. 3A) in seed of tomato varieties artificially infected by more virulent *Cmm* LMG 7333 strain in contrast to tomato seed varieties infected by less virulent *Cmm* LMG 5727 strain (Fig. 1). These results are in accordance with published data showing that PCR primers distinguish between virulent and avirulent *Cmm* strains (Dreier et al., 1995). Primer pair Cmm1F, R detected *Cmm* indiscriminately on *Cmm* strain used for infection of tomato seed (Fig. 3B). We have thus proved that *Cmm* can survive not only for several months but also for several years in artificially infected tomato seed.

If infected seeds or plant samples were only crushed in crushing plate after which distilled water was added and this mixture was subsequently used for PCR, results were negative in all cases which confirms our previous experience that for PCR the isolate mini kit is necessary for proper preparation of the plant material sample (Kokošková et al., 2007).



### 3.3. PCR of plants growing from artificially infected tomato seeds

Artificially infected tomato seeds were also used for planting tomato plants in greenhouse. Plant samples (DNA isolated by DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) from these then three months old tomatoes were tested by PCR with both primer sets for *Cmm* detection. All samples of these tomato plants gave negative results. We suppose that the planted tomatoes can be restored to health during the growing in greenhouse, or the concentration of pathogen in plants was too low for detection by PCR. Our results confirmed that *Cmm* transmission from seed into tomato plant is not too frequent which is in contrast to the opinion of Tsiantos (1987) who mentioned that *Cmm* infected seed is the major source for outbreaks of pathogen infections in agriculture. Sensitivity of PCR method in our tests corresponds to other studies focused on detection of phytopathogenic bacteria (Luo et al., 2008).

A number of specific PCR primers for the detection of *Cmm* have been described in the literature (Dreier et al., 1995; Santos et al., 1997). Unfortunately, false positives and false negatives are still to be anticipated when using immunodiagnostic tests as well as PCR assays (Kaneshiro and Alvarez, 2001).

### 3.4. Dot blot hybridization

Results obtained in dot blot hybridization with probes labeled by digoxigenin (Kessler, 1992) used as additional method for the confirmation of PCR results were in accordance with the PCR results for both primer sets for *Cmm* detection.

### 3.5. Sequencing

Sequencing was used as an additional method to PCR and dot blot for verification of the presence of the *Cmm* pathogen in case of naturally infected tomato seed of variety Admiro. DNA obtained from this variety was sequenced on the ABI PRISM 3130 xl automatic

sequencing machine. The acquired DNA sequences were queried in the GenBank database (BLAST, NCBI) where only *Cmm* sequences were found as a result, which confirmed the presence of *Cmm* bacteria in seed of this tomato variety (Fig. 4).

### 3.6. Conclusions

We verified that the causal agent of bacterial canker of tomato can survive for several months and years in naturally infected dry tomato plants and tomato seed. We also confirmed that transmission of the *Cmm* pathogen from seed into tomato plant is not too frequent. For well prepared sample from plant material for PCR the isolate mini kit is necessary. Sensitivity of the PCR method in our tests corresponds to other studies focused on detection of phytopathogenic bacteria (Luo et al., 2008). Primers Cmm 5,6 detected pathogen in seed of tomato varieties infected by more virulent *Cmm* LMG 7333 strain in contrast to seed of varieties infected by less virulent strain *Cmm* LMG 5727. Primer pair Cmm1F, R detected *Cmm* pathogen indiscriminately on *Cmm* strain used for infection of tomato seed.

### Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant No. QH71229 and by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant No. AV0Z50510513.

### References

Chang, R. J., Ries, S. M., Pataky, J. K., 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81, 1276-1281.

- Davis, M. J., Gillaspie, Jr., A. G., Vidaver, A. K., Harris, R.W., 1984. *Clavibacter*, a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 107-117.
- Dreier, J., BERPohl, A., Eichenlaub, R., 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 85, 462-468.
- EPPO/CABI, 1997. Quarantine pests for Europe, in: Smith, J.M., Mc Namara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M. (Eds), 2nd. ed. CAB International, Wallingford (UK), pp. 981- 984.
- Fatmi, M., Schaad, N. W., 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. Phytopathology 78, 121-126.
- Firrao, G., Locci, R., 1994. Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol. 40, 148-151.
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., Burger, A., 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. J. Biotechnol. 106, 179-191.
- Gitaitis, R. D., 1990. Induction of a hypersensitivelike reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Dis. 74, 58-60.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., Voloudakis, A. E., 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. Plant Dis. 5, 834-838.
- Gleason, M. L., Braun, E. J., Carlton, W. M., Peterson, R. H., 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. Phytopathology 81, 1519-1523.

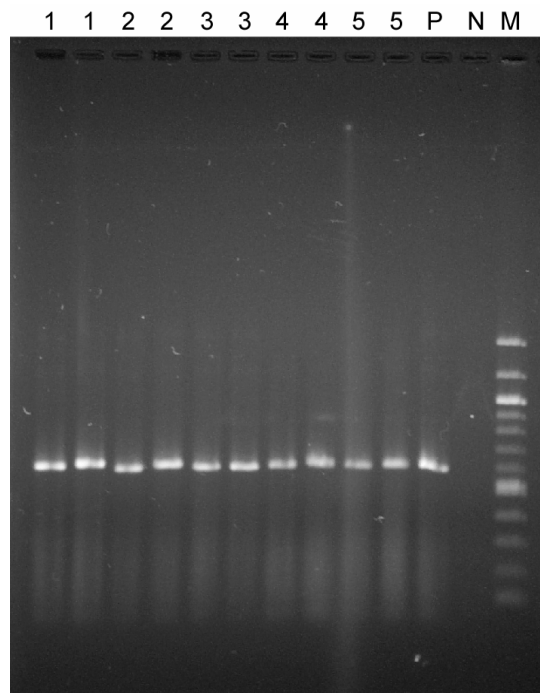
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., Ricker, M. D., 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Dis.* 77, 1069-1075.
- Henson, J. M., French, R., 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 81-109.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., Eichenlaub, R. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and its host plants. *Envir. Microbiol.* 1, 113-118.
- Jock, S., Donat, V., López, M. M., Bazzi, C., Geider, K., 2002. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Envir. Microbiol.* 4, 106-114.
- Kaneshiro, W. S., Alvarez, A. M., 2001. Specificity of PCR and ELISA assays for hypovirulent and avirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 91, 46.
- Kessler, C., 1992. Nonradioactive labeling and detection of biomolecules. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 436 pp.
- Kokošková, B., Mráz, I., Fousek, J., 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiol.* 55, 239-244.
- Kokošková, B., Mráz, I., Hýblová, J., 2007. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for reliable detection of *Erwinia amylovora*. *Folia Microbiol.* 52, 175-182.
- Luo, L. X., Walters, C., Bolkan, H., Liu, X. L., Li, J. Q., 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathol.* 57, 332-337.

- Mansfeld-Giese, K., 1997. Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Potato Res. 40, 229–235.
- OEPP/EPPO, 2005. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. OEPP/EPPO Bulletin 35, 275-283.
- Rothwell, A., 1968. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen. Rhod. Agric. J. 1871, 75-78.
- Salm, H., Geider, K., 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. Plant Path. 53, 602-610.
- Santos, M. S., Cruz, L., Norskov, P., Rasmussen, O. F., 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. Seed Sci. Tech. 25, 581–584.
- Schaad, N. W., Frederick, R. D., 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. Can. J. Plant Pathol. 24, 250–258.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Ed.). The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA, 218-234.
- Schneider, B. J., Zhao, J., Orser, C. S., 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by DNA amplification. FEMS Microbiol. Let. 190, 207-212.
- Strider, D. L., 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*, a literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station, Technical Bulletin No. 193, 110 pp.
- Tsiantos, J., 1987. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. J. Phytopathol. 119, 142–146.

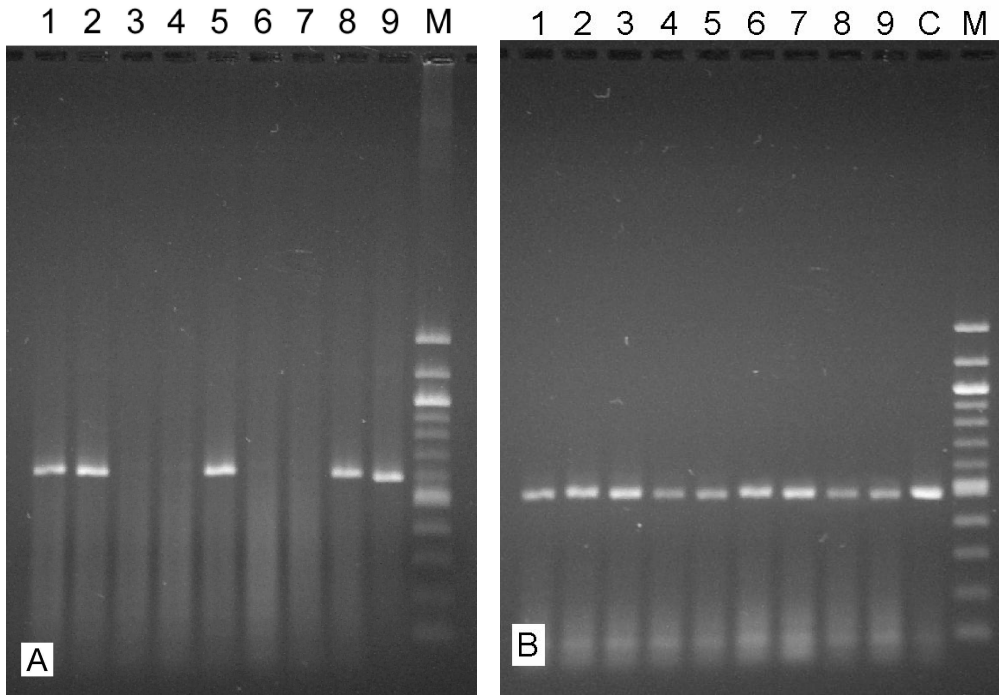
## Figures



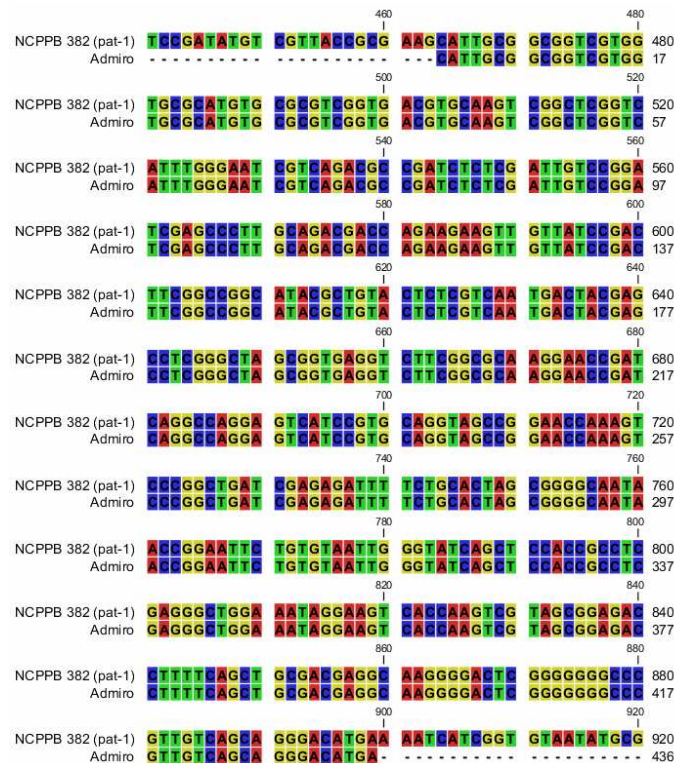
**Figure 1.** Tomato variety Duo infected by strongly virulent *Cmm* LMG 7333 (A) and weakly virulent *Cmm* LMG 5727 (B) bacterial strains.



**Figure 2.** Detection of *Cmm* pathogen in four years old dried five tomato plants (variety Barbados) by PCR with *Cmm*5,6 primers in two independent repetition. P - positive control; N - negative control; M - 100 bp DNA Ladder (Promega).



**Figure 3.** PCR detection of *Cmm* pathogen with primers Cmm5,6 (A) and primers Cmm1F,R (B) in tomato seed of varieties Perun (1), Sláva Porýní (2), Diana (5), Pavlína (8) and Denár (9) artificially infected by strongly virulent *Cmm* LMG 7333 strain and in tomato seed of varieties Orfea F1 (3), Pedro F1 (4), Minigold (6) and Karla (7) artificially infected by weakly virulent *Cmm* LMG 5727 strain before 26 months. C - positive control (DNA *Cmm* LMG 7333). M - 100 bp DNA Ladder (Promega).



**Figure 4.** Comparison of DNA sequences obtained from naturally infected tomato seed by *Cmm* of variety Admiro and from collection strain *Cmm* NCPBP 382 presented in the GenBank database (BLAST, NCBI).