



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
 Studentská 13, 370 05 České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

JMÉNO STUDENTA DSP: Ing. Pavel BERAN

NAROZEN(A): 10. 10. 1984 v Táboře

STUDIJNÍ PROGRAM: Biotechnologie

STUDIJNÍ OBOR: Zemědělské biotechnologie

FORMA STUDIA: Prezenční

ŠKOLICÍ PRACOVNÍŠTĚ: Biologické centrum AV ČR v Č. Budějovicích, ÚMBR

DATUM A MÍSTO KONÁNÍ ZKOUŠKY: 19. 07. 2012, ZF JU v Č. Budějovicích

ZKUŠEBNÍ TERMÍN Č.: první

NÁZEV DISERTAČNÍ PRÁCE:

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

VÝSLEDEK OBHAJOBY:

Prospěl(a)

~~**Neprospěl(a)**~~

ZKUŠEBNÍ KOMISE:

Podpis:

| | |
|---|--|
| Předseda: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc., ČZU Praha (oponent) | |
| Členové: prof. Ing. Josef Špak, DrSc., BC AV ČR České Budějovice | |
| prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v České Budějovicích | |
| doc. Ing. Radovan Pokorný, CSc., Mendelova univerzita, Brno | |
| doc. RNDr. Miloslav Šíp, DrSc., ZSF JU v Č. Budějovicích | |
| doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc., ÚEB AV ČR Praha | |
| Ing. Petr Dědič, CSc., VÚB Havlíčkův Brod | |
| Ing. Jaroslav Horký, CSc., Stát. rostlinolékařská správa Olomouc | |
| Dr. Ing. Jana Fránová, BC AV ČR České Budějovice (oponent) | |
| Ing. Jan Fousek, Ph.D., ÚMG AV ČR Praha (oponent) | |



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studentská 13, 370 05 České Budějovice

OBHAJOBA DISERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

JMÉNO STUDENTA: Ing. Pavel BERAN

NAROZEN(A): 10. 10. 1984 v Táboře

STUDIJNÍ PROGRAM: Biotechnologie

STUDIJNÍ OBOR: Zemědělské biotechnologie

FORMA STUDIA: Prezenční

Výsledek hlasování:

počet členů komise: 10

počet platných hlasů: 9

počet neplatných hlasů: 0

počet přítomných členů komise: 9

kladných: 9

záporných: 0

ZKUŠEBNÍ KOMISE:

Podpis:

| | |
|---|-----------|
| Předseda: prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc., ČZU Praha (oponent) | |
| Členové: prof. Ing. Josef Špak, DrSc., BC AV ČR České Budějovice | |
| prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., ZF JU v České Budějovicích | |
| doc. Ing. Radovan Pokorný, CSc., Mendelova univerzita, Brno | |
| doc. RNDr. Miloslav Šíp, DrSc., ZSF JU v Č. Budějovicích | |
| doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc., ÚEB AV ČR Praha | |
| Ing. Petr Dědič, CSc., VÚB Havlíčkův Brod | |
| Ing. Jaroslav Horký, CSc., Stát. rostlinolékařská správa Olomouc | HORKÝ |
| Dr. Ing. Jana Fránová, BC AV ČR České Budějovice (oponent) | |
| Ing. Jan Fousek, Ph.D., ÚMG AV ČR Praha (oponent) | |
| Školitel: doc. Ing. Ivan Mráz, CSc., BC AV ČR České Budějovice | |

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Odpovědi na dotazy oponentů k disertační práci

Ing. Pavel Beran

2012

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Proč jsou primery dle Drier et al. (1995) označovány jako komerční?

Tento termín byl převzat od Ing. Blanky Kokoškové, CSc., která uvedené primery tímto způsobem nazývá ve svých publikacích především kvůli zjednodušení a lepší orientaci v textu a tabulkách.

Metoda PCR je pro detekci Cmm opakovaně označována jako nejcitlivější. Ani v komentáři, ale ani v žádné z relevantních příloh (2, 5, 7, příp. 4) jsem se však nedozvěděl její konkrétní detekční limit. Jaký je?

V publikacích je často uváděno, že pomocí PCR je teoreticky možné detekovat až jednotlivé molekuly DNA. V publikacích zaměřených na detekci bakterií v praxi, bývá uváděn detekční limit v rozmezí přibližně 10^3 - 10^5 CFU/ml. V našich publikacích nebyl detekční limit PCR zjišťován zejména kvůli složitosti kvantifikace patogena v rostlinném materiálu, který byl používán. Řešením by mohlo být použití real-time PCR.

Výsledky z odstavce komentáře 4.3. a příloh 2, 5 a 7 mi nesedí, pokud jde o detekci Cmm z listů. Zatímco v přílohách 2 a 5 se tvrdí, že Cmm byl detekován v listech pouze PCR a žádnou jinou metodou, v příloze 7 a v komentáři najednou PCR vychází ve srovnání s imunologickými metodami jako nejhorší. Přitom se zdá, že se jedná o tytéž výsledky s 10 tyčkovými odrůdami rajčat. I kdyby tomu tak náhodou nebylo, tím spíše by si tento rozpor zasloužil diskusi. Prosím o vysvětlení. Byla vždy použita tatáž část rostliny ke všem testům? Z metodiky příloh to jasně nevyplývá.

V publikaci v příloze 7 byly použity vzorky získané o 1 rok později než vzorky použité v publikacích v přílohách 2 a 5. Výsledky PCR prováděné v naší laboratoři se liší o jeden vzorek (2 pozitivní vzorky v příloze 7 a 1 pozitivní vzorek v přílohách 2 a 5). Zde tedy není ve výsledcích zásadní rozpor. V publikaci v příloze 7 však bylo zaznamenáno mnohem více pozitivních výsledků s použitím imunologických metod, než tomu bylo v publikacích v přílohách 2 a 5. Domnívám se, že příčinou mohlo být použití monoklonálních protilátek namísto polyklonálních u některých metod. Přesná příčina je předmětem zkoumání laboratoře diagnostiky a epidemiologie mikroorganismů, kde byly všechny imunologické testy prováděny.

V příloze 7 je výše uvedená nejhorší spolehlivost PCR při detekci Cmm z listů vysvětlována jako možný důsledek přebytku hostitelské DNA. Proč by toto neplatilo u řapíků či stonků? V popisu experimentů se uvádí, že okraje listů už byly nekrotizované. Není to spíše přítomností možných inhibitorů, případně nesprávně zvolené metody extrakce DNA? Máme zkušenosti s kity Qiagen na extrakci RNA. Pro některé účely fungují výborně, někdy však zcela selhávají. Pokud PCR byla současně nejcitlivější, nebylo by řešením použití zředěnějšího vzorku? Tím by se zředily i případné inhibitory. Vhodné je také použití interní kontroly.

Nízká úspěšnost detekce patogena v listech napadených rostlin je předmětem našeho dalšího zkoumání. Možná přítomnost inhibitorů by tento jev velmi dobře vysvětlovala. Dalším

možným faktorem ovlivňujícím detekovatelnost patogena v listech by mohl být způsob šíření patogena cévními svazky rostliny. Nízká úspěšnost detekce patogena v listech rostliny by pak byla následkem odlišné morfologické stavby listu.

Jako poslední cíl práce je uvedeno vytvoření bakteriální sbírky z ověřených kmenů. V komentáři ani v závěrech (a pravděpodobně ani v přílohách – ty jsem však nečetl až tak důkladně vzhledem k tomu, že už byly či jsou recenzovány) není o této sbírce ani slovo. Byl tento cíl splněn?

Sbírka ověřených bakteriálních kmenů byla vytvářena průběžně zaočkováním do kryozkumavek a zamražením při -70 °C. Tato informace se v závěrech práce opravdu nevyskytuje.

Dr. Ing. Jana Fránová

Kterou ze studovaných bakteriálních chorob považujete za nejzávažnější a proč? Jaké jiné bakteriální patogeny se mohou na rostlinách rajčete vyskytnout?

Za nejzávažnější ze studovaných bakteriálních chorob považuji bakteriální vadnutí rajčete způsobené *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Tato bakterie je karanténní a dle dostupných dat způsobuje celosvětově největší škody.

Na rostlinách rajčete se mohou rovněž vyskytovat následující bakteriální patogeny: *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas corrugata* a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Proč byla v publikaci „A microarray for screening the variability of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer in Pseudomonas syringae“ použita metoda DNA mikročipů?

Jedná se o moderní molekulárně biologickou metodu, díky které bylo možné rychle získat potřebná data při relativně nízkých nákladech. Velkou výhodou byla v tomto případě možnost identifikace jednotlivých variant ITS v jednom kroku.

Proč byla vybrána právě bakterie Xanthomonas vesicatoria pro navržení specifických primerů?

Primery pro detekci této bakterie nebyly dosud publikovány. Jejich využitím tak lze detekovat další z několika druhů bakterií rodu *Xanthomonas* způsobující bakteriální skvrnitost rajčete, který dosud nebylo možné zjistit pomocí PCR.

Je známo, jaké příznaky či škody způsobuje bakterie Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis na jiných rostlinách než na rajčeti? Např. na dalších rostlinách rodu Lycopersicum a Solanum, dále např. u fazolu, hrachu, kukuřice, pšenice, ječmene, žita, ovsu, slunečnice, okurky?

Hlavním hostitelem *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* je rajče, kde patogen způsobuje bakteriální vadnutí. Na ostatních rostlinách se patogen vyskytuje zřídka, případně po provedení umělé infekce. Způsobené příznaky (pokud se projeví) však většinou korespondují s příznaky na rajčeti.

Na str. 29, kap. 4.3. „Spolehlivost detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*“ doktorand uvádí: „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.“ Zde je překvapivé, že detekce pomocí PCR má výrazně nižší citlivost než metody sérologické. Je tato situace u bakterií běžná? Jak si ji vysvětlujete? Je běžné nebo nebylo by vhodné např. použití nested PCR pro zvýšení citlivosti detekce této karanténní bakterie?

Na tuto otázku bylo částečně odpovězeno ve třetí a čtvrté otázce od pana Prof. Pavla Ryšánka. Použití nested PCR je dobrým námětem pro další pokusy.

V kapitole 7 – „Obrázky“ jsou demonstrovány ukázkové příznaky, které sledované bakterie na rostlinách rajčete vyvolávají. Je zde přesně uveden i odkaz, odkud jednotlivé originály fotografií pocházejí. Zajímalo by mne, zda má doktorand i fotodokumentaci studovaných bakteriálních onemocnění pocházejících z území České republiky. Pokud ano, prosím o ukázkou těchto příznakových rostlin při obhajobě práce.

Výběr fotografií bude promítnut po přednesené obhajobě práce a je uveden v Příloze 1.

Přestože jsou v kapitole Ostatní činnost vyjmenovány příspěvky na konferencích, doporučuji do disertace dodatečně přiložit kopie jednotlivých abstraktů ze sborníků konferencí. Zde by mne zajímalo, která sdělení byla prezentována formou ústního vystoupení a která jako plakátová sdělení, popř. zda všechny či které příspěvky prezentoval na konferencích doktorand osobně.

Abstrakty z konferencí a ostatní informace jsou uvedeny v Příloze 2.

V úvodních, česky psaných kapitolách doporučuji při citaci původních literárních zdrojů používat zkratku... „a kol.“, nikoli „et al.“, dále místo anglické zkratky „bp“ (base pairs) používat zkratku českou „pb“ (párů bází) a v celé práci se vyhnout drobným překlepům. Prosím o objasnění: Na str. 29 je používána zkratka IIF i IF, zřejmě se však jedná o jednu a tutéž zkratku pro imunofluorescenční metodu pro detekci bakterií, která je však na str. 24 popisována a označena jako IFA (Immunofluorescence Assay). Která zkratka je správná a proč doktorand nepoužívá zkratku jednotlivě v celé práci, nebo se jedná o rozdílné metody?

Používání zkratk cizojazyčného původu bylo zapříčiněno jejich běžným používáním ve vědeckých publikacích českých i cizojazyčných a souhlasím, že v česky psané disertační práci by bylo lepší používat zkratky českého původu. Zkratka IIF použitá v textu, který komentuje získané výsledky, označuje nepřímou fluorescenci (indirect immunofluorescence), což je jedna z možných variant imunofluorescenčních metod (immunofluorescence assay - IFA). Zkratka IF je pak použita v názvu jedné z publikací a rovněž je použita jako obecné označení imunofluorescenční metody.

Ing. Jan Fousek, Ph.D.

Uvažovali jste vzhledem ke zmiňované vysoké homologii genu *atpD* u xanthomonád při výběru vhodné oblasti pro specifickou detekci o jiném genu?

Bylo uvažováno i o některých dalších genech (např. *dnaK*, *gyrB*, *rpoB*, 16S). Díky velkému množství a dostupnosti informací a DNA sekvencí byl však vybrán gen *atpD*.

Co bylo podle Vás nejčastější příčinou vzniku infekce bakteriálního vadnutí rajčete u postižených porostů ?

Domnívám se, že příčinou infekce mohla být infikovaná sadba, přenos z nakažených posklizňových zbytků či nějaký způsob mechanického přenosu. Přenos semeny bývá v literatuře uváděn jako nejčastější zdroj nákazy i když např. Prof. Kúdela uvádí, že četnost nakažených semen zpravidla nepřekračuje 1 %. Nicméně vzhledem k tomu, že jsem nebyl osobně přítomen při sběru vzorků, nemohu tuto domněnku nijak podložit.

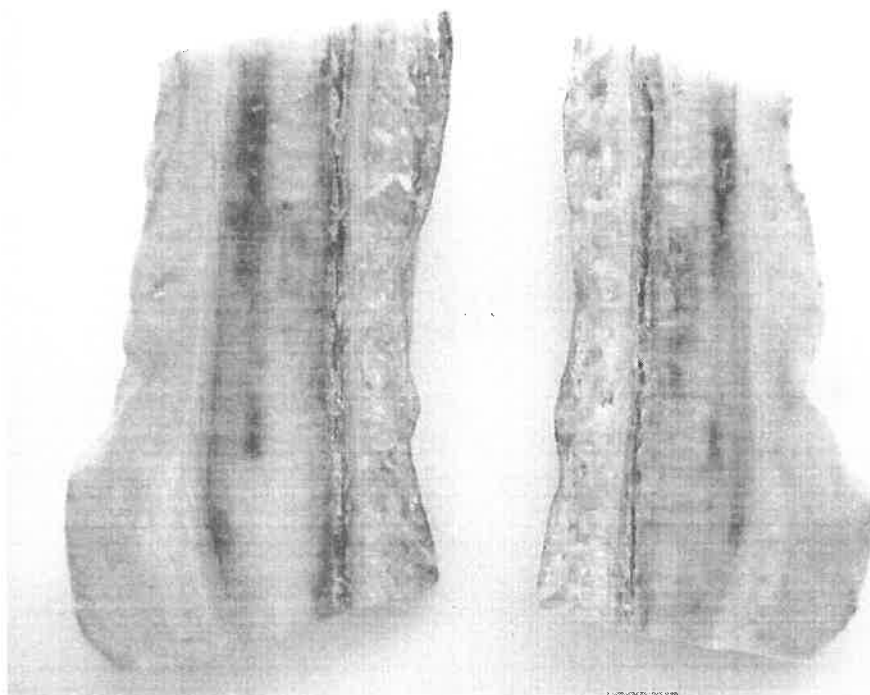
Ověřovala se schopnost přežití bakterie *Cmm* na semenech kultivačním testem, myšlena kultivace bakterií?

Kultivační test prováděn byl, výsledky jsou však zatím jen velmi předběžné.

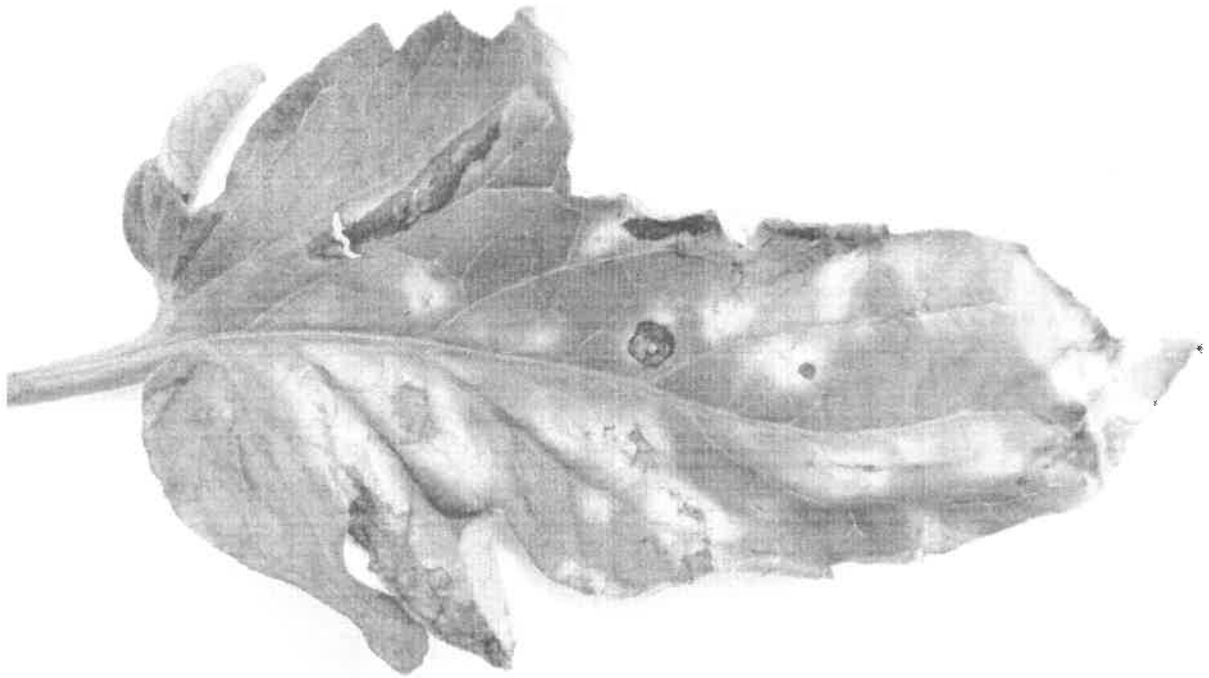
Příloha 1 – Fotografie příznaků bakteriálního vadnutí rajčete pořízené v naší laboratoři



Rostlina rajčete napadená bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (vlevo) a zdravá kontrola (vpravo).



Průřez stonkem rajčete napadeného *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.



List rajčete napadený *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Příloha 2 – Abstrakty z konferencí

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. (ústní prezentace, osobně)

We analyzed 15 different pathovars of *Pseudomonas syringae* to determine genetic variability through this taxon. Two molecular methods were selected for their ability to discriminate even closely related specimen.

Repetitive sequence based PCR method (further rep-PCR) generates genetic pattern by amplification of region between adjacent dispersed repetitive sequences occurring in prokaryotic genomes. Three sets of primers BOX, ERIC and REP primers were used for amplification of genomic DNA and produced pathovar specific profiles.

Macrorestriction of genomic DNA and pulse-field gel electrophoresis (further PFGE) tests perform restriction analysis of intact bacterial DNA. Chromosome is imprisoned during purification and cleaving in agarose plug to avoid mechanical shearing. Subsequent electrophoretic separation runs under specific conditions. We used *M*ssI restriction enzyme (Fermentas) to produce fingerprints from all used pathovars.

Rep-PCR patterns and PFGE fingerprints were transformed into GeneTools software (Syngene), where image processing and cluster analysis using UPGMA algorithm were done. All results were presented as a dendrogram. Variability rate depended on both, the used genotyping method and the primer pair in rep-PCR.

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant no. 522/07/P338, Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grants no. IQS500510558 and no. AV0Z50510513 and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant no. 0002700604.

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. (ústní prezentace, osobně)

Pseudomonas syringae is common gramnegative bacterium that can be found both as a harmless commensal on leaf surfaces and as an important plant pathogen that causes a variety of blights, cankers, speck, and spot diseases in many important agricultural crops. Aproximately 50 different pathovars of this species can be distinguished today according to pathogenicity on plants and phenotypic characteristic (Kúdela et al., 2002).

The rRNA operon (*rrn*) is composed of 3 rRNA genes and two internal transcribed spacers (ITS), usually in the order 16S rRNA – ITS1 – 23S rRNA – ITS2 – 5S rRNA. At the subspecies level, only ITS1 region has been reported as a suitable strain or pathovar marker.

This region consists of species conserved domains, usually containing two tRNA genes, and hypervariable DNA segments, which could allow the strain characterisation. Nevertheless, there are multiple *rrn* operons within *P. syringae* genome, and strains possessing different copies of the ITS1 region per genome have been described. This intragenomic heterogeneity (mosaicism) is brought about by different combinations of hypervariable segments, possibly resulting from recombination and horizontal transfer (Milyutina et al., 2004). Similar mosaicism within ITS1 has been found in the other bacteria and may significantly skew the diversity estimates and phylogenetic relationships inferred using *rrn* operon sequences. This may influence correct typing of many substantial pathogens and knowledge about its exact configuration in particular genome is therefore essential.

In order to have a simple method revealing such a variability in *P. syringae*, an oligonucleotide microarray targeting different configurations of ITS was developed. The principle of microarrays is the selective hybridization of sequences from the sample (targets), to the specific capture probes printed onto a solid support (microarray). The main advantage of the method is the possibility to detect different sequences in parallel. Fluorescent-based microarrays were chosen as the platform with the highest sensitivity (Lenz et al., 2008).

The aim of the study was a) to develop an oligonucleotide microarray targeting hypervariable regions of ITS1 of *P. syringae*, b) to test its usability for screening multiple variants presented in some strains, and c) to assess its potential in differentiation of the genomovars or pathovars of *P. syringae*. The results presented contribute also to the general knowledge about intragenomic heterogeneity in *P. syringae* and implies constraints for the other methods analysing ITS1.

Testing of the microarray revealed five distinct sequence variants and presence of at least two different copies of ITS within some of the genomes of *P. syringae*. The resulting constraints in determination of pathotype phylogenetic relatedness of pathogen are discussed.

1. Kúdela V., et al. 2002. Roslinolékařská bakteriologie. 347p
2. Milyutina I. A., et al. 2004. FEMS Microbiol. Lett. 239: 17-23
3. Lenz O., et al. 2008. J. Virol. Methods. 148: 96-105

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. (poster, osobně)

Plant diseases caused by bacteria are factors in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) production throughout the world. To the most important pathogens belong *Xanthomonas vesicatoria*, *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* causing various bacterial spots, specks, wilts and cankers of tomato plants. Mentioned pathogens except *P. syringae* pv. *tomato* can also infect pepper (*Capsicum annuum* L.). Traditional detection methods like agar plating and pathogenicity tests are time-consuming and labour-intensive (1), and the method for the fast and reliable detection of these pathogens is helpful, therefore.

The aim of the study presented is to develop an oligonucleotide microarray for identification of mentioned pathogens. The principle of microarrays is hybridization of sequences from the sample labelled fluorescently (targets) to the specific capture anchored to a solid support. The main advantage of the method is the possibility to detect many different sequences in parallel. Based on alignment of sequences retrieved from GeneBank (NCBI), oligonucleotide probes targeting variable 16S ribosomal RNA and adjacent internal transcribed spacer (ITS1) of

above mentioned pathogens were designed and spotted onto microarray. Selected bacterial regions were amplified in PCR using universal primers, hybridized onto microarray and the first results of the study are presented.

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant No. QH71229, by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grant No. AV0Z50510513 and by the Czech Science Foundation, grant No. 521/08/H042.

1. Veena M. S. and van Vuurde J. W. L. 2002. J. Microbiol. Meth. 49: 11-17

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. (poster, osobně)

We tested 15 different pathovars (further pv.) and 29 field isolates of *Pseudomonas syringae* for presence of three bacterial toxin genes. Standard PCR technique, dot-blot hybridization, S-blot hybridization and sequencing were used. PCR was performed with several primer pairs to produce amplicons for each toxin gene. Amplification products of appropriate size were purified sequenced and than non-radioactively labelled probe for subsequent hybridization screening was done. To discover detailed localization on genomic fragment we used s-blotting applied on fingerprints from macrorestriction of intact genome DNA separated by pulse field gel electrophoresis (PFGE).

Coronatine gene was amplified by PCR in pv. *glycinea*, pv. *tomato* and pv. *ulmi*, syringomycin gene was found in pv. *coronafaciens*, pv. *syringae* and in one of field isolates. Tabtoxin gene was detected only in pv. *tabaci*. These results confirmed previous works except of occurrence of coronatine in pv. *ulmi* and syringomycin in pv. *coronafaciens*.

Hybridization tests are in accordance with above mentioned PCR analysis. The only one exception is positive signal with pv. *atrofaciens* when probe against coronatine gene was used. Localization of genes on chromosome is still in process.

Sequencing did not discover any differences in the same genes between pathovars.

The work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, grant no. 522/07/P338, Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic, grants no. 1QS500510558 and no. AV0Z50510513 and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant no. 0002700604.

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. (poster, Ing. Blanka Kokošková, CSc.)

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* [(SMITH) DAVIS et al.] (*Cmm*), the causal agent of bacterial canker of tomato, is a quarantine bacterium causing serious losses to both greenhouse and field tomato crops [1]. The pathogen is present in most tomato production areas, including the EPPO region [2]. Based on the surveys of disease in 22 localities over 2010 vegetation season, *Cmm* was found in 6 localities of the South and the Central Moravia and the Central Bohemia in total on indeterminate tomatoes planted in greenhouse and field conditions. Altogether 113 symptomatic tomato samples (bases, stems, petioles and leaves) were tested using immunochemical (ELISA, IF) and molecular (PCR) techniques in 2010, from which 68 % were positive samples. In immunochemical tests, we used commercial polyclonal (PABs) and monoclonal (MABs) antibodies of Agdia, Inc. (USA) and PABs of Neogen Europe Ltd. (UK) companies for DAS-ELISA, Indirect ELISA, PTA-ELISA and IIF. Using IIF and ELISA, we reliably detected *Cmm* to dilution 1:1000 and 1:100 respectively. In general, all three types of ELISA techniques are considered to be suitable for screening tomato tests. However, based on our results, Indirect ELISA using MAb was more sensitive than PTA-ELISA using PAB. The most sensitive technique was optimized PCR with published [3] and also laboratory-generated PCR primers from the *Cmm* tomatinase gene [4]. The pathogen was more reliably detected from bases, stems and petioles than leaves of infected tomato plants. The results obtained from PCR with both commercial and our own primer sets were comparable.

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. (poster, Ing. Blanka Kokošková, CSc.)

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.