

# 1. ÚVOD

K nejobávanějším fytopatogenním mikroorganismům z rodu *Erwinia* patří bakterie *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow *et al.* 1920, původce spály růžovitých rostlin. Ve smyslu zákona č. 326/2004Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů a vyhlášky č. 330/2004Sb., o opatřeních proti zavlékání a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů určených k pěstování, je bakterie *Erwinia amylovora* škodlivým organismem, který se vyskytuje v Evropském společenství (ES) a je závažný pro celé ES. Pokud jsou napadeny rostliny nebo rostlinné produkty určené k pěstování tímto škodlivým organismem, je zakázáno zavlékat a rozšiřovat je na území České republiky. Státní rostlinolékařská správa (SRS) proto nařizuje mimořádná rostlinolékařská opatření k likvidaci napadených rostlin převážně ve školkách a jejich okolí (Vahala 2005).

V roce 2002 Česká republika požádala Evropskou unii (EU) o uznání tzv. chráněné zóny (chorobyproště území) týkající se původce spály růžovitých. Účelem uvedené zóny bylo zastavení nebo alespoň zpomalení šíření choroby mimo chráněné zóny po území jižní Moravy. Po vstupu ČR do EU by vznik chráněné zóny také usnadnil vývoz hostitelských rostlin spály růžovitých z ovocných a okrasných školek do chráněných zón členských států EU. V souvislosti s těmito zónami SRS vymezila dle směrnice č. 2000/29/ES i tzv. nárazníkové zóny bez výskytu choroby na území o rozloze nejméně 50 km<sup>2</sup>. V EU umožňují tyto zóny prodej hostitelských rostlin prostých spály z ovocných a okrasných školek do chráněných zón. Výskyt spály růžovitých v rostlinolékařském obvodu Vyškov a sousedním Rakousku v blízkosti státních hranic s Českou republikou vedl v konečném důsledku ke stažení návrhu Ministerstva zemědělství o uznání chráněné zóny (Vahala 2005).

Bakteriální spála je nejstarší a nejvíce studovanou bakteriální chorobou (Kúdela 1976). Původní výskyt je pravděpodobně na východě Severní Ameriky na nekulturních hostitelských druzích čeledi *Rosaceae*. Po dovezení kulturních druhů hrušní a jabloní do těchto oblastí se objevily silné endemie v ovocných sadech (Baker 1971). První výskyt na území Evropy byl zaznamenán v roce 1957 v Anglii, v hrabství Kent, kde byl patogen izolován z hrušně (Crosse *et al.* 1958). Po devíti letech také na evropském kontinentu v Holandsku (Keil *et al.* 1966). V roce 1971 v NSR (Bömeke 1972). V roce

1986 byl bezpečně prokázán výskyt patogena v našem hlavním městě v obvodu Prahy 4 (Kůdela 1990).

Bakteriální spála růžovitých je největší hrozbou pro jádroviny (jabloň, hrušeň) a botanicky příbuzné okrasné a divoce rostoucí dřeviny (hloh, jeřáb a skalník). Napadení rostliny má za následek snížení výnosů, v dalších letech při rozšíření patogena v rostlině až odumírání celé rostliny (Kůdela 1990).

*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey *et al.* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye, *Erwinia carotovora*, (Jones) Bergey *et al.* subsp. *carotovora* a *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.* jsou původci černání stonku bramboru a mokré hniloby. Hlavní škodlivost se projevuje ve formě hniloby hlíz během skladování (Kůdela 1991).

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Popis a význam rodu *Erwinia*

#### 2.1.1. Taxonomické zařazení

*Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow *et al.* 1920 (*Ea*) patří k prokaryotickým organismům, které tvoří říši *Procaryotae*, což znamená, že nemají jádro v obvyklém cytologicko-morfologickém významu. Tento druh řadíme do oddělení *Gracilicutes* (prokaryota s tenčí peptinoglykanovou stěnou a vnější lipoproteinovou membránou, gramnegativní), sekce 5 (fakultativně aerobní tyčinky), čeleď *Enterobacteriaceae*, rod *Erwinia*, nesporulující, ze skupiny nepektinolytických (Kůdela 1990).

Skupina nepektinolytických erwinií zahrnuje také fytopatogenní, nekrogenní bakterie *E. pyrifoliae*, původce nekrotických příznaků na listech a větvích asijské hrušně (*Pyrus pyrifolia*) a méně významný fytopatogen *E. rhapontici*, jakožto původce růžovění obilíků pšenice (Kůdela *et al.* 2002).

Skupina pektinolytických erwinií zahrnuje macerogeny *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey *et al.* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye, *Erwinia carotovora*, (Jones) Bergey *et al.* subsp. *carotovora* a *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.* (Kůdela 1991), které způsobují černání stonku bramboru a měkkou hnilobu rostlin (Kůdela *et al.* 2002).

#### 2.1.2. Geografické rozšíření

*Erwinia amylovora* se v současné době vyskytuje v těchto zemích: Velká Británie, Irsko, Švédsko, Norsko, Nizozemsko, Dánsko, Belgie, Francie, SRN, Polsko, Česká republika, Rakousko, Švýcarsko, Španělsko, Itálie, Řecko, Kypr, Chorvatsko, Maďarsko, Srbsko, Bosna a Hercegovina, Turecko, Izrael, Arménie, Irán, Albánie, USA, Kanada, Nový Zéland (Kůdela 1990), Finsko, Lichtenštejnsko, Portugalsko, Estonsko, Litva, Lotyšsko (Brennan *et al.* 2002). Úplný přehled rozšíření v roce 2005 podle EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) je uveden na mapě 1.

Pro zmíněné země, kde se spála vyskytuje, je tato choroba velkou překážkou pro uplatnění rozmnožovacího materiálu jaderovin i okrasných hostitelských rostlin

na mezinárodních trzích. V Evropě představuje spála největší riziko pro země z oblasti Středozemního moře (Kůdela 1990).

*E. carotovora* subsp. *carotovora* a subsp. *atroseptica* je běžná v mírném a tropickém podnebí. Celkový přehled současného rozšíření mokré hniloby na území naší republiky v roce 2005 je uveden na mapě 2 (podle SRS). Se středním výskytem *E. carotovora* se setkáváme v jihočeském regionu (Anonym 2005).

*E. chrysanthemi* škodí hlavně subtropických a tropických oblastech, v Evropě na skleníkových okrasných rostlinách. Celkový přehled rozšíření v roce 2005 je uveden na mapě 3 (podle EPPO).

### 2.1.3. Morfologické a kultivační znaky

Rod *Erwinia* jsou rovné krátké tyčinky, 0,5-1,0 x 1-3  $\mu\text{m}$ . Pohyblivé několika peritrichálními bičíky, fakultativně aerobní s aerobně–respiračním a fermentačním typem metabolismu (Kůdela *et al.* 2002). Kolonie na živném agaru vyrostou během dvou až třech dnů při teplotním optimu 21-27 °C. Jsou typicky krémově bílé, vypouklé, lesklé, mukoidní. Optimální koncentrace vodíkových iontů je 6,0 – 7,5 pH. Pro růst vyžaduje *Erwinia amylovora* kyselinu nikotinovou, produkuje acetoin, kolonie nemají žlutý pigment (Kůdela 1990). Dusičnany bakterie redukuje na dusitany (Rosypal *et al.* 1981) (Obr. 1, 4 a 5).

### 2.1.4. Patogenní vlastnosti

Podstata patogenity u bakterií *E. amylovora* byla vysledována při izolaci exopolysacharidů, amylovorinu a levanu (Oh and Beer 2005). Tyto exopolysacharidy byly získány ze slizu produkovaného patogenem, ale zbaveného bakteriálních buněk. Po určité době uvadaly dokonce rezistentní odrůdy jabloní a hrušní ponořeny do roztoku amylovorinu. Proto byl amylovorin charakterizován jako specifický termostabilní fytotoxin způsobující plazmolýzu buněk (Kůdela 1990).

*Erwinia chrysanthemi* je druh úzce příbuzný s *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Patogenita obou bakterií je podmíněna zejména produkcí velkého množství pektolytického enzymu endopolygalakturotranseliminázy (PGTE), který rozkládá střední

lamelu mezi buňkami (Kúdela 1991). Oxidují pektiny v podmínkách aerobní oxidace (Rosypal *et al.* 1981).

### 2.1.5. Molekulární charakteristika patogenů

Byla zjištěna celková sekvence genomu *Erwinia amylovora* kmenu Ea273, s jeho celkovou velikostí 3 805 kbp s obsahem přibližně G+C 53,5 % (Anonym 2006). Velikost nepřenosného plazmidu pEa29 je 28 kbp (Anonym 2006, McGhee and Jones 2000, McManus and Jones 1994). Všechny přirozeně působící kmeny *Ea* obsahují plasmid pEa29 (Steinberger *et al.* 1990, Maxon-Stein *et al.* 2003, Ruppitsch *et al.* 2004).

U bakterie *Erwinia amylovora* byly určeny např. geny kódující tvorbu enzymů pro syntézu extracelulárních polysacharidů, geny usnadňující růst patogena v hostitelských rostlinách, geny usnadňující metabolismus a biosyntézu určitých látek (Oh and Beer 2005, McGhee and Jones 2000).

Rovněž byl osekvenován celý genom bakterie *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, jehož velikost činí 5 064 kbp. Pro osekvenování byl použit kmen SCRI1043 (Bell *et al.* 2004, Anonym 2006).

### 2.1.6. Hostitelské rostliny

K hostitelským rostlinám druhu *E. amylovora* patří 146 druhů z 20 rodů čeledi růžovitých, podčeledi jabloňovitých. Za tzv. hlavní hostitele se považují druhy:

- (a) Užitkové: hrušeň (*Pyrus*), jabloň (*Malus*), kdouloň (*Cydonia*), bibas (*Eriobotrya*).
- (b) Okrasné nebo divoce rostoucí dřeviny: hloh (*Crataegus*), skalník (*Cotoneaster*), jeřáb (*Sorbus*), hlohyně (*Pyracantha*), kdoulovec (*Chaenomeles*), mišpule (*Mespilus*), muchovník (*Amelanchier*), *Stranvaesia* (*Photinia*).

Za hostitelské rostliny se nepovažují druhy: *Crataegus arnoldiana*, *C. phaenopyrum*, *C. viridia*, a *Sorbus intermedia*.

Ve střední a západní Evropě je výskyt spály nejčastější na hlozích rostoucích ve volné přírodě nebo v živých plotech. Některé druhy rodu *Prunus* jsou potenciálním zdrojem inokula původce spály (Kúdela 2001).

Pektinolytické bakterie *E. carotovora* subsp. *carotovora* mohou napadnout za příznivých podmínek dužnaté orgány v podstatě kteréhokoliv druhu rostlin. Pro *E. carotovora* subsp. *atroseptica* je hlavním hostitelem sice brambor, ale mohou napadnout i brukvovité rostliny (květák, zelí), rajče a okrasné rostliny (*Iris* sp., *Delphinium* spp.) (Kůdela 1991).

*E. chrysanthemi* napadá široký okruh tropických a subtropických rostlin. Mezi hostitelské rostliny patří skleníkové okrasné rostliny, např. karafiát, chryzantéma, filodendron a dieffenbachie (Kůdela 1991).

### 2.1.7. Význam jednotlivých patogenů

Bakteriózy obecně způsobují v podmínkách střední Evropy ztráty ve výši asi 13 % potenciální sklizně (Rod 2002).

*Erwinia amylovora*, způsobující bakteriální spálu růžovitých rostlin je jednou z nejdestruktivnějších chorob rostlin. Jsou-li u jadrovin infikovány květy a plody, výnos běžného roku bývá zničen. Napadení plodonožů, letorostů a starších výhonů snižuje výnos v dalších letech po infekci. Rozšíří-li se nákaza do kosterních větví, kmene a kořenů, je ohrožena životnost celého stromu (Kůdela 2001).

*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *Erwinia chrysanthemi* způsobují černání stonku bramboru a mokrou hnilobu. Hlavní škodlivost se projevuje ve formě hniloby hlíz během skladování, rozsah celkových ztrát bývá 5 % a více (Kůdela 1991).

### 2.1.8. Symptomatologie

Příznaky spály růžovitých rostlin se vyskytují na všech nadzemních orgánech. Infikované květy vodnatí, pak vadnou, sesychají a hnědnou až černají. Na infikovaných listech se nacházejí velké nekrotické léze, které vznikají buď od okraje listové čepele, nebo od řapíku a střední žilky. Nezřídka listy v několika hodinách náhle hnědnou až černají a svinují se. Napadené květy a listy zůstávají viset na stromě. Letorosty vodnatí, později se zbarvují hnědočerně, usychají a srašťují se. Jejich vrcholy vadnou a hákovitě se ohýbají (Kůdela 2001) (Obr. 2).

Z květů, letorostů a listů přecházejí spálové bakterie do starších výhonů. Korová pletiva výhonů vodnatí, nekrotizují a zbavují se červenohnědě, což je nejlépe patrné na podélném řezu. Nekrotizované pletivo na podzim mírně vklesne. Okraje těchto nekrotických ložisek jsou patrné podle jemných prasklin. Na podélném řezu jsou infikovaná pletiva zbarvena rezavě červeně nebo hnědě a často mají vodnatý vzhled. Přechod mezi infikovaným a zdravým pletivem je neostrý (difúzní) (Kůdela 2001).

Patogen proniká do plodů buď z napadených plodonošů přes stopky, nebo přímo přes lenticely a poranění. K infekci jsou nejnáchylnější nezralé plody. V místě infekce se vytvoří vodnatá skvrna, která později hnědne až černá. Plody se scvrkávají, zůstávají viset na stromě a nezřídka mumifikují (hrušky vypadají jako sušené švestky). Jsou-li plody infikovány až později za vegetace, tvoří se v místě infekce jen hnědé skvrny. Příznaky na hrušních jsou intenzivnější než na jabloních (Kůdela 1990).

Typickým příznakem spály je tvorba bakteriálního slizu, který se za vlhkého a teplého počasí objevuje na povrchu napadených orgánů v podobě lepkavých, bělavých a později hnědnoucích a tuhoucích kapek, povlaků nebo jemných vláknitých útvarů. Bakteriální sliz je směs bakterií a jimi vylučovaných mukopolysacharidů (Kůdela 1999).

Mokrý bakteriální hniloba může být způsobena několika druhy bakterií. Nejdůležitějším původcem je *Erwinia carotovora* a její subspecie. Může se objevit již na poli, běžnější však je výskyt v průběhu skladování jako důsledek mechanického poškození, primární infekce jinými patogeny nebo nevhodných podmínek skladování (Anonym 1996).

*E. carotovora* je také původce černání stonku a s mokrou bakteriální hnilobou tato choroba přímo souvisí, ale vysoký výskyt černání stonku nemusí vždy znamenat napadení mokrou bakteriální hnilobou během skladování. Rozhodující je průběh počasí ve vegetaci (Hausvater 2002).

Dužnina napadené hlízy se částečně nebo zcela mění v měkkou kašovitou hmotu, slupka často zůstává celistvá až do konce hnilobného procesu. Na průřezu hlízou bývá mezi napadeným a zdravým pletivem patrná tmavá zóna. Napadené pletivo na vzduchu žloutne až růžoví a postupně hnědne (Anonym 1996).

### 2.1.9. Infekční cyklus

*Erwinia amylovora* přezimuje v korových pletivech na okrajích nekrotických lézí na větvích nebo kmenu. Spálové bakterie mohou také pravděpodobně přezimovat v pupenech a také ve zjevně zdravých pletivech dřeva. Na jaře se aktivita patogena v nekrotických lézích znovu obnovuje, přičemž podíl aktivních ložisek v sadu se pohybuje v rozmezí 2-46 %. Bakterie se pomnožují a šíří se do sousedního zdravého korového pletiva. Za vlhkého a teplého počasí vystupuje masa bakterií na povrch rostlin nejčastěji ve formě kapiček slizu, méně často ve formě tzv. vzdušných provazců či vláken. Sliz se objevuje přibližně v době květu hrušní (Kůdela 2001) (Obr. 3).

Na kratší vzdálenost (do 100 m) se spálové bakterie přemísťují hlavně atmosférickou vodou (zejména větrnými dešti), hmyzem, roztoči a pavouky, na střední vzdálenosti (1000-5000 m) opylujícím hmyzem a na dlouhé vzdálenosti (nad 5000 m) ptactvem (Hayward and Waterston 1998), vzdušnými proudy (nesoucími bakteriální vzdušné provazce), činností člověka, který je zprostředkovatelem přenosu infikovaného nebo kontaminovaného reprodukčního materiálu – roubů, řízků, plodů a celých rostlin (Kůdela 1990).

Bakterie pronikají do rostliny přirozenými otvory (průduchy, lenticelami, žláznatými trichomy, hydatodami, nektartodami); nekutinizovanými pletivy blizen a prašníků; puklými prašnými váčky; trhlinkami vzniklými poraněním (hmyzem, řezem, větrem, kroupami apod.). Nejčastějším místem pronikání patogena jsou květy, listy a nezdřevnatělé letorosty. Z květů a listů pronikají bakterie přes stopky do brachyblastů, výhonů, větví a kmene (Kůdela 1990).

Obecně platí, že teplé a vlhké počasí s četnými dešťovými srážkami rozvoj choroby podporuje, chladné a slunečné zpomaluje a velmi suché zastavuje. Riziko výskytu spály je největší, když teploty převyšují 18 °C (pohybují se mezi 18 až 28-33 °C) a prší. Infekce květů je velmi pravděpodobná za teplých slunných dnů (21-30 °C), kdy je vysoká aktivita hmyzu – potenciálního vektora spálových bakterií (Kůdela 1990).

*E. carotovora* subsp. *carotovora* v našich podmínkách nepřezimuje, a proto rozhodujícím zdrojem infekce jsou napadené sadbové a kontaminované hlízy nebo hlízy s latentní infekcí. Významným zdrojem může být i kontaminovaná zemina ve skladech. Hlízy jsou infikovány v půdě prostřednictvím stolonu nebo bakterie pronikají do hlíz lenticelami. K šíření bakterií v půdě dochází volnou vodou, hlavně v letech, kdy půda



delší dobu nevysychá. Častější je napadení hlíz při sklizni nebo třídění mechanickým poškozením. *E. carotovora* subsp. *carotovora* se uplatňuje jako významný sekundární patogen hlavně u hlíz primárně infikovaných plísní bramborovou (*Phytophthora infestans*). *E. carotovora* subsp. *carotovora* sice není anaerobní organismus, ale přítomnost vody na hlízách (sklizeň při dešti, potní vrstva) a nedostatek vzduchu infekci usnadňují. Tím mohou nastat potíže při mytí hlíz před balením a jejich nedostatečném osušení (Hausvater 2002, Anonym 1996).

### 2.1.10. Ochrana

Proti zavlečení *Erwinia amylovora* na nová území se uplatňují mimořádná opatření. Karanténní inspekci podléhají všechny rostlinné části včetně plodů. Většinou však převládá názor, že plody, jako potenciální zdroj nákazy, představují nevýznamné potenciální riziko. Vyjma zničení rostlinných pletiv neexistuje spolehlivá metoda chemického nebo jiného ošetření, jimiž by bylo možno eliminovat patogen z rostlinného materiálu. Dosavadní zkušenosti ukazují, že jakmile se patogen usídí v určitém regionu v sadech nebo na divoce rostoucích hostitelských rostlinách, nelze eradikačními opatřeními dalšímu šíření nákazy zcela zabránit, ale pouze jej zpomalit. Vzhledem k velké škodlivosti spály růžovitých rostlin se však i přes tuto negativní zkušenost obecně eradikační opatření v nově ohrožených oblastech uplatňují. Je nutné dodržovat přísná mimořádná rostlinolékařská opatření a provádět důsledné kontroly u importovaného rostlinného materiálu, v sadech a školkách, aby se zabránilo nebo alespoň zpomalilo šíření nákazy do dosud nezamořených oblastí. Ve většině evropských států není používání antibiotik povoleno. Hrušně, jabloně, ale i skalníky a hlohy se šlechtí na rezistenci (Kůdela 2001). Pečlivý a odpovědný monitoring výskytu patogena a zároveň přesná identifikace může velmi snížit rozšíření onemocnění (Brennan *et al.* 2002).

Již v padesátých letech se začalo používat antibiotikum streptomycin a o několik roků později se ošetřovalo měďnatými a jinými chemikáliemi. Avšak ani ne po dvaceti letech používání již bakterie *Erwinia amylovora* začala vykazovat vůči streptomycinu odolnost. Ukázala se možnost ochrany pomocí bakterie *Pseudomonas fluorescens*, kmen Pf-A506. Tento kmen působí konkurenčně (zejména v oblasti výživy) pro bakterie, které způsobují spálu a tím chrání květy před silnějšími infekcemi. Může být aplikován spolu

s antibiotiky, ale ne s měďnatými přípravky (Anonym 2001). Na ochranu rostlin proti mrazovému poškození během vegetace (mimo jiné při ochraně proti *E. amylovora*) byla v USA v roce 1992 registrována směs tří bakteriálních kmenů (*Pseudomonas fluorescens* kmen Pf-A506, jeden přirozeně se vyskytující kmen *P. syringae* a další jiný kmen *Pseudomonas fluorescens*), které potlačují nukleárně aktivní bakterie a to spíše na principu kompetice omezeného zdroje živin ve fyloplánu než na principu antibiomy (Kůdela 2001).

Boj proti patogenům černání stonků bramboru spočívá v prevenci. Je třeba sklízet za suchého počasí, respektive hlízy před skladováním pečlivě osušit, zabránit vysoké vzdušné vlhkosti a tvorbě vodního filmu na hlízách, a udržovat teplotu skladu pod 6 °C (Kůdela 1991, Kůdela 2001).

### **2.1.11. Odběr vzorků a kultivace**

Odběr vzorků z rostlin podezřelých z napadení rozhoduje o správnosti výsledku bakteriologických rozborů. Odumřelá a zaschlá pletiva hostitelských rostlin již živé bakterie většinou neobsahují. Nemá proto smysl odebírat např. celé vrcholy zaschlých výhonů. Odebrat je třeba především spálové květy, listy, plody, nezdřevnatělé letorosty a u starších výhonů jen ty části, kde je rozhraní mezi napadenými (vodnatými, nekrotizovanými) a dosud zjevně zdravými pletivy. Mezi odběrem a zpracováním vzorků by měl být co nejkratší časový interval, aby se předešlo vyschnutí pletiv (Kůdela 1990).

Segment odebraného pletiva se rozdrtí přibližně v 1 ml sterilní destilované vody na hodinovém sklíčku. Část vzniklé suspenze se nanáší sterilním platinovým očkem křížovým roztěrem na vhodné živné agarové plotny v Petriho miskách. Inkubace probíhá v termostatech při 27°C po dobu 2-3 dnů. Jednotlivé kolonie narostlé na živném médiu (zřetelně separované od ostatních kolonií) se přeočkovávají na další agarové plotny, aby se ověřila čistota izolátu. Jsou-li kultury čisté, přistupuje se k vlastním identifikačním testům (Kůdela 1990).

## **2.2. Současné metody determinace**

### **2.2.1. Sérologické metody**

Identifikace založená na biochemických testech a testech patogenity je většinou časově náročná. Předností sérologických testů je rychlost, poměrně dobrá citlivost a specifčnost, s možností snadného zpracování velkého počtu vzorků (především u ELISA testu). V rostlinolékařské bakteriologii se uplatňují hlavně tyto identifikační metody: aglutinace; imunodifúze; imunofluorescence; enzymová imunoanalýza (EIA), zejména tzv. heterogenní typ EIA nazvaný ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Sérologické metody jsou v současnosti často používané techniky pro detekci. Oproti molekulárním metodám však mohou zamlžit detekci vzhledem k přítomnosti antigenů gramnegativních bakterií, které vyvolávají tvorbu nespecifických protilátek (Bereswill *et al.* 1995).

Detekce sérologickými metodami může být také obtížná, pokud jsou bakterie v rostlině v množstvích menších než 10 000 CFU (Colony Forming Units) na 1 gram rostlinného pletiva nebo 1 mililitr rostlinné šťávy. Při této koncentraci je v 10 $\mu$ l vzorku, který nanášíme na podložní sklíčko, méně než 100 bakteriálních buněk, ze kterých jen několik může být vizualizováno metodou IF (imunofluorescenční mikroskopie) nebo detekováno pomocí ELISA testů (Sanger *et al.*, 1977).

#### **2.2.1.1. Aglutinační test**

Jedna kolonie se očkem přenese na podložní sklíčko s kapkou destilované vody. Přidá se stejné množství antiséra a promíchá se. Pozitivní reakce se projeví za 1 – 3 minuty typickým vyvločkováním (aglutinací) (Kůdela 1990).

#### **2.2.1.2. Imunofluorescence**

Je to jeden z nejcitlivějších imunobiologických testů. Umožňuje stanovení patogena přímo z nemocných pletiv. Předpokladem je specifické antisérum (nejlépe monoklonální). Ze séra se oddělí frakce imunoglobulinů a na ni se připojí fluorescein, který mění neviditelné ultrafialové záření na viditelné žlutozelené světlo. Vazba

protilátek s barvivem na antigen se pozoruje speciálními mikroskopy. Žlutý filtr v mikroskopu za preparátem pohlcuje ultrafialové záření a propouští dále jen paprsky viditelného světla vzniklé fluorescencí. Nevýhodou této metody je potřeba speciálního přístrojového vybavení a nemožnost uchování preparátu a především autofluorescence rostlinných pletiv (Kůdela 1990).

### **2.2.1.3. Enzymová imunoanalýza – ELISA**

Používá se příslušná imunoglobulinová frakce a vysoce specifické protilátky, které se vážou na vhodný enzym (peroxidáza z kořene křenu, alkalická fosfatáza). Tento enzym slouží jako detektor imunochemické reakce, je barevný nebo jinak snadno detekovatelný (Kůdela 1990). Modifikaci PTA-ELISA (plate-trapped antigen-enzyme linked immunosorbent tests) používali Kokošková a Mráz (2005) při detekci *E. amylovora*. Donat *et al.* (2005) použili modifikaci (DASI) ELISA, využívající dvojici monoklonálních protilátek proti *E. amylovora*.

### **2.2.2. Testy patogenity**

a) Test hypersenzitivity na tabáku.

b) Hruškový test – je velice jednoduchý. Jehlou namočenou v bakteriální suspenzi se udělá několik vpichů do plodu hrušky. Po 3-5 dnech při 20-27 °C při přítomnosti *E. amylovora* se objevují jasné charakteristické symptomy, a to tvorba krémovitého bakteriálního slizu (Kůdela 1990, Brennan *et al.* 2002).

### **2.2.3. Orientační zkouška**

Přítomnost bakterie v nekrozách lze orientačně ověřit roztokem jodidu draselného, který se nanáší na řeznou plochu výhonů rostlin. V případě přítomnosti *E. amylovora* zůstává vzorek nezbarven. Naproti tomu nepřítomnost patogena umožní reakci roztoku se škrobem za vzniku modré barvy (Vahala 2005).

## 2.2.4. Biochemické metody

### 2.2.4.1. Mikrobiální identifikační systém BIOLOG

Tato metoda je založena na specifickém využívání 95 různých uhlíkatých substrátů (alkoholy, polymerické látky, organické kyseliny a jejich soli, aminokyseliny) jednotlivými taxonomickými skupinami bakterií. Využívání určitého uhlíkatého zdroje testovanou bakterií se projeví zvýšením její respirace. Toto zvýšení respirace se projeví jako barevná změna vzniklá redukcí tetrazoliové violeti na fialový formazan (Bochner 1989). Výsledný utilizační profil se nazývá „metabolický otisk“. Ten se porovnává se vzorovým kmenem v databázi pro příslušný druh bakterie. Tento systém je schopen taxonomicky rozlišit bakterie až na úroveň jejich poddruhů (Jones *et al.* 1993).

Kokošková a Mráz (2005) prozkoušeli dvacet odebraných vzorků s příznaky bakteriální spály růžovitých, které byly určovány imunochemickými testy (hruškový test, test hypersenzitivity) a z toho reagovalo čtrnáct kmenů negativně, šest pozitivně pomocí PTA-ELISA, tři pozitivně pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR) s primery pro detekci *E. amylovora* (Bereswill *et al.* 1995). Pomocí systému BIOLOG byly ostatní vzorky určeny jako *Pantoea dispersa* a *P. agglomerans*. Z tohoto rozlišení je vidět, jaké výhody má tato metoda oproti ostatním.

## 2.2.5. Molekulárně biologické metody

Současné pokroky v molekulární biologii nabízí mnoho možností pro spolehlivější a snadnější identifikaci *E. amylovora*. Mezi nejperspektivnější metody patří polymerázová řetězová reakce (PCR) a její analogie, společně s různými typy hybridizačních technik. Všechny metody jsou založené na identifikaci specifických úseků DNA pro daný organismus. Za tímto účelem bylo nalezeno několik různě vhodných oblastí.

### 2.2.5.1. Specifické úseky v genomu

Jsou to vysoce konzervativní repetitivní sekvence vyskytující se v mnoha kopiích v genomech většiny gram-negativních a několika gram-pozitivních bakterií (Lupski

and Weinstock 1992). Tyto sekvence byly rozděleny do třech skupin. Jsou to 35-40 bp dlouhé repetitivní extragenické palindromické (REP) sekvence, 124-127 bp enterobakteriální repetitivní intergenový consensus (ERIC) a 154 bp BOX elementy (Versalovic *et al.* 1994). Od těchto úseků odvozené primery jsou používány při metodách tzv. genomického fingerprintingu založených na PCR (rep-PCR). Pomocí nich lze odlišit prokaryotní organismy až na úroveň bakteriálních kmenů.

#### 2.2.5.2. *Molekulární techniky používané v současnosti*

Kromě metody PCR a modifikací PCR se používá repetitivní finger printing PCR (Louws *et al.* 1999) a RAPD (Random amplified polymorphic DNA analysis) (Momol *et al.* 1997), která umožňuje hodnotit vztahy mezi různými izoláty *E. amylovora*. (Momol *et al.* 1997, Manulis *et al.* 1998, Taylor and Hale 1998, Jeng *et al.* 1999, Momol *et al.* 1999, Merighi *et al.* 1999).

Brennan *et al.* (2002) zjistili, že fylogenetickým rozbořem RAPD profilů z irských izolátů *E. amylovora* bylo homogenních 44 z 65 vzorků, ale 21 bylo geneticky rozdílných od cizích *E. amylovora* izolátů. Rozdíly nebyly ve vztazích mezi genetickou variabilitou (analyzováno RAPD), hostitelskou rostlinou, rokem izolace nebo geografickým původem.

#### 2.2.5.2.1. *Polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace*

PCR je velmi používaná metoda s mnoha modifikacemi. Umožňuje velmi rychlou identifikaci. Výhoda metody PCR spočívá v tom, že například detekce a identifikace spály růžovitých může být přesně analyzována pomocí PCR za méně než 6 hodin. Pomocí oddělení PCR produktů na gelu v elektroforéze jsou fragmenty určeny, pokud je *E. amylovora* přítomna při PCR amplifikaci a přitom není nalezena DNA z ostatních patogenních bakterií. Další výhoda spočívá v tom, že viditelný specifický band, je produkován i při množství méně než 100 buněk *E. amylovora* (Bereswill *et al.* 1992, Bereswill *et al.* 1995).

PCR svou specifičností a citlivostí překovává mnohem více rozšířené sérologické metody. Diferenciace izolátů *E. amylovora* pomocí molekulární techniky umožňuje hodnotit genetickou diverzitu populace patogena. (Stiles *et al.* 1993) Detekční limit

se pro klasické PCR pohybuje v rozmezí 1- 4.10<sup>3</sup> CFU/ml, ale může být i 100 CFU/ml. Některé modifikace PCR (BIO-PCR) dosahují limitu až 10 CFU/ml (Shaad *et al.* 1988). Tyto výsledky představují 10-100 násobné zlepšení detekční citlivosti oproti sérologickým metodám (Bereswill *et al.* 1992).

#### **a) Klasické PCR**

V reakční směsi je jedna dvojice primerů specifických pro patogen, která amplifikuje jeden specifický produkt. U tohoto typu PCR je velmi problematická interpretace výsledků. Mohou se zde totiž projevat falešné negativní výsledky způsobené různými látkami inhibujícími PCR (Tsai and Olsen 1992, Powell *et al.* 1994), inhibujícími látkami používanými při izolaci DNA (Rossen *et al.* 1992) nebo špatně vyizolovanou DNA. Tyto problémy jsou různě řešeny v dalších modifikacích PCR.

Brennan (2002) hodnotil 83 bakteriálních DNA vzorků rodu *Erwinia* pomocí PCR a zjistil, že 75 vzorků produkovalo očekávanou velikost PCR produktů 1,6 kbp. Jak očekával, DNA izoláty z *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* ani *E. chrysanthemi* neprodukovaly amplifikační produkt o velikosti 1,6 kbp ani 1,9 kbp.

#### **b) Multiplex PCR**

V tomto případě jsou v reakční směsi použity dvě dvojice primerů. První z nich je specifická pro patogen a amplifikuje z jeho DNA specifický produkt. Druhá dvojice současně amplifikuje část DNA rostlinného hostitele. Tímto způsobem lze správně interpretovat negativní výsledek zapříčiněný špatnou izolací DNA. Po optimalizaci tohoto postupu bylo možno v rostlinném materiálu detekovat 2-20 CFU/ml (Chamberlain *et al.* 1998).

#### **c) Metoda rep-PCR (Repetitive sequence based PCR)**

Metoda je založena na amplifikaci úseků mezi konzervativními repetitivními oblastmi pomocí jednoho primeru BOX a dvou primerů ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (Seo *et al.* 2002) a REP, které byly na jejich základě odvozeny. Výsledek reakce je pro danou bakterii specifické spektrum PCR produktů tvořené současně rozdílnou velikostí jednotlivých amplifikačních produktů i jejich celkovým počtem. Po elektroforetickém rozdělení těchto fragmentů získáme vysoce specifické

tzv. DNA otisky (de Bruijn 1992, Versalovic *et al.* 1994, Louws *et al.* 1995, Rademaker and de Bruijn 1997, Rademaker *et al.* 1997). Tyto otisky se dále za účelem přesné identifikace organismu porovnávají s databází a na základě vzájemných podobností jsou vyhodnoceny. Otisky se ale také mohou porovnávat přímo mezi sebou. Toto se provádí zejména v případech, kdy je potřeba zjistit genetickou příbuznost v určité skupině izolátů nebo u vyšších taxonomických stupňů. Seo *et al.* (2002) použili ERIC PCR pro identifikaci a určení genetické variability *E. c. subsp. carotovora* a *E. chrysanthemi*.

#### 2.2.5.2.2. Hybridizační techniky

Jsou to metody založené na vyhledávání specifického úseku DNA komplementárního k sekvenci značné sondy (radioaktivní, neradioaktivní). Jsou snadno proveditelné a lze jimi testovat relativně velké množství vzorků (zejména při dot-blot hybridizaci). Jejich detekční limit je  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml (Rademaker *et al.* 1992)

##### **a) Dot-blot hybridizace**

Jedná se o jednoduše proveditelnou techniku, kde se testovaná DNA z hrubého lyzátu bakterií nebo rostlinných pletiv nanese přímo na nylonovou nebo nitrocelulózovou membránu. Dot-blot hybridizace proto, protože se jednotlivé vzorky nanášejí v podobě teček (puntíků = dots). Fessehaie *et al.* (2003) používali tuto metodu pro identifikaci *E. c. subsp. atroseptica*, *E. c. subsp. carotovora* a *E. chrysanthemi*.

##### **b) Southern hybridizace**

Při tomto postupu se nejdříve provádí elektroforetické rozdělení testované DNA (restrikční fragmenty, PCR produkty). Tato DNA se následně různými způsoby (např. elektroblotting) přenese na membránu. Tato metoda se využívá při ověřování správnosti PCR produktu (Makivalkama and Karjalainen 1994).

##### **c) FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)**

Tato hybridizační technika využívá krátkých oligonukleotidových sond (16S rDNA), které mají po částečném narušení buněčné membrány lysozymem schopnost pronikat do vnitřku buněk a zde hybridizovat. Výsledek se následně



vyhodnocuje mikroskopicky. Tek *et al.* (2004) takto hybridizovali *E. c. subsp. atroseptica*.

#### 2.2.5.2.3. Sekvenování

Pro sekvenování byly vyvinuty dvě metody: (1) Sangerova (1977), která využívá syntézy komplementárního řetězce DNA polymerázami *in vitro*, přerušované náhodně v místě jednotlivých bazí a (2) Maxam-Gilbertova (1977), při které se chemicky štěpí DNA v místě určitých bazí. V obou případech vzniká směs různě dlouhých jednořetězcových fragmentů, končících v místě určité baze (např. G). Elektroforézou na velmi hustém polyakrylamidovém gelu (PAGE) (který rozliší i jednobazové rozdíly v délce těchto fragmentů) lze zjistit, jak daleko od začátku tato baza byla.

Je třeba rozlišit sekvenování krátkých úseků, kdy většinou jen potvrzujeme korektní pořadí nukleotidů po určitých úpravách ve víceméně známé sekvenci, a sekvenování neznámých větších genomů (Richard and Reece 2004, Andrews 1988).

### 2.2.6. Elektroforetické metody

Jedná se o techniku používanou k separaci nukleových kyselin. K provedení je potřebná elektroforetická vana s elektrodami, gel (v němž proběhne separace) a zdroj stejnosměrného proudu. DNA migruje od záporného ke kladnému pólu, rychlost migrace je dána jejími vlastnostmi, zejména velikostí, vlastnostmi gelu, pufru a napětím. Fragmenty DNA, lišící se velikostí, migrují různou rychlostí, větší molekuly a molekuly se složitější strukturou jsou pomalejší.

Při agarózové elektroforéze se gel připraví rozvařením agarózy, což je polysacharid z mořských řas ve vhodném pufru. Směs se nalije do vaničky a nechá se vychladnout. Jamky pro nanesení vzorků se vytvoří tak, že do nalitého, ještě horkého gelu se umístí hřebeny, šířka jejich zubů potom určuje velikost jamky. Výhodou je snadná manipulace a relativně nižší cena.

V polyakrylamidové elektroforéze se jako separační médium používá akrylamid, jenž polymerizuje ve směsi s bis-akrylamidem za přítomnosti polymerizačních činidel. Gel se nalije mezi skla, nasadí se hřebeny pro vytvoření jamek pro nanesení vzorku a nechá se zpolymerizovat. Výhodou této metody je, že má velkou rozlišovací schopnost;

na gel se může nanést velké množství vzorku a DNA, kterou z gelu zpětně vyizolujeme, je velmi čistá. Dvě základní varianty polyakrylamidové elektroforézy jsou denaturační a nedenaturační. Při denaturační gel obsahuje denaturační činidlo, většinou močovinu. Při použití denaturačního činidla se molekuly dsDNA denaturují na ssDNA. Toto se využívá při genotypizaci mikrosatelitů a sekvenování, a fragmenty DNA se vizualizují barvením stříbrem. Při nedenaturační elektroforéze je rychlost migrace dsDNA ovlivněna rovněž její konformací, proto není vhodná pro určování velikosti molekul, výhodou je však možnost barvení ethidium bromidem (Řehout et al. 2005).

### 3. CÍL PRÁCE

- 1) Vytvořit rozsáhlou sbírku bakteriálních kultur rodu *Erwinia*, především pak druhu *Erwinia amylovora*, pocházejících z různých hostitelských rostlin tuzemské a zahraniční provenience.
- 2) Vyzkoušet různé způsoby získávání genomové DNA pro následnou amplifikaci (izolace bakteriální DNA pomocí lysozymu, bakteriální lyzát, čistá bakteriální kultura) a vzájemné porovnání výhod a nevýhod.
- 3) Po vyizolování genomové DNA z těchto získaných bakteriálních kultur tyto kmeny otestovat v PCR s příslušnými specifickými primery a tím potvrdit, zda-li se jedná ve všech případech o bakteriální kulturu *Erwinia amylovora*.
- 4) Následně tuto vyizolovanou DNA použít v rep-PCR s primery BOX A1R a ERIC1, ERIC2R (modifikace standardního postupu PCR využívající repetitivních sekvencí v prokaryotickém genomu), za účelem stanovení genetické variability druhu *Erwinia amylovora* na úrovni genomové DNA.
- 5) Osekvenovat vybrané izoláty *Erwinia amylovora* tuzemské i zahraniční provenience z různých hostitelských rostlin s následným porovnáním jejich sekvencí.
- 6) Zoptimalizovat amplifikační reakci detekčních metod (rep-PCR) s primery BOX A1R a ERIC1, ERIC2R.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Bakteriální kmeny

Použité bakteriální kmeny v diplomové práci (Tab. 1 a 2) byly získány z Výzkumného ústavu rostlinné výroby (VÚRV) v Praze-Ruzyni. Všechny bakterie byly za účelem dlouhodobého uchování zamrazeny při  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v tekutém C-médiu obsahujícím 15 % sterilního glycerolu nebo byly lyofilizovány a skladovány při pokojové teplotě. Bakterie jsme kultivovali na MPA(g) půdách při stálé teplotě  $22\text{-}24\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1-2 dnů. Po ukončení kultivace byly bakterie pro další použití uchovávány v lednici při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2. Živná média

<b><u>Složení MPA(g)/l půdy:</u></b>	živný agar číslo 2.....	40 g
	glukóza (sacharóza) .....	10 g
	bacto yeast extract .....	5 g
	agar .....	20 g

pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí 1M NaOH. Tuto živnou půdu jsme použili ke kultivaci všech kmenů použitých v diplomové práci (Tabulka 1 a 2).

<b><u>Složení King B/l půdy</u></b>	bacto trypton (pepton).....	20 g
	glycerol .....	10 g
	hydrogen fosforečnan draselný...1,5 g	
	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	1,5 g

pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí 1M NaOH. Půdu King B je možné použít jako selektivní médium, které je určeno na podporu tvorby zelenavého pigmentu fluorescentních pseudomonád. Spálové bakterie na tomto médiu vytváří bílé vypouklé lesklé kolonie a dají se proto velmi dobře odlišit od plochých fluorescentních

pseudomonád (*P. syringae* pv. *syringae*), které např. u hrušně nebo jiných rostlin vyvolávají obdobné příznaky jako *E. amylovora* (Kúdela 1990).

### **4.3. Různé způsoby získávání genomové DNA pro následnou amplifikaci**

Vzhledem k tomu, že izolace bakteriální DNA pro následnou amplifikaci, klonování, sekvenování a jiné činnosti je časově i pracovně dosti náročná a při zpracování většího počtu bakteriálních vzorků tedy celkem dosti zdlouhavá, ověřovali jsme proto i některé další možnosti, méně časově i pracovně náročné, pro získání materiálu pro následnou amplifikaci. Jednalo se o použití bakteriálního lyzátu a o použití čisté bakteriální kultury přenesené párátkem z Petriho misky přímo do PCR reakční směsi. Všechny tři způsoby byly použity jak v normálním PCR, tak i v rep-PCR s primerem BOXA1R.

#### **4.3.1. Izolace bakteriální DNA**

Při izolaci jsme využívali princip narušení membrány proteolytickými vlastnostmi enzymu lysozymu. (Fotografie 1).

Genomovou DNA jsme izolovali následujícím postupem:

- 1) malé množství bakteriální kultury pěstované na Petriho miskách, na MPA(g) půdě, jsme přenesli do eppendorfky se 100  $\mu$ l 1x TE pufru
- 2) zhomogenizovali a přidali jsme 100 $\mu$ l roztoku lysozymu (čerstvě připravený 0,010 g + 100  $\mu$ l 1x TE)
- 3) přidali jsme 800  $\mu$ l 1x TE, promíchali, umístili na 10 minut při 37 °C
- 4) eppendorfky jsme centrifugovali 2 minuty při 15 000 g při 4 °C, supernatant jsme odstranili
- 5) přidali jsme 300  $\mu$ l 1x TE a důkladně zhomogenizovali,
- 6) přidali jsme 100  $\mu$ l SDS, promíchali a nechali několik minut lyzovat
- 7) přidali jsme 200  $\mu$ l K<sup>+</sup> nebo Na<sup>+</sup> acetátu, promíchali a centrifugovali 5 minut při 18 000 g při 4 °C

- 8) supernatant bez sraženin jsme přenesli do čisté eppendorfky (pro přečištění)
- 9) centrifugovali jsme 3 minuty při 18 000 g a 4 °C a čistý supernatant přemístili do nové čisté eppendorfky
- 10) přidali jsme stejný objem 100 % izopropanolu a promíchali otáčením eppendorfky
- 11) pokud se nevytvořila sraženina čisté DNA, nechali jsme srážet směs 10 minut při teplotě -20 °C (je možné nechat v mrazícím boxu několik hodin)
- 12) centrifugovali jsme 5 minut při 18 000 g a 4 °C
- 13) supernatant jsme odstranili, pelet promyli 70 % ethanolem, vysušili při 65 °C
- 14) vysušenou čistou DNA jsme rozpustili ve 100 µl 1x TE

Vyizolovanou genomovou DNA jsme analyzovali pomocí elektroforezy na agarozovém gelu za použití barviva Sybr Green a markeru 100 bp DNA Step Ladder (Promega).

#### **4.3.2. Použití čisté bakteriální kultury**

Kolonie na živném médiu jsme nechali růst po dobu dvou až třech dnů při teplotním optimu 27 °C. Poté z těchto typicky krémově bílých, vypouklých, lesklých, mukoidních kolonií jsme odebrali špičkou párátko velice malé množství bakteriální kultury a přenesli do reakční směsi PCR a jejích modifikací.

Vše je nutné dělat v naprosto aseptických podmínkách po předchozí dokonalé desinfekci flow-boxu. Je též nutné mít tato párátko vyklávaná.

#### **4.3.3. Příprava bakteriálního lyzátu**

- 1) bakteriální kulturu jsme odebrali párátkem z Petriho misky a přenesli do 70 µl pufru 1x TE.
- 2) nechali jsme tuto směs zamrazit při -60 až -70 °C po dobu alespoň 30 minut (nebo přes noc)
- 3) po vyjmutí z mrazícího boxu jsme vzorky povařili po dobu 10 minut
- 4) poté jsme vzorky rychle přemístili do namražených kovových heat bloků v mrazícím boxu
- 5) tyto vzorky jsme centrifugovali při 13 000 g po dobu 30 sekund a při 4 °C

- 6) poté jsme takto lyzovanou bakteriální kulturu přenesli do reakční PCR směsi

#### 4.4. Elektroforéza

Používali jsme jak agarózovou, tak polyakrylamidovou elektroforézu. Polyakrylamidová elektroforéza je mnohem náročnější na čas (několikahodinová metoda) a rovněž na pracovní zatížení. Agarózová elektroforéza je velice snadná a rychlá (30 minut). Neshledali jsme výrazné rozdíly v rozlišení profilů na gelu, proto jsme polyakrylamidovou elektroforézu přestali používat. Agarózová elektroforéza se jevila jako velice nenáročná, cenově dostupnější a se srovnatelnými výsledky. Veškerý přiložený fotografický materiál je získán za použití agarózové elektroforézy.

#### 4.5. Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Všechny PCR reakce byly prováděny na termocyklerech Minicycler (MJ Research) a GenAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer). DNA vyizolovaná dříve uvedeným způsobem byla podle potřeby okamžitě použita pro následnou amplifikaci, nebo zamrazena při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

V PCR reakci jsme použili vlastní primery Ea f72 a Ea r560 určené pro detekci plasmidu pEa29 nacházejícím se v *E. amylovora* s očekávanou velikostí amplifikačního produktu 0,5 kbp (Fotografie 2).

Použitý **PPP Master Mix** od firmy Top-Bio, Czech Republic, obsahuje:

- 150 mM Tris HCl s pH 8,8
- 40 mM (NM4)2SO4
- 0,02 % Tween 20
- 5 mM MgCl2
- 400  $\mu\text{M}$  dTTP
- 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy
- stabilizátory, aditiva

#### **Reakční směs PCR** (v celkovém objemu 20 µl)

- PPP Master Mix.....10,0 µl
- primery Ea f72 a Ea r560 (20 pmol/µl) po .....0,5 µl
- bakteriální kultura (na špičku párátko) nebo vyizolovaná DNA ..1,0 µl
- destilovaná voda .....8,0 µl

#### **Sled reakcí amplifikačního programu pro primery Ea f72 a Ea r560**

- 1) úvodní denaturace .....95 °C/5 minut
- 2) denaturace..... 94 °C/1 minuta
- 3) annealing.....69 °C/40 sekund
- 4) extenze..... 72 °C/2 minuty
- 5) krok 2) až 4) opakovat..... 40x
- 6) celková syntéza řetězce .....72 °C/15 minut
- 7) chlazení..... 4 °C

## **4.6. BOX PCR**

#### **Reakční směs BOX PCR** (v celkovém objemu 25 µl)

- PPP Master Mix .....12,5 µl
- primer BOX A1R (20 pmol/µl) .....3,0 µl
- bakteriální kultura (na špičku párátko) nebo vyizolovaná DNA ..1,0 µl
- destilovaná voda .....8,5 µl

#### **Průběh reakce BOX PCR**

- 1) úvodní denaturace .....96 °C/5 minut
- 2) denaturace .....94 °C/1 minuta
- 3) annealing .....50 °C/1 minuta
- 4) extenze .....65 °C/8 minut
- 5) krok 2) až 4) opakovat .....35x
- 6) celková syntéza řetězce .....65 °C/16 minut
- 7) chlazení .....4 °C



## 4.7. ERIC PCR

### Reakční směs ERIC PCR (v celkovém objemu 25 µl)

- PPP Master Mix .....12,5 µl
- primer ERIC 1 (20 pmol/µl) .....1,5 µl
- primer ERIC 2R (20 pmol/µl) .....1,5 µl
- bakteriální kultura (na špičku párátka) nebo vyizolovaná DNA..1,0 µl
- destilovaná voda .....8,5 µl

### Průběh reakce ERIC PCR

- 1) úvodní denaturace .....95 °C/5 minut
- 2) denaturace .....94 °C/1 minuta
- 3) annealing .....45 °C/1 minuta
- 4) extenze ..... 65 °C/5 minut
- 5) krok 2) až 4) opakovat .....35x
- 6) celková syntéza řetězce .....65 °C/10 minut
- 7) chlazení .....4 °C

## 4.8. Příprava amplifikačních produktů pro sekvenační PCR

V bakteriích *Erwinia amylovora* je všeobecně přítomen plazmid označovaný jako pEa29. Uvažovali jsme část tohoto plazmidu osekvenovat za účelem zjištění možných rozdílů v jeho sekvenci u bakteriálních kmenů *E. amylovora* pocházejících z různých hostitelů a lokalit osekvenovat pomocí dvou dvojic různých primerů – pEa1 a pEa2 (Bereswill *et al.* 1992) a Ea f72 a Ear560 (vlastní primery navržené pro detekci tohoto plazmidu v naší laboratoři). Vyizolovanou bakteriální DNA těchto níže uvedených osmi kmenů *E. amylovora*, jsme proto před samotným sekvenačním PCR amplifikovali těmito dvěma výše uvedenými dvojicemi primerů s tím, že amplifikační produkty následně osekvenujeme.

Složení reakční směsi PCR pro amplifikaci s použitím primerů Ea f72 a Ea r560 a amplifikační program jsou uvedeny v kapitole 4.5. PCR. Pro PCR s primery pEa1 a pEa2 pak byla změněna pouze teplota annealingu na 58 °C.

Pro amplifikaci byla použita vyizolovaná DNA z následujících kmenů *E. amylovora*:

- 1) Ea 5017 z hlohu, z východních Čech
- 2) Ea 5024 ze skalníku, z jižní Moravy
- 3) Ea 5025 z hrušně, ze středních Čech
- 4) Ea 5031 z jabloně, ze severozápadních Čech
- 5) Ea CCM 1196 z hlohu, z Velké Británie
- 6) Ea IVIA 1525-6 ze skalníku, ze Španělska
- 7) Ea NCAIM 1617 lidského původu, z Maďarska
- 8) Ea 8903 (Ea 27NSR) z hlohu, z Německa

#### **4.9. Přečištění PCR produktu pro sekvenační PCR**

Přečištění naamplifikované DNA od nespotřebovaných primerů a jiných příměsí je nutné pro následné sekvenování.

K přečištění DNA jsme použili **Gen Elute PCR Clean – Up Kit (Sigma)** podle následujícího postupu:

- 1) připravili jsme si kolonku Binding Column a přidali 500  $\mu$ l Column preparation solution a centrifugovali jsme tyto kolonky při 18 000 g 1 minutu při 4 °C
- 2) k jednomu objemu PCR amplifikátu jsme přidali 5 objemů Binding Solution, zamíchali a centrifugovali při 16 000 g 1 minutu při 4 °C a odstranili tekutinu, která protekla membránou
- 3) do Binding Column jsme přidali 500  $\mu$ l Wash Solution (ředěný ethanolem), centrifugovali při 16 000 g 1 minutu při 4 °C a odstranili tekutinu, která protekla membránou
- 4) centrifugovali jsme opět při 16 000 g 2 minuty při 4 °C bez přidání dalších složek a přemístili do nové kolonky Collection tube
- 5) přidali jsme 50  $\mu$ l Elution solution a tím jsme vymyli DNA z membrány
- 6) centrifugovali jsme při 16 000 g 1 minutu při 4 °C

PCR produkt je nyní připraven v eluátu k okamžitému použití nebo k uchování při -20 °C.

Tato metoda se nám příliš neosvědčila (nedokonalé přečištění) a z toho důvodu jsme zvolili jiný postup. Z agarozového gelu jsme vyřízli zřetelný proužek (band) naamplifikované DNA. K purifikaci jsme využili **Gen Elute Minus EtBr Spin Columns (Sigma)** podle následujícího postupu:

- 1) vyřízli jsme band z agarozy
- 2) band jsme dali do kolonky a přidali 600  $\mu$ l pufru 1x TE
- 3) centrifugovali jsme při 3000 g 30 sekund při 4 °C a odstranili proteklý pufr 1x TE
- 4) agarozový gel jsme rozbili
- 5) centrifugovali jsme při 16 000 g po dobu 20 minut při 4 °C
- 6) získaný eluát jsme analyzovali na agarozovém gelu

Takto přečištěnou DNA jsme použili v následujícím sekvenačním PCR.

#### 4.10. Sekvenační PCR a vlastní sekvenování

Připravili jsme si sekvenační reakci (složení uvedeno níže) s primery Ea f72, Ea r560 a pEa1, pEa2 (použity jako forward nebo reverse primery) určenými pro detekci plasmidu *E. amylovora*. Těmito primery jsme osekvenovali celkem 7 výše uvedených kmenů (1 kmen nezařazen) tuzemské a zahraniční provenience z různých hostitelských rostlin. K sekvenačnímu PCR jsme použili Minicycler MJ Research.

Vzhledem k menší časové náročnosti a nižší pracnosti jsme se rozhodli, že provedeme osekvenování amplifikačního produktu a nebudeme provádět jeho zaklonování do plasmidu.

Po ukončení sekvenačního PCR jsme vzniklý produkt přesráželi dle níže uvedeného postupu a poté předali k osekvenování.

Vlastní sekvenování proběhlo metodou dle Sangera (1977) na sekvenátoru značky ABI 3130 (s kapilárou 50 cm), který je součástí vybavení Ústavu molekulární biologie rostlin, laboratoře genomiky. Byl použit ABI PRISM Big Dye Terminator 1.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenační polymer POP 7.

Získané sekvence byly vyhodnoceny počítačovou analýzou pomocí programu Sequencing analysis 5.2. Srovnání sekvenačních dat z některých izolátů, bylo provedeno

pomocí programu AlignX od firmy Informax. Výsledné grafické znázornění sekvenačních dat z několika izolátů bylo programem vyexportováno do souboru pdf.

#### **Složení sekvenační PCR reakce** (v celkovém objemu 20 $\mu$ l)

- Ready reaction Mix..... 4,0  $\mu$ l
- Big Dye Terminator v 1.1/3.1 Sequencing Buffer  
(Tris- Cl 200 mM, MgCl<sub>2</sub>25mM).....6,0  $\mu$ l
- primer (20 pmol/ $\mu$ l) .....1,0  $\mu$ l
- PCR produkt (zřetelný amplikon na agaroze) .....3,0  $\mu$ l
- destilovaná voda .....6,0  $\mu$ l

#### **Průběh sekvenační PCR reakce**

- 1) úvodní denaturace .....96 °C/10 sekund
- 2) annealing ..... 55 °C/ 5 sekund  
(v závislosti na použitém primeru)
- 3) extenze .....60 °C/4 minuty
- 4) krok 1) až 3) opakovat .....30x
- 5) celková syntéza řetězce .....60 °C/5 minut
- 6) chlazení .....4 °C

#### **Srážení produktu po amplifikaci**

- 1) k amplifikátu jsme přidali 20  $\mu$ l destilované vody a 60  $\mu$ l 10 % izopropanu a opatrně jsme směs vortexovali
  - 2) nechali jsme srážet při pokojové teplotě po dobu 15-30 minut
  - 3) eppendorfky s označenou orientací jsme centrifugovali po dobu 20 minut při otáčkách 18 000 g a 4 °C
  - 4) opatrně jsme odstranili supernatant, sediment může a nemusí být viditelný
  - 5) přidali jsme 250  $\mu$ l 75 % izopropanolu do eppendorfky a krátce vortexovali
  - 6) centrifugali jsme ve stejné orientaci jako v kroku 3) při 18 000 g 5 minut a 4 °C
  - 7) odebrali jsme opatrně supernatant jako v kroku 4)
  - 8) sediment jsme sušili vakuově po dobu 10-15 minut
- Takto přesrážený produkt po sekvenačním PCR jsme předali k osekvenování DNA.

## **5. VÝSLEDKY A DISKUSE**

### **5.1. Izolace bakteriální DNA pomocí lysozymu, použití bakteriálního lyzátu a čisté bakteriální kultury pro následné PCR**

Pomocí metody izolace DNA s použitím enzymu lysozymu jsme vyizolovali genomovou DNA z celé sbírky bakteriálních kmenů (Tab. 1). Izolace tímto způsobem se jevila jako dobře použitelná, relativně nenáročná na vybavení a jako velice spolehlivá. Za povšimnutí stojí fakt, že nebyl ve všech případech po elektroforetické analýze na agarozovém gelu patrný proužek (band) vyizolované genomové DNA, což svědčí o nízkém výtěžku DNA při izolaci (Fotografie 1). Avšak i tento nízký výtěžek vyizolované genomové DNA postačoval k tomu, aby amplifikace proběhla a amplifikační produkt byl na agarozovém gelu zcela zřetelně viditelný (Fotografie 2). Výsledky této amplifikace potvrdily, že se ve všech případech jedná o bakteriální kulturu *E. amylovora*, neboť výsledný amplifikační produkt měl velikost cca 0,5 kbp, což odpovídá očekávanému výsledku.

Nevýhoda izolace DNA s použitím enzymu lysozymu spočívala ve větší časové náročnosti a ve větším objemu práce. Proto jsme vyzkoušeli ještě další dvě metody, méně časově i pracovně náročné, za účelem získání genomové DNA pro následnou amplifikaci. Připravili jsme si (1) bakteriální lyzát a použili jsme (2) čistou bakteriální kulturu odebranou párátkem přímo z Petriho misky. Při použití všech způsobů v následném PCR a v rep-PCR s primerem BOX A1R bylo patrné, že není větších rozdílů ve výsledné reakci při použití jednotlivých variant (Fotografie 6 a 7).

### **5.2. Metoda rep - PCR s použitím primeru BOX A1R**

Metoda rep - PCR s použitím primeru BOX A1R se ukázal jako postup velice dobře použitelný, jednoduchý a umožňující dobře zhodnotit vzniklý profil.

Nicméně se tímto postupem neprokázala genetická variabilita u sledovaných bakteriálních kmenů *E. amylovora* (Fotografie 3). Z tohoto důvodu jsme použili variantu s primery ERIC1 a ERIC2R.

### **5.3. Metoda rep - PCR s použitím primerů ERIC1 a ERIC2R**

Ani v tomto případě se neprokázala genetická variabilita u sledovaných kmenů *E. amylovora* (Fotografie 4). Vzhledem k tomu, že rep-PCR s primerem BOX A1R a ani následně prováděné rep-PCR s primery ERIC1 a ERIC2R nepotvrdilo u 70 testovaných vzorků *E. amylovora* genetickou variabilitu na úrovni DNA, nemělo význam tyto sledované kmeny analyzovat clusterovou analýzou s následným vytvořením dendrogramu. Tuto problematiku bude pravděpodobně nezbytné studovat na úrovni RNA, či bude nutné použít jinou metodu, např. pulsní elektroforezu (PFGE).

Z tohoto důvodu jsme přistoupili k další možnosti zjištění genetické odlišnosti mezi jednotlivými izoláty *E. amylovora*, a to pomocí sekvenování.

### **5.4. Příprava amplifikačních produktů pro sekvenační PCR a sekvenační PCR**

Vzhledem k tomu, že pomocí technik rep-PCR s použitím primerů BOX A1R a ERIC1, ERIC2R jsme na úrovni genomové DNA žádnou genetickou variabilitu uvnitř druhu *E. amylovora* nezjistili, osekvenovali jsme část tohoto plazmidu za účelem zjištění možných rozdílů v jeho sekvenci u bakteriálních kmenů *E. amylovora* pocházejících z různých hostitelů a lokalit. Při sekvenování jsme použili dvě dvojice různých primerů (jako forward či reverse primer) pEa1 a pEa2 (Bereswill *et al.* 1992), a Ea f72 a Ea r560 (vlastní primery navržené v laboratoři) navržených pro detekci plazmidu.

Vyizolovanou bakteriální DNA (viz kmeny *E. amylovora* 1-8 v kap. 4.8. Příprava amplifikačních produktů pro sekvenační PCR) jsme proto před samotným sekvenačním PCR amplifikovali těmito dvěma výše uvedenými dvojicemi primerů s tím, že amplifikační produkty následně osekvenujeme. Všech osm kmenů *Ea* zařazených do standardního PCR reagovalo pozitivně s primery Ea f72 a Ea r560, s další dvojicí primerů pEa1 a pEa2 pak nereagoval jeden bakteriální kmen, a to *Ea* NCAIM 1617. PCR

jsme zopakovali se stejným výsledkem. Při zařazení další dvojice primerů – Ea1 a Ea2 (Bereswill *et al.* 1995), které jsou však navrženy pro detekci genomové DNA výše zmiňované bakterie, jsme obdrželi opět pozitivní výsledek u všech testovaných bakteriálních kmenů. Tato skutečnost může být způsobena tím, že výše uvedený bakteriální kmen *Ea* NCAIM 1617 je lidského původu a ostatní testované kmene *Ea* byly původu rostlinného. Tímto může být způsobena i rozdílná sekvence již výše zmiňovaného plazmidu pEa29 u bakteriálních kmenů *Ea* rostlinného a živočišného původu. Nabízí se možnost, že dvojice primerů pEa1 a pEa2 na plazmidu nenachází místo vhodné k navázání a z tohoto důvodu v tomto případě nedochází k pozitivní PCR reakci. Tato problematika vyžaduje další hlubší zkoumání. Existuje několik možností dalšího řešení. Jednou z těchto alternativ je například izolace plazmidu z kmene *Ea* rostlinného původu a jeho vnesení do kmene *Ea* původu živočišného s následnou PCR reakcí s primery pEa1 a pEa2.

Z časových a technických důvodů (nefunkčnost primerů pEa1 a pEa2) jsme proto izolát NCAIM 1617 z dalšího sekvenování vyřadili a bude mu věnována pozornost v dalším průběhu výzkumu.

## 5.5. Sekvenování

Chromatogram (záznam sekvence) amplifikačního produktu kmene *Ea* CCM 1196 osekvenovaného pomocí primerů *Ea* f72 (forward) a *Ea* r560 (reverse) je uveden jako obr. 6 a 7. Sekvence byly zobrazeny pomocí počítačového programu Chromas.

Ze srovnání sekvenačních fragmentů z některých izolátů *E. amylovora* (Obr. 8) je patrné, že všechny kmene mají téměř totožnou nukleotidovou sekvenci ve sledované oblasti. Drobné odchylky mohou být způsobeny nedokonalým přečištěním templátu před samotným sekvenačním čtením (zbytky značených terminatorových nukleotidů) nebo chybami způsobenými dalšími vlivy (kvalita a čistota templátové DNA). Tuto naši hypotézu potvrzuje i to, že sledovaný úsek DNA kóduje gen pro bakteriální replikázu A (*repA*), o němž můžeme předpokládat, že bude mezi izoláty jednoho bakteriálního druhu (*Erwinia amylovora*) vysoce konzervován.

## 6. ZÁVĚR, VÝZNAM PRO PRAXI

Podařilo se nám vytvořit rozsáhlou sbírku (70 kmenů) bakteriálních kultur *Erwinia amylovora* z různých hostitelských rostlin a různého geografického zastoupení. Výsledky amplifikace potvrdily, že se ve všech případech jedná o bakterii *Erwinia amylovora* (Fotografie 2).

Pomocí technik rep-PCR (primery BOX A1R, ERIC1 a ERIC2R) jsme na úrovni genomové DNA nezjistili genetickou variabilitu u druhu *E. amylovora* mezi izoláty pocházejícími z různých hostitelských rostlin ani mezi izoláty *E. amylovora* tuzemské provenience pocházejících z různých oblastí ČR a rovněž nikoliv mezi izoláty *E. amylovora* tuzemskými a zahraničními.

Pro analýzu genetické variability kmenů *E. amylovora* na úrovni DNA nebude tato technika rep-PCR vhodná, proto pravděpodobně bude vyžadovat jinou metodu, např. analýzu pomocí pulsní elektroforézy (PFGE).

Zjistili jsme, že se plazmid pEa29 svou sekvencí zřejmě odlišuje u kmenů *E. amylovora* rostlinného původu a kmenů *E. amylovora* původu živočišného.

Do reakční směsi PCR a PCR modifikací (s použitím primerů BOX A1R a ERIC1 a ERIC2R – Fotografie 3 a 4) jsme použili nejen čistou genomovou DNA vyizolovanou pomocí lysozymu (Fotografie 1), ale i bakteriální lyzát a čistou, čerstvě narostlou bakteriální kulturu odebranou párátkem přímo z Petriho misky, následně resuspendovanou přímo v eppendorfci s reakční směsí PCR. Izolace DNA pomocí lysozymu, ve srovnání s ostatními námi uvažovanými metodami pro získání genomové DNA, je velmi časově náročná a nejpracnější. Použití bakteriálního lyzátu se ukázalo jako méně časově náročné.

Při použití čisté bakteriální kultury, přidané špičkou párátku přímo z Petriho misky, jsme zcela vynechali několikahodinovou metodu izolace genomové DNA. Fotografické doklady ukazují, že očekávaný výsledek je srovnatelný a jasně zřetelný (Fotografie 6 a 7). V této skutečnosti spatřujeme velký význam v podobě ušetřeného času a vynaložené práce. Je nutné podotknout, že pro použití této metody, kdy přidáváme přímo bakteriální kulturu do PCR reakční směsi, je třeba použít kvalitní specifické primery a celou PCR reakci mít řádně odzkoušenou.

Po osekvenování několika izolátů *E. amylovora* a následném porovnání sekvencí je zřejmé, že tyto kmeny mají víceméně shodnou nukleotidovou sekvenci ve sledované



oblasti. Drobné odchylky mohou být způsobeny technickými chybami (nedokonalé přečištění templátu, kvalita a množství templátové DNA).

Podařilo se nám nalézt optimální složení jednotlivých komponent (templátová DNA, koncentrace a množství primerů BOX A1R a ERIC1, ERIC2R, množství bakteriálního lyzátu či bakteriální kultury, aj.) v rep-PCR reakci tak, aby výsledky tohoto PCR byly naprosto jednoznačné a dobře rozlišitelné na agarosovém gelu.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- **Andrews A.T. (1988)** Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications. Oxford University Press, New York, pp. 452.
- **Anonym (1996)** Hniloby hlíz brambor ve skládkách. *Agro ochrana rostlin*. Awecom spol. s r.o. 8: 25.
- **Anonym (2001)** Biologickými metodami proti spále. *Rostlinolékař* 12 (3): 29.
- **Anonym (2005)** [http://www.srs.cz/portaldoc/skodlive\\_organismy/monitoring\\_so\\_na\\_uzemi\\_cr/monitorovaci\\_zpravy\\_o\\_vyskytu\\_so/2005/mokrhnilhliz20.gif](http://www.srs.cz/portaldoc/skodlive_organismy/monitoring_so_na_uzemi_cr/monitorovaci_zpravy_o_vyskytu_so/2005/mokrhnilhliz20.gif) (20.3.2006).
- **Anonym (2006)** [http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia\\_amylovora/ERWIAM\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_amylovora/ERWIAM_map.htm) (14.2.2006).
- **Anonym (2006)** [http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia\\_chrysanthemi/ERWICH\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_chrysanthemi/ERWICH_map.htm) (14.2.2006).
- **Anonym (2006)** <http://www.feuerbrand.ch/medien/images/merkblatt/eapetri.jpg> (11.4.2006).
- **Anonym (2006)** <http://www.apsnet.org/education/IntroPlantPath/Topics/plantdisease/images/fig22.jpg> (11.4.2006).
- **Anonym (2006)** <http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extension/tfabp/factshts/pome/firepm/firecyc.jpg> (11.4.2006).
- **Anonym (2006)** [http://www.gartenbauvereinedon.de/aktuelles/feuerbrand/akt\\_3\\_1.jpg](http://www.gartenbauvereinedon.de/aktuelles/feuerbrand/akt_3_1.jpg) (11.4.2006).
- **Anonym (2006)** <http://www.sanger.ac.uk/Info/News-releases/gfx/040720-erwinia-300.jpg> (11.4.2006).

- **Anonym (2006)** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome&cmd=search&term=%22Erwinia+atroseptica%22> (25.5.2006).
- **Anonym (2006)** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=genome> (25.5.2006)
- **Anonym (2006)** [http://www.sanger.ac.uk/Projects/E\\_amylovora/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_amylovora/) (8.4.2006).
- **Baker K.F. (1971)** Fire blight of pome fruits: the genesis of the concept that bacteria can be pathogenic to plants. *Hilgardia* 40: 603-633.
- **Bell K.S., Sebaihia M., Pritchard L., Holden M.T.G., Hyman L.J., Holeyva M.C., Thomson N.R., Bentley S.D., Churcher L.J.C., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Quail M.A., Sanders M., Walker D., Whitehead S., Salmond G.P.C., Birch P.R.J., Parkhill J., Toth I.K. (2004)** Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (30): 11105-11110.
- **Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K. (1992)** Sensitive and species-specific detection of *E. amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (11): 3522-3526.
- **Bereswill S., Bugert P., Bruchmüller I., Geider K. (1995)** Identification of the Fire Blight Pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR Assays with Chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (7): 2636-2642.
- **Bochner B.R. (1989)** Sleuthing out bacterial identities. *Nature* (London) 339: 157-158.
- **Bömeke H. (1972)** Noch einmal Feuerbrand. *Gesunde Pfl.* 24: 184-190.

- **Brennan J.M., Doohan F.M., Egan D., Scanlan H., Hayes D. (2002)** Characterization and Differentiation of Irish *Erwinia amylovora* Isolates. *Phytopathology* 150: 414-422.
- **Crosse J.E., Bennett M., Garret C.M.E. (1958)** Fire blight of pear in England. *Nature* (London) 182: 1530.
- **De Bruijn F.J. (1992)** Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187.
- **Donat V., Biosca E., Rico A., Peñalver J., Borrueal M., Berra D., Basterretxea T., Murillo J., López M. (2005)** *Erwinia amylovora* strains from outbreaks of fire blight in Spain: phenotypic Characteristics. *Annals of Applied Biology.* 146: 105-114.
- **Fessehaie A., De Boer S.H., Levesque C.A. (2003)** An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology* 93 (3): 262-269.
- **Hausvater E. (2002)** Skládkové choroby brambor a problémy při skladování v sezóně 2001/2002. *Agro – ochrana, výživa, odrůdy.* ORIN spol. s r.o. České Budějovice. 7 (1): 14.
- **Hayward A.C., Waterston J.M. (1998)** *Erwinia amylovora* IMI Description.
- **Chamberlain J.S., Gibbs R.A., Ngyen P.N., Caskey C.T. (1998)** Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141-11156.

- **Jeng R.S., Beliaeva L., Syircev A.M., Myers A.L., Hubbes M. (1999)** The use of 16S 23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *E. amylovora*. *Acta Hort.* 489: 49-55.
- **Jones J.B., Chase A.R., Harris G.K. (1993)**, Evaluation of the biolog GN microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria, *Plant disease* 77 (6): 553-558.
- **Keil H.L., Smale B.C., Wilson R.A. (1966)** Role of injury and longevity of *Erwinia amylovora* in the epidemiology of fire blight of pear. *Phytopathology* 56: 464-465.
- **Kokošková B., Mráz I. (2005)** Reability of diagnostic techniques for *Erwinia amylovora*, the causative agent of fire blight disease. *Folia Microbiologica* 50 (3): 217-221.
- **Kůdela V. (1976)** Karanténní bakteriózy. Stud. Inform. ÚVTIZ, Ř. Ochr. Rostl., 3.
- **Kůdela V. (1990)** Spála růžovitých rostlin. Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR, 1.vyd.
- **Kůdela V. (1991)** Bakteriální choroby rostlin. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice.
- **Kůdela V. (1999)** Exsudace, klejotok, smolotok a slizotok. *Rostlinolékař* 10 (1): 21.
- **Kůdela V. (2001)** Spála růžovitých rostlin. *Rostlinolékař*:1/2001, příloha.
- **Kůdela V. (2001)** Ochrana rostlin proti mrazům během vegetace na biologických základech. *Agro – ochrana, výživa, odrůdy*. ORIN spol. s r.o. České Budějovice. 6 (1): 3.
- **Kůdela V., Novacky A., Fucikovsky L. (2002)** Rostlinolékařská bakteriologie. AV ČR. Academia Praha.

- **Louws F. J., Rademaker W. , Bruijn F.J. (1999)** The three D's of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection and disease diagnosis, *Ann. Phytopathol.* 37: 81-125.
- **Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., De Brujin F.J. (1995)** Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85: 528-536.
- **Lupski J.R., Weinstock G.M. (1992)** Short, interspersed repetitive DNA sequences in procaryotic genomes. *Journal of Bacteriology* 174 (14): 4525-4529.
- **Makivalkama T., Karjalainen R. (1994)** Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *carotovora* by RAPD PCR. *Annals of Applied Biology* 125 (2): 301-309.
- **Manulis S., Kleitman F., Dror O., Davids I., Zutra D.(1998)** Characterization of *E. amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica* 26: 39-46.
- **Maxon-Stein K., McGhee G.C., Smith, J.J., Jones A.L, Sundin, G.W. (2003)** Genetic analysis of a pathogenic *Erwinia* sp. isolated from pear in Japan. *Phytopathology*, 93 (11): 1393-1399.
- **McGhee G.C., Jones A. L. (2000)** Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain Ea88 gene organisation and intraspecies variation. *Applied and environmental microbiology*: 66 (11): 4897-4907.
- **McManus P.S., Jones A.L. (1994)** Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant. *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology* 84: 627-633.

- **Merighi M., A. Sandrini, S. Landini, S. Ghini, S. Girotti, S. Malaguti, C. Bazzi (1999)** Specific detection of *E. amylovora* by chemiluminescent immunoenzymatic determination of PCR products. *Acta Hort.* 489: 39-43.
  
- **Momol M.T., Momol E.A., Lamboy W.F., Novell J.L., Beer S.V., Aldwinckle H.S. (1997)** Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *Appl. Microbiol.* 82: 389-398.
  
- **Momol E.A., Momol M.T., Norelli, L.J., Beer S.V., Burr T.J., Aldwinckle H.S. (1999)** Relatedness of *E. amylovora* strains based on amplified 16S-23S ribosomal DNA restriction enzyme analysis –ANDREA. *Acta Hort.* 489: 55-61.
  
- **Oh Ch., Beer S.V. (2005)** Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* 253 (2): 185-192.
  
- **Powell H.A., Gooding C.M., Garret S.D., Lund B.M., McKee R.A. (1994)** Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 59-61.
  
- **Rademaker J.L.W., Louws F.J., De Bruijn F.J. (1997)** Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR fingerprinting. Pages 1-26 in: *Molecular Microbial Ecology Manual, Suppl. 3*. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, and De Bruijn, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
  
- **Rademaker J.L.W., Thalen M., Janse J.D. (1992)** Experiences with DNA-hybridization using a biotinylated probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Mededelingen van de Fakultie Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 57/2a: 263-268.
  
- **Rademaker J.L.W., de Bruijn F.J. (1997)** Characterization and classification microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews (Gaetano-Anolles G, Gresshoff P.M., eds. J. Wiley & Sons New York)*, 1-20.

- **Richard J. Reece R. J. (2004)** Analysis of Genes and Genomes. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 490.
  
- **Rod J. (2002)** Nejdůležitější bakteriózy zeleniny. *Agro – ochrana, výživa, odrůdy*. ORIN spol. s r.o. České Budějovice. 7 (3): 44.
  
- **Rossen L., Norskov P., Holmstrom K., Rasmussen O.F. (1992)** Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA- extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17: 37-45.
  
- **Rosypal S., Hod'ák K., Martinec T., Kocur M. (1981)** Obecná bakteriologie. SPN Praha.
  
- **Ruppitsch W., Stöger R. A., Marianne K. (2004)** Stability of short sequence repeats and application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains. *FEMS Microbiology Letters* 234: 1-8.
  
- **Řehout V., Čítek J., Hradecká E. (2005)** Genetika II. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 1. vydání.
  
- **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
  
- **Seo S.T., Furuya N., Takeshita M., Takanami Y. (2002)** Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica and carotovora by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) – PCR, *Journal of the faculty of agriculture Kyushu university* 47 (1): 1-6.
  
- **Shaad N.W. (1988)** Initial identification of common genera. In: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, St. Paul, MN.



- **Steinberger E.M., Cheng G.Y., Beer S.V. (1990)** Characterization of a 56kb plasmid of *Erwinia amylovora* Ea322: its noninvolvement in pathogenicity. *Plasmid* 24: 12-24.
  
- **Stiles J. I., Lemme C., Sondur S., Morshidi M.B., Manshardt R. (1993)** Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among Papaya cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 697–701.
  
- **Taylor R.K., Hale C.N. (1998)** Identification and characterization of isolates of *E. amylovora* from cotoneaster in Australia. *Aust. Biotechnol*, 6: 353-356.
  
- **Tek A., Stevenson W.R., Helgesson P., Jiang J. (2004)** Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics* 109 (2): 49-254.
  
- **Tsai Y.L., Olsen B.H. (1992)** Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 754-757.
  
- **Vahala O. (2005)** Původce bakteriální spály růžovitých rostlin (*Erwinia amylovora*) na území jižní Moravy v letech 1998-2004. *Agro-ochrana, výživa, odrůdy*. ORIN spol. s r.o. České Budějovice. 10 (5): 64-65.
  
- **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.

## 8. PŘÍLOHY

### 8.1. Tabulky

**Tabulka 1: Původ kmenů *Erwinia amylovora* použitých v diplomové práci**

Poř. č.	Sbírkové označení	Hostitel	Lokalita
1	3901	Hloh	Střední Čechy
2	5903	Hrušeň	Střední Čechy
3	2001	Hrušeň	Střední Čechy
4	5904	Hloh	Střední Čechy
5	7903	Hloh	Střední Čechy
6	6903	Hloh	Střední Čechy
7	7904	Hloh	Střední Čechy
8	2002	Hrušeň	Střední Čechy
9	8903	Hloh	Německo (Richter)
10	8904	Hloh	Německo (Richter)
11	CCM 1114 <sup>T</sup>	<i>Pyrus communis</i>	Velká Británie (Lelliot)
12	3016	Jabloň	Východní Čechy
13	3017	Hrušeň	Východní Čechy
14	CCM 1133	<i>Cotoneaster salicifolia</i>	Velká Británie (Lelliot)
15	CCM 1141	<i>Sorbus aucuparia</i>	Velká Británie (Billing)
16	CCM 1196	<i>Crataegus sp.</i>	Velká Británie (Billing)
17	CCM 3980	<i>Crataegus monogyna</i>	ČR (Kúdela)
18	8633	Hrušeň	Velká Británie
19	6905	Jabloň	Střední Čechy
20	9901	Hloh	Střední Čechy
21	3001	Hloh	Střední Čechy
22	3002	Hloh	Střední Čechy
23	3003	Hloh	Střední Čechy
24	3004	Hloh	Střední Čechy
25	3005	Hloh	Střední Čechy
26	3006	Hloh	Střední Čechy
27	3007	Hloh	Střední Čechy
28	3008	Hloh	Střední Čechy
29	3009	Hloh	Střední Čechy
30	3010	Hloh	Střední Čechy
31	3011	Hloh	Střední Čechy
32	3012	Hloh	Střední Čechy
33	3013	Hloh	Střední Čechy
34	3014	Hloh	Střední Čechy
35	3015	Hloh	Střední Čechy
36	8905	Reizolát z 8903	Německo (Richter)
37	5017	Hloh	Východní Čechy

38	5018	Hloh	Severovýchodní Čechy
39	5020	Hloh	Jižní Morava
40	5022	Hloh	Jižní Morava
41	5024	Skalník	Jižní Morava
42	5025	Hrušeň	Střední Čechy
43	5027	Hrušeň	Střední Čechy
44	5029	Hloh	Střední Čechy
45	5031	Jabloň	Severozápadní Čechy
46	5032	Hrušeň	Severozápadní Čechy
47	5034	Hloh	Střední Čechy
48	5035	Hrušeň	Severozápadní Čechy
49	5038	Hrušeň	Západní Čechy
50	5040	Hloh	Severozápadní Čechy
51	5041	Hloh	Severozápadní Čechy
52	5043	Hloh	Severní Morava
53	5044	Hloh	Severní Morava
54	5045	Hloh	Střední Čechy
55	5046	Hrušeň	Severozápadní Čechy
56	5047	Hloh	Severní Čechy
57	5049	Hrušeň	Severozápadní Čechy
58	5051	Jabloň	Severozápadní Čechy
59	5053	Hloh	Střední Čechy
60	5054	Hloh	Severní Morava
61	1001	Hloh	Střední Čechy
62	1002	Hloh	Západní Čechy
63	5901	Hloh	Střední Čechy
64	5902	Hloh	Východní Čechy
65	6902	Jabloň	Severozápadní Čechy
66	7902	Jabloň	Jihozápadní Čechy
67	8902	Hloh	Západní Čechy
68	IVIA 1525-6	<i>Cotoneaster sp.</i>	Španělsko (Guipuzcoa)
69	NCAIM 1617	<i>Human</i>	Maďarsko (Klement)

**Tabulka 2: Původ kmenů pektinolytických bakterií rodu *Erwinia* použitých v diplomové práci**

<b>Poř. č.</b>	<b>Kmen</b>	<b>Sbírkové označení</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Lokalita</b>
1a	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	CCM 322	<i>Delfinium ajacis</i>	-
2a	<i>Erwinia carotovora</i> , subsp. <i>carotovora</i>	CCM 1008	<i>Solanum tuberosum</i>	Dánsko
3a	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	CCM 989	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	-

## 8.2. Mapy

**Mapa 1: Geografické rozšíření *E. amylovora* v roce 2005**



[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia\\_amylovora/ERWIAM\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_amylovora/ERWIAM_map.htm)  
(14.2.2006)

**Mapa 2: Výskyt *E. c. subsp. carotovora* na území České republiky v roce 2005**

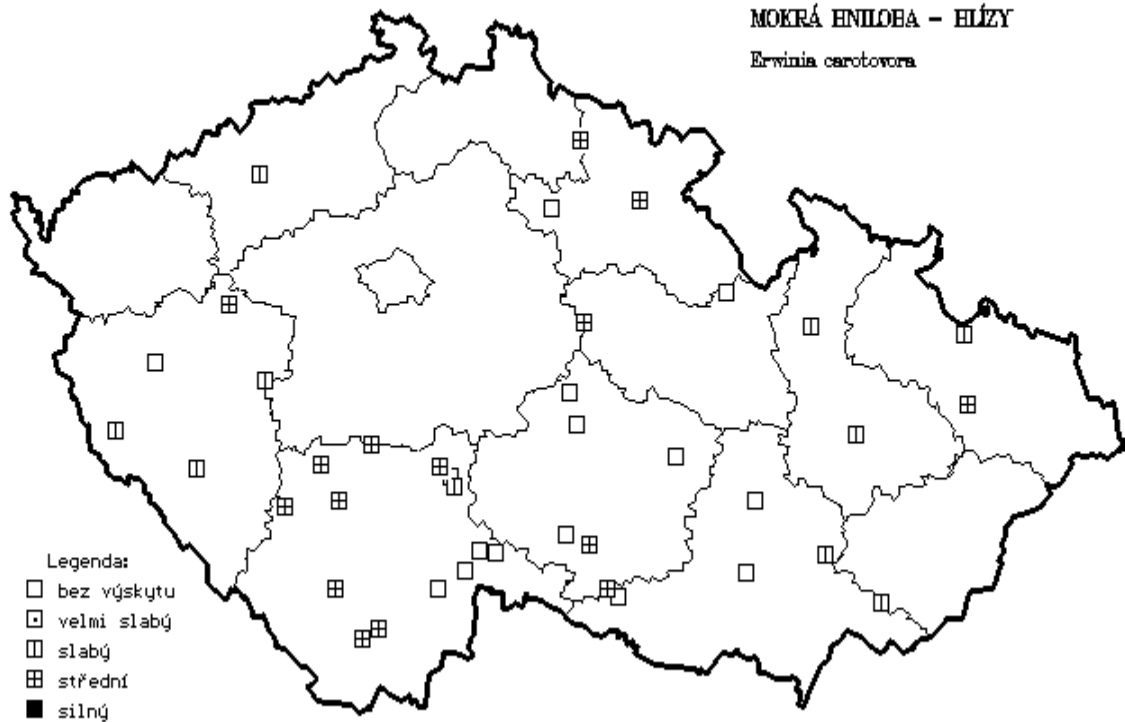
**STÁTNÍ ROSTLINOLÉKAŘSKÁ SPRÁVA**

za období od 05.09.05 do 02.10.05

HRABEŘOŘY

MOKRÁ ENILOHA - HLÍZY

*Erwinia carotovora*



[http://www.srs.cz/portaldoc/skodlive\\_organismy/monitoring\\_so\\_na\\_uzemi\\_cr/monitorovaci\\_zpravy\\_o\\_vyskytu\\_so/2005/mokrhnilhliz20.gif](http://www.srs.cz/portaldoc/skodlive_organismy/monitoring_so_na_uzemi_cr/monitorovaci_zpravy_o_vyskytu_so/2005/mokrhnilhliz20.gif) (20.3.2006)



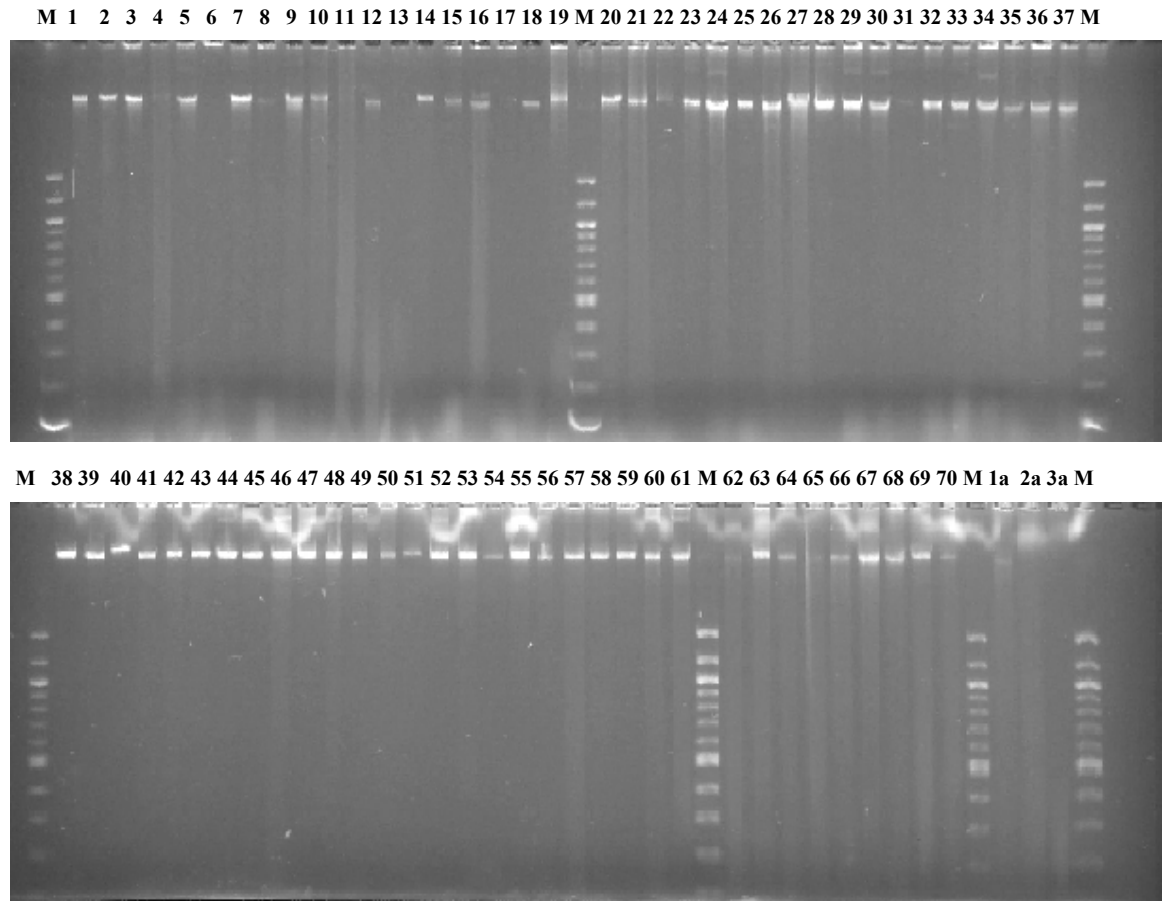
**Mapa 3: Geografické rozšíření *E. chrysanthem* v roce 2005**



[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia\\_chrysanthemi/ERWICH\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_chrysanthemi/ERWICH_map.htm) (14.2.2006).

### 8.3. Fotografie

#### Fotografie 1: Vyizolovaná bakteriální DNA pomocí lysozymu



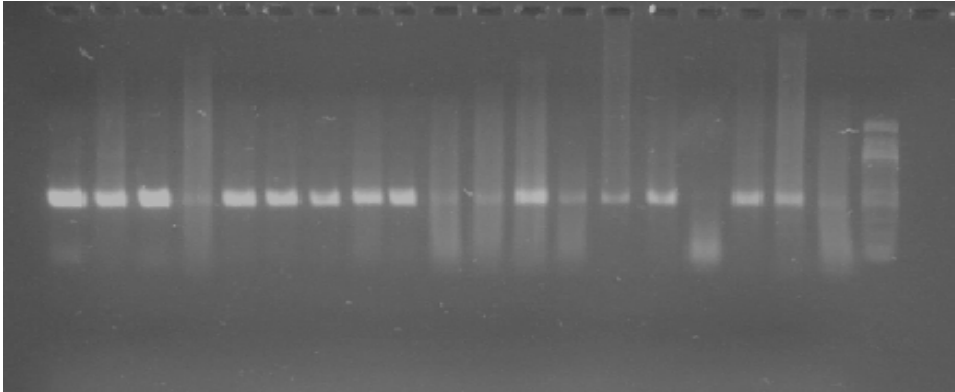
M.....100bp DNA Step Ladder (Promega)

1 – 70.....izoláty bakterií *E. amylovora* číselně shodné s Tabulkou 1

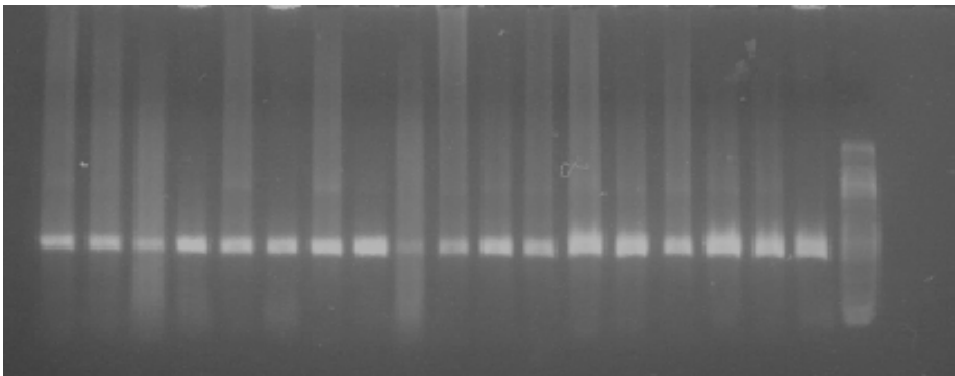
1a, 2a, 3a.....izoláty bakterií *E. c. subsp. atroseptica*, *E. c. subsp. carotovora*  
a *E. chrysanthemi*

**Fotografie 2: Amplikon (amplifikační produkt) o velikosti 0,5kbp potvrzuje identitu *Erwinia amylovora* (použity primery Ea f72 a Ea r560)**

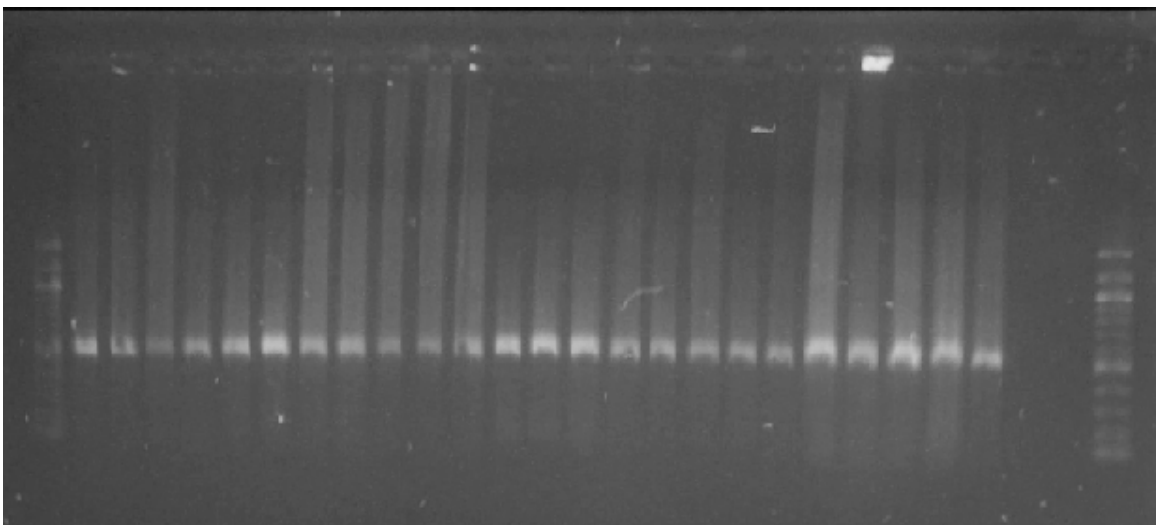
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M



20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 M



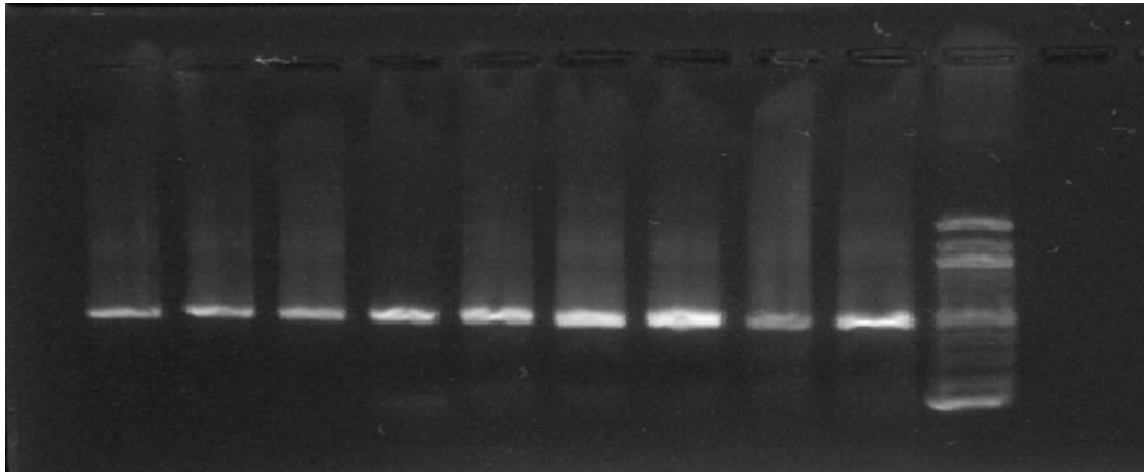
M 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 M



M.....100 bp DNA Step Ladder (Promega)

**Fotografie 2: Amplikon (amplifikační produkt) o velikosti 0,5kbp potvrzuje identitu *Erwinia amylovora* (použity primery Ea f72 a Ea r560) (pokračování)**

62 63 64 65 66 67 68 69 70 M

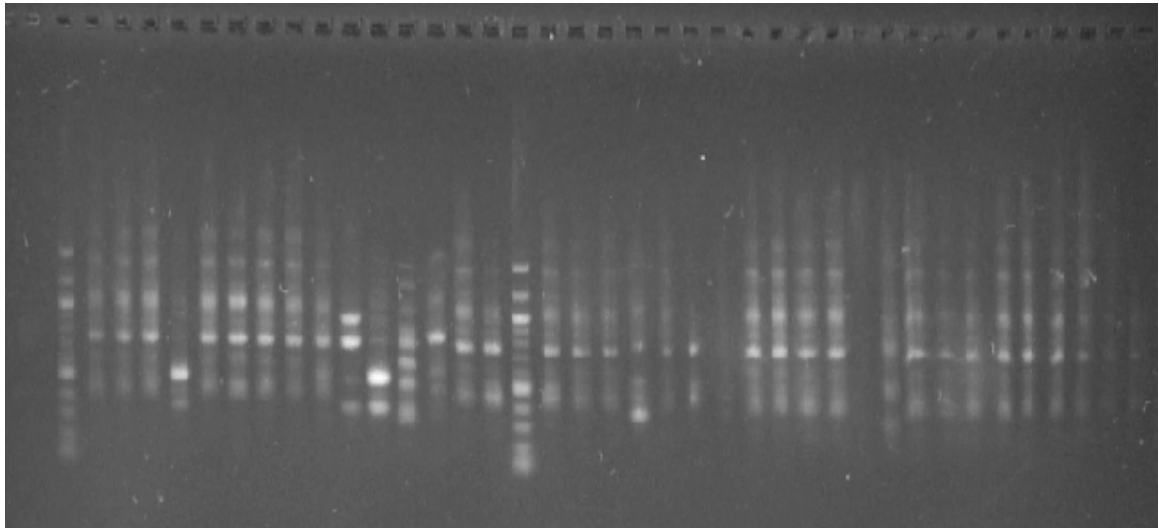


**M**.....100 bp DNA Step Ladder (Promega)

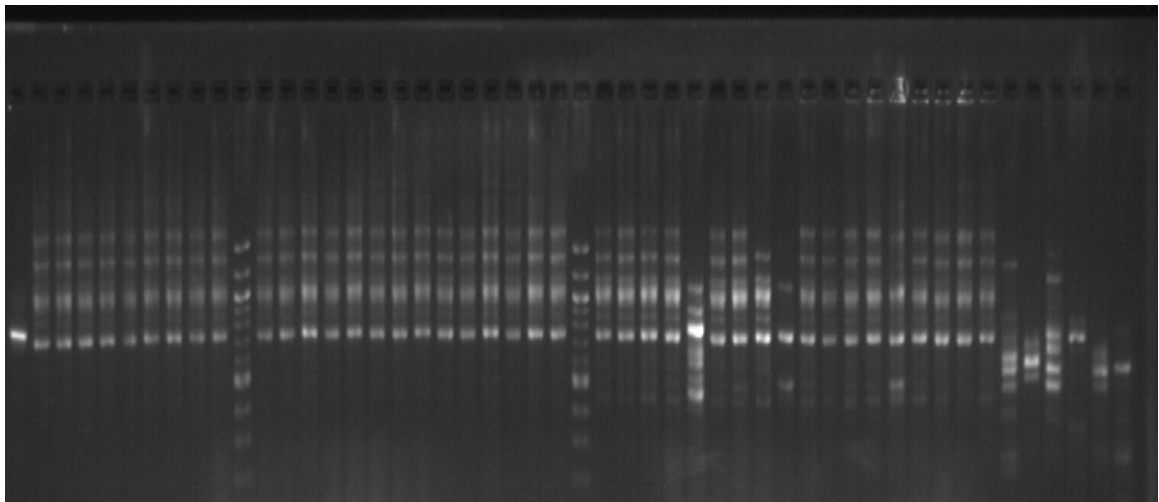
**Fotografie 3: Variabilita izolátů rodu *Erwinia* testovaná v rep-PCR s primerem**

**BOX A1R**

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37



38 39 40 41 42 43 44 45 46 47M48 49 50 5152 53 54 55 56 57 58 59 60 61M62 63 6465 66 67 68 69 70 62 63 6465 66 67 68 69 70 1a 2a 3a 1a 2a 3a



BK.....bakteriální kultura z misky použitá v reakční směsi PCR

M .....100 bp DNA Step Ladder (Promega)

1-70 .....izoláty *Erwinia amylovora* (Tab.1)

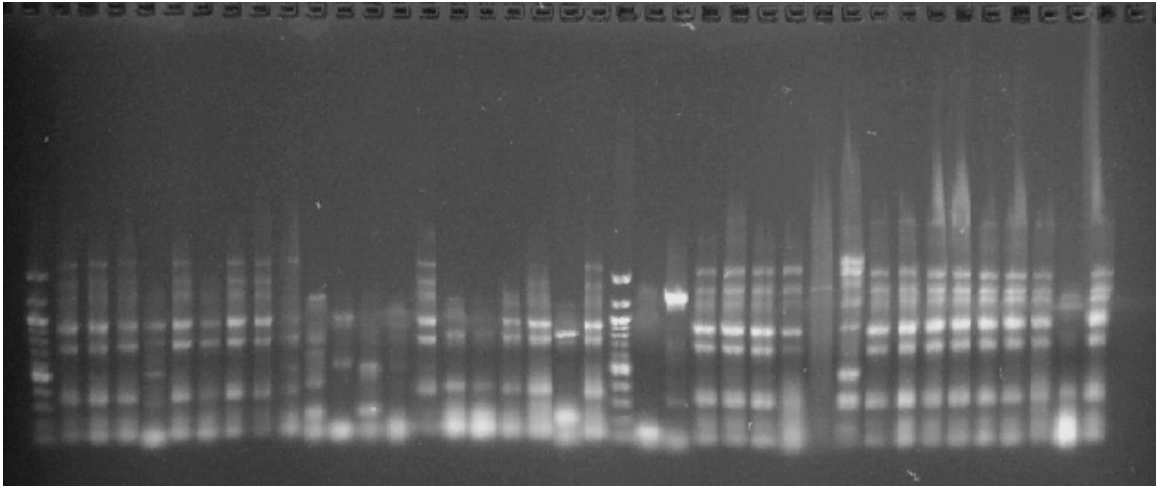
1a.....izolát *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Tab. 2)

2a..... izolát *Erwinia carotovora*, subsp. *carotovora* (Tab. 2)

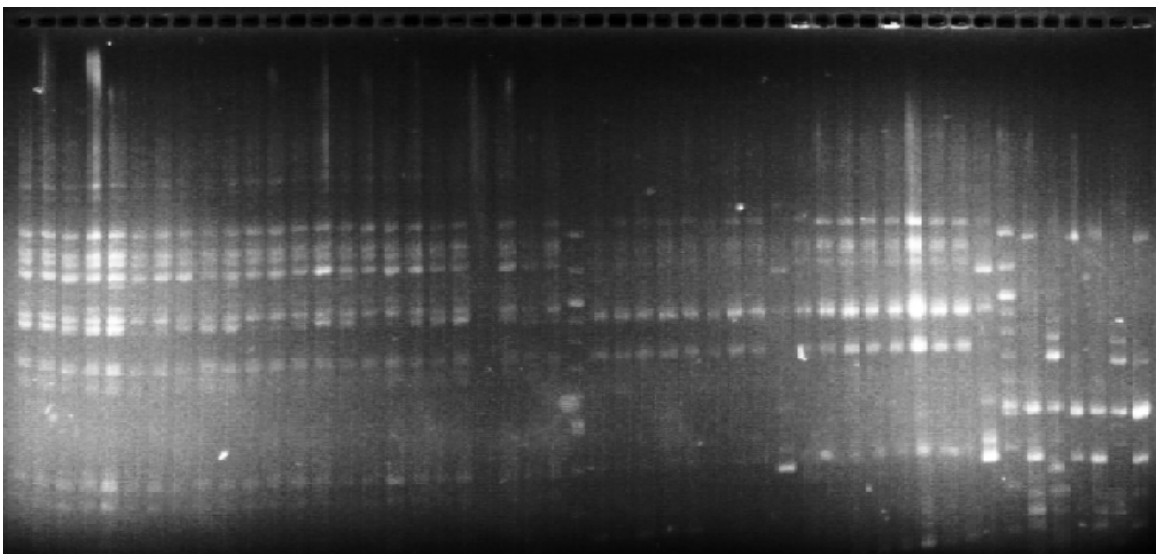
3a..... izolát *Erwinia chrysanthemi* (Tab. 2)

**Fotografie 4: Variabilita izolátů rodu *Erwinia* rep-PCR testovaná s primery ERIC1 a ERIC2R**

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37



38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 M 62 63 64 65 66 67 68 69 70 62 63 64 65 66 67 68 69 70 M 1a 2a 3a 1a 2a 3a



BK.....bakteriální kultura z misky použitá v reakční směsi PCR

M .....100 bp DNA Step Ladder (Promega)

1-70 .....izoláty *Erwinia amylovora* (Tab.1)

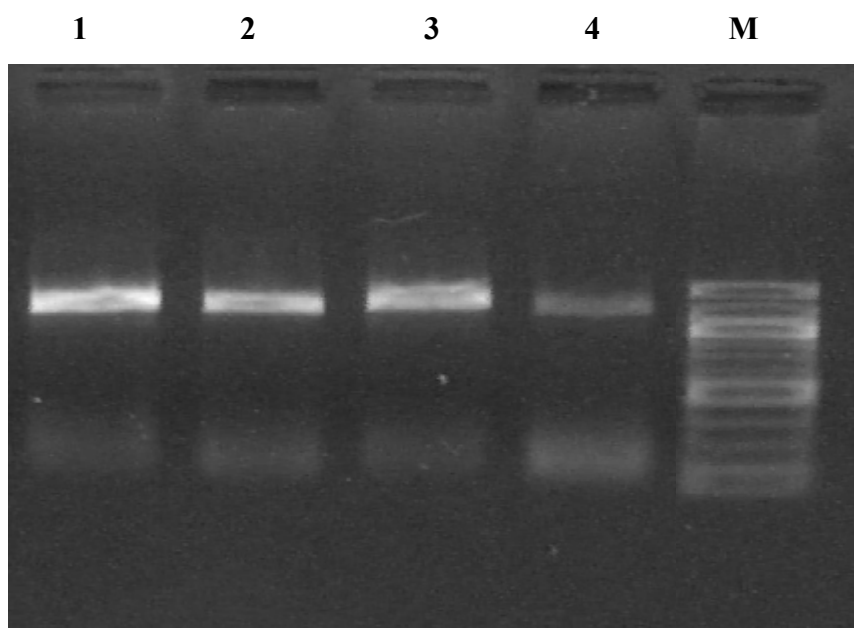
1a.....izolát *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Tab. 2)

2a..... izolát *Erwinia carotovora*, subsp. *carotovora* (Tab. 2)

3a..... izolát *Erwinia chrysanthemi* (Tab. 2)



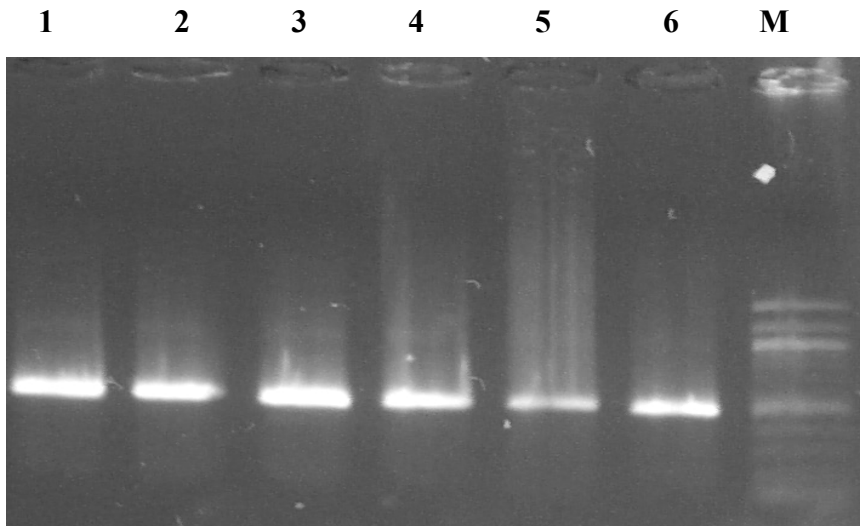
**Fotografie 5: Amplifikační produkty po PCR s primery pEa1 a pEa2 (specifickými pro detekci plasmidu pEa 29)**



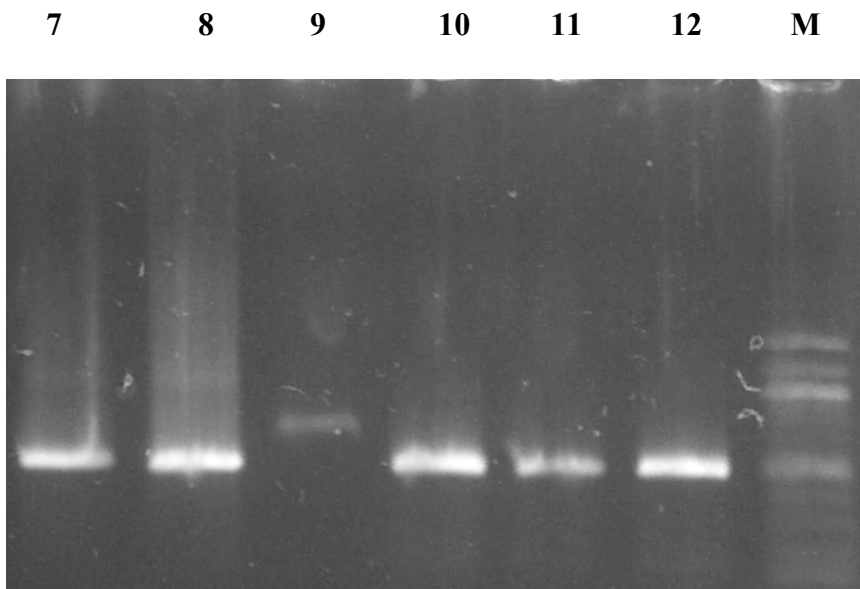
M.....100 bp DNA Step Ladder (Promega)

Primery pEa1 a pEa2 poskytují amplifikační produkt o velikosti 1,0 kbp

**Fotografie 6: Srovnání amplifikačních produktů kmenů *E. amylovora* po PCR s vyizolovanou DNA, bakteriálním lyzátem a čistou bakteriální kulturou s primery Ea f72 a Ea r560 (specifickými pro detekci plasmidu pEa29)**

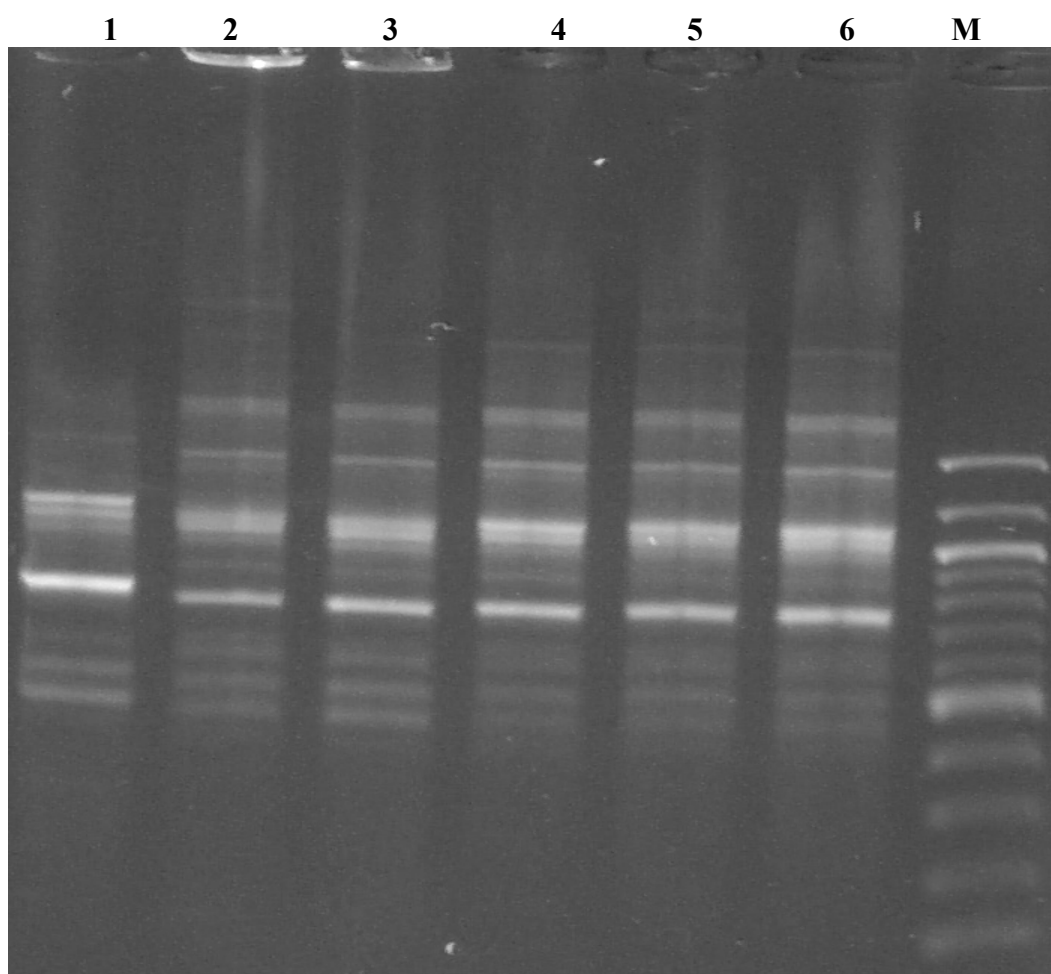


M.....100 bp DNA Step Ladder (Promega)  
 1-4.....bakteriální lyzát  
 5,6..... izolace DNA pomocí lysozymu



M.....100 bp DNA Step Ladder (Promega)  
 7,8..... izolace DNA pomocí lysozymu  
 9-12.....bakteriální kultura  
 Velikost produktu 0,5 kbp

**Fotografie 7: Srovnání izolátů v rep-PCR s primerem BOX A1R s použitím bakteriálního lyzátu a čisté bakteriální kultury**



M.....100 bp DNA Step Ladder (Promega)

1-3.....bakteriální kultura

4-6.....bakteriální lyzát

## 8.4. Obrázky

**Obrázek 1: Bakteriální kultura *Erwinia amylovora* v Petriho misce**



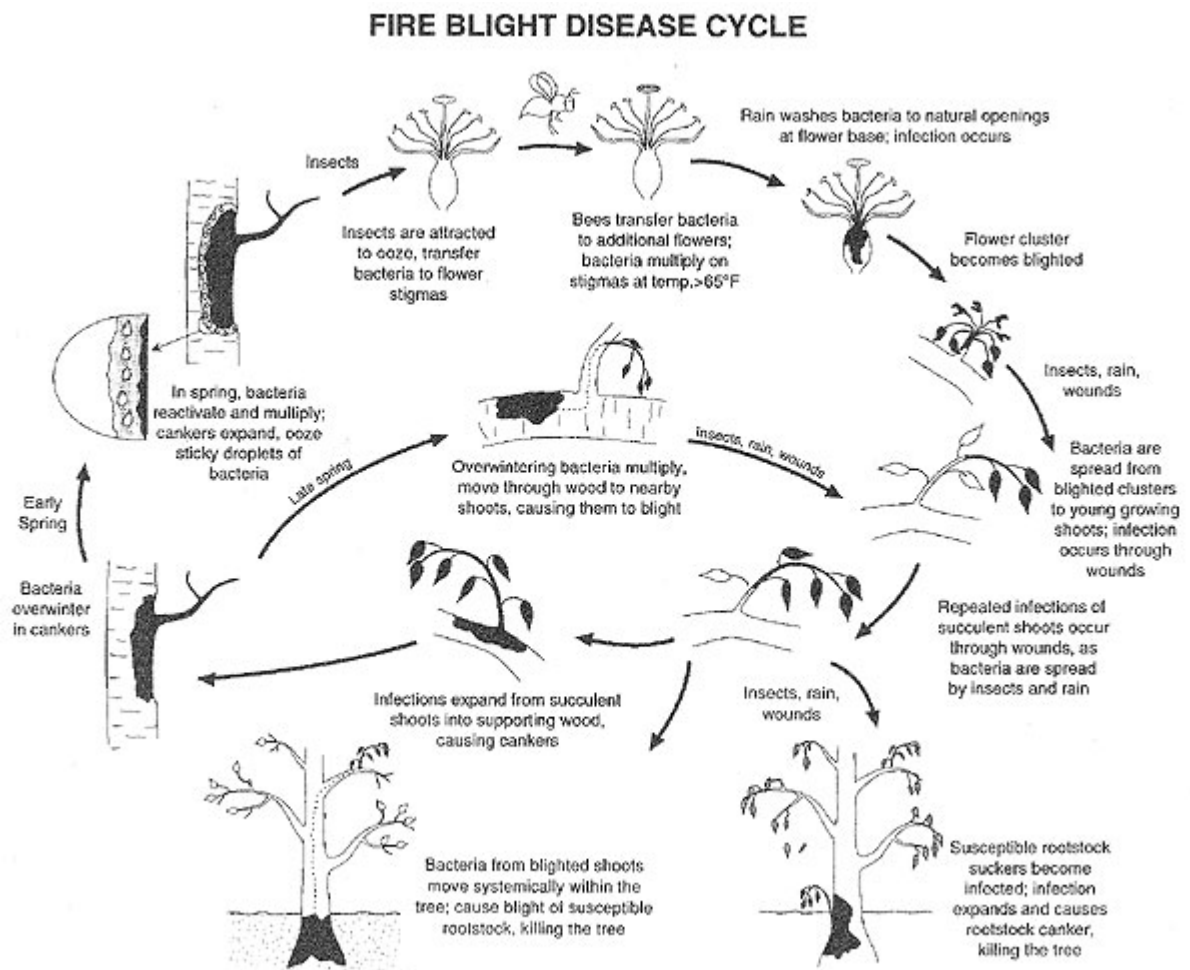
<http://www.feuerbrand.ch/medien/images/merkblat/eapetri.jpg> (11.4.2006)

**Obrázek 2: Příznaky napadení bakteriální spálou růžovitých rostlin**



<http://www.apsnet.org/education/IntroPlantPath/Topics/plantdisease/images/fig22.jpg>  
(11.4.2006)

**Obrázek 3: Infekční cyklus *Erwinia amylovora***



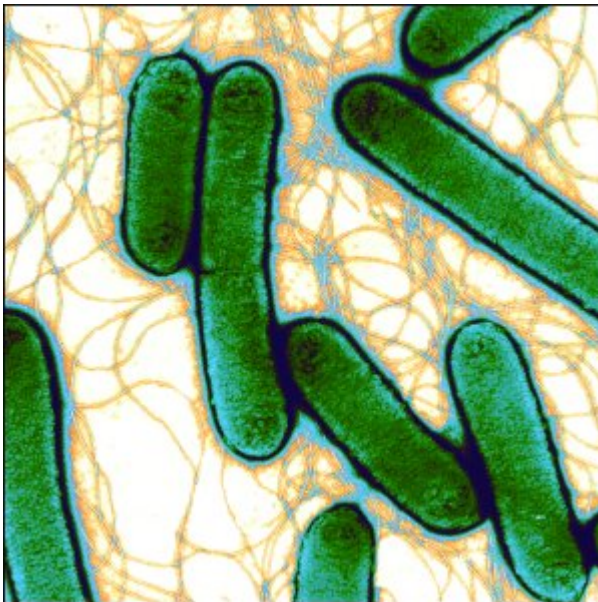
<http://www.nysaes.cornell.edu/pp/extension/tfabp/factshts/pome/firepm/firecyc.jpg>  
(11.4.2006)

**Obrázek 4: Bakterie *Erwinia amylovora***



[http://www.gartenbauvereine-don.de/aktuelles/feuerbrand/akt\\_3\\_1.jpg](http://www.gartenbauvereine-don.de/aktuelles/feuerbrand/akt_3_1.jpg) (11.4.2006)

**Obrázek 5: Bakterie *Erwinia carotovora***



<http://www.sanger.ac.uk/Info/News-releases/gfx/040720-erwinia-300.jpg> (11.4.2006)

**Obrázek 6: Chromatogram (záznam sekvence) amplifikačního produktu kmene Ea CCM 1196 osekvenovaného pomocí primeru Ea f72 (forward)**

**Obrázek 7: Chromatogram (záznam sekvence) amplifikačního produktu kmene Ea CCM 1196 osekvenovaného pomocí primeru Ea r560 (reverse)**



**Obrázek 8: Srovnání sekvenčních dat z různých izolátů *Erwinia amylovora***

Erwinia amylovora - sequence alignment.apr

		Section 1									
		(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	82
01_CCM_1196	(1)	-	TGGCT	ACGACT	TGCGGAA	-GCAGCAGGAACGCAGCCGG	ACGCGCTTTCCGCC				
02_IVIA_1525-6	(1)		CCGGAAC	CGCGT	GAGGAA	TGCAGCAGGAACGCAGCCGG	ACGCGCTTTCCGCC				
03_27_NSR	(1)	-	CGGAA	ACGCT	-AGGAA	-GCAGCAGGAACGCAGCCGG	-CGCGCTTTCCGCC				
Consensus	(1)		CCGG	AACG	CTGAGGAAT	GCAGCAGGAACGCAGCCGG	ACGCGCTTTCCGCC				
		Section 2									
		(53)	53	60	70	80	90	100	110	120	104
01_CCM_1196	(51)		TTTTTCTAT	A	TAGGGCC	CAATCGGTT	T	-AATCTCCAGTTCCAA	-GAC	GCCCGT	
02_IVIA_1525-6	(53)		TTTTTCTAT	GAA	AGGCC	CATCGGTT	TGAATCTCCAGTTCCAA	-GCGCCGGG			
03_27_NSR	(49)		TTTTTCTAT	A	TAGGGCC	CAATCGGTT	G	-AATCTCCAGTTCCAA	AGGA	GCCCGT	
Consensus	(53)		TTTTTCTAT	A	TAGGGCC	CAATCGGTT	TGAATCTCCAGTTCCAA	AGGA	GCCCGT		
		Section 3									
		(105)	105	110	120	130	140	150	160	170	156
01_CCM_1196	(101)		AAGCTCCGAAAGCCTAT	GAAAAAACCGGTA	A	CCATCTCCAACCCGATGTAAG					
02_IVIA_1525-6	(104)		AAGCTCCGAAAGCCTAT	GAAAAAACCGGTA	-	CCATCTCCAACCCGATGTAG					
03_27_NSR	(100)		AAGCTCCGAAAGCCTAT	GAAAAAACCGGTA	-	CCATCTCCAACCCGATGTAG					
Consensus	(105)		AAGCTCCGAAAGCCTAT	GAAAAAACCGGTA	ACCATCTCCAACCCGATGTAAG						
		Section 4									
		(157)	157	170	180	190	200	210	220	230	208
01_CCM_1196	(153)		AG	-GGCAAGACACGT	ACCGTGCAACTGT	C	GTGGTTT	TCTCGT	CTTGAGT	ACG	
02_IVIA_1525-6	(155)		GC	-GGCAAGACACGT	-CCGTGCAACTGT	-GTGGTTT	---	CTGCTTGAGT	-CG		
03_27_NSR	(151)		AGC	GGCAAGACACGT	ACCGTGCAACTGT	C	GTGGTTT	TCTCGT	CTTGAGT	ACG	
Consensus	(157)		AGCGGCAAGACACGT	ACCGTGCAACTGT	CGTGGTTTTCTCGTCTTGAGT	ACG					
		Section 5									
		(209)	209	220	230	240	250	260	270	280	260
01_CCM_1196	(204)		TC	AGCAGTGATGAGCAGAGCGCCGT	TATACTGCGCTTTGGACAGGACGTTGC						
02_IVIA_1525-6	(200)		T	-AGCAGTGATGAGCAGAGCGCCGT	TATACTGCGCTTTGGACAGGACGTTGC						
03_27_NSR	(203)		TC	AGCAGTGATGAGCAGAGCGCCGT	TATACTGCGCTTTGGACAGGACGTTGC						
Consensus	(209)		TCAGCAGTGATGAGCAGAGCGCCGT	TATACTGCGCTTTGGACAGGACGTTGC							
		Section 6									
		(261)	261	270	280	290	300	310	320	330	312
01_CCM_1196	(256)		ACCCTATCTTTATGAGTTAAAAGAGTCTTTTACCAAGCTCAATTTACCAAT								
02_IVIA_1525-6	(251)		ACCCTATCTTTATGAGTTAAAAGAGTCTTTTACCAAGCTCAATTTACCAAT								
03_27_NSR	(255)		ACCCTATCTTTATGAGTTAAAAGAGTCTTTTACCAAGCTCAATTTACCAAT								
Consensus	(261)		ACCCTATCTTTATGAGTTAAAAGAGTCTTTTACCAAGCTCAATTTACCAAT								
		Section 7									
		(313)	313	320	330	340	350	360	370	380	364
01_CCM_1196	(308)		ATTGCCAAGCTCGATACGCCGTTCTCCGTGCGACTGTATGGCTGGTTGATCA								
02_IVIA_1525-6	(303)		ATTGCCAAGCTCGATACGCCGTTCTCCGTGCGACTGTATGGCTGGTTGATCA								
03_27_NSR	(307)		ATTGCCAAGCTCGATACGCCGTTCTCCGTGCGACTGTATGGCTGGTTGATCA								
Consensus	(313)		ATTGCCAAGCTCGATACGCCGTTCTCCGTGCGACTGTATGGCTGGTTGATCA								
		Section 8									
		(365)	365	370	380	390	400	410	420	430	416
01_CCM_1196	(360)		AAGCTAAAAATCTCTATGGACGTAAAGGCAGTAAAGCAATTGAGGTGACACT								
02_IVIA_1525-6	(355)		AAGCTAAAAATCTCTATGGACGTAAAGGCAGTAAAGCAATTGAGGTGACACT								
03_27_NSR	(359)		AAGCTAAAAATCTCTATGGACGTAAAGGCAGTAAAGCAATTGAGGTGACACT								
Consensus	(365)		AAGCTAAAAATCTCTATGGACGTAAAGGCAGTAAAGCAATTGAGGTGACACT								

# OBSAH

<b>1.</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>3</b>
2.1.	Popis a význam rodu <i>Erwinia</i> .....	3
2.1.1.	Taxonomické zařazení .....	3
2.1.2.	Geografické rozšíření.....	3
2.1.3.	Morfologické a kultivační znaky .....	4
2.1.4.	Patogenní vlastnosti .....	4
2.1.5.	Molekulární charakteristika patogenů.....	5
2.1.6.	Hostitelské rostliny .....	5
2.1.7.	Význam jednotlivých patogenů .....	6
2.1.8.	Symptomatologie .....	6
2.1.9.	Infekční cyklus.....	8
2.1.10.	Ochrana.....	9
2.1.11.	Odběr vzorků a kultivace .....	10
2.2.	Současné metody determinace.....	11
2.2.1.	Sérologické metody .....	11
2.2.1.1.	Aglutinační test .....	11
2.2.1.2.	Imunofluorescence.....	11
2.2.1.3.	Enzymová imunoanalýza – ELISA.....	12
2.2.2.	Testy patogenity.....	12
2.2.3.	Orientační zkouška.....	12
2.2.4.	Biochemické metody .....	13
2.2.4.1.	Mikrobiální identifikační systém BIOLOG .....	13
2.2.5.	Molekulárně biologické metody .....	13
2.2.5.1.	Specifické úseky v genomu .....	13
2.2.5.2.	Molekulární techniky používané v současnosti .....	14
2.2.5.2.1.	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace</i> .....	14
2.2.5.2.2.	<i>Hybridizační techniky</i> .....	16
2.2.5.2.3.	<i>Sekvenování</i> .....	17
2.2.6.	Elektroforetické metody.....	17
<b>3.</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>19</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>20</b>
4.1.	Bakteriální kmeny .....	20
4.2.	Živná média .....	20
4.3.	Různé způsoby získávání genomové DNA pro následnou amplifikaci.....	21
4.3.1.	Izolace bakteriální DNA .....	21
4.3.2.	Použití čisté bakteriální kultury .....	22
4.3.3.	Příprava bakteriálního lyzátu .....	22
4.4.	Elektroforéza.....	23
4.5.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	23
4.6.	BOX PCR.....	24
4.7.	ERIC PCR.....	25

4.8.	Příprava amplifikačních produktů pro sekvenační PCR.....	25
4.9.	Přečištění PCR produktu pro sekvenační PCR.....	26
4.10.	Sekvenační PCR a vlastní sekvenování.....	27
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>29</b>
5.1.	Izolace bakteriální DNA pomocí lysozymu, použití bakteriálního lyzátu a čisté bakteriální kultury pro následné PCR.....	29
5.2.	Metoda rep - PCR s použitím primeru BOX A1R.....	29
5.3.	Metoda rep - PCR s použitím primerů ERIC1 a ERIC2R.....	30
5.4.	Příprava amplifikačních produktů pro sekvenační PCR a sekvenační PCR.....	30
5.5.	Sekvenování.....	31
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR, VÝZNAM PRO PRAXI.....</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>34</b>
<b>8.</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>42</b>
8.1.	Tabulky.....	42
8.2.	Mapy.....	45
8.3.	Fotografie.....	52
8.4.	Obrázky.....	60