

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

OBOR ZEMĚDĚLSKÉ BIOTECHNOLOGIE

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA GENETICKÉ VARIABILITY MEZI  
PATOVARÝ FYTOPATOGENNÍ BAKTERIE *PSEUDOMONAS  
SYRINGAE***

**PAVEL BERAN**

**Vedoucí diplomové práce:**

Ing. Jan Fousek, Ph.D.

**Školitel:**

Ing. Ivan Mráz, CSc.

2007

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

V Českých Budějovicích dne 20.4.2007

.....

**V první řadě chci poděkovat vedoucímu práce ing. Janu Fouskovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky vztahující se k psaní mé bakalářské práce.**

**Dále bych rád poděkoval ing. Ivanu Mrázovi, CSc. a paní Marii Maškové za obětavou pomoc při provádění pokusů a za cenné rady a ochotu, se kterou se mi věnovali v průběhu celé práce.**

České Budějovice, duben 2007

# Obsah

1. Úvod .....	5
2. Literární přehled .....	6
2.1. Popis patovarů .....	6
2.2. Použité molekulárně biologické metody .....	11
2.2.1. Rep-PCR .....	11
2.2.2. Makrorestrikční analýza a pulzní gelová elektroforéza (PFGE) .....	12
3. Cíl práce.....	14
4. Materiál a metody.....	15
4.1. Bakteriální kmeny <i>Ps</i> .....	15
4.2. rep-PCR.....	15
4.2.1. Kultivační podmínky a živná média.....	15
4.2.2. Izolace bakteriální DNA.....	15
4.2.3. rep-PCR.....	16
4.3. PFGE .....	16
4.3.1. Kultivační podmínky a živná média.....	16
4.3.2. Izolace bakteriální DNA.....	16
4.3.3. PFGE .....	17
5. Závěr.....	18
6. Závěr.....	18
7. Seznam použité literatury .....	19
8. Tabulky.....	23
9. Obrázky .....	24

# 1. Úvod

*Pseudomonas syringae* van Hall 1902 (dále jen *Ps*) je významným bakteriálním patogenem parazitujícím na širokém okruhu rostlin. *Ps* se rozděluje do patovarů, podle hostitelského okruhu rostlin. Existuje 48 patovarů *Ps* a může vytvářet různé druhy symptomů

Tato práce vznikla na základě grantu řešeném na ústavu molekulární biologie rostlin Akademie věd České republiky, který má za cíl molekulární analýzu komplexního genomu patovarů *Ps*. Jeho součástí je stanovení genetické variability u českých i zahraničních izolátů *Ps* pomocí technik rep-PCR a PFGE. V další fázi dojde ke studiu rozšíření významných faktorů virulence (geny pro tvorbu toxinů, geny *hrp*) v rámci studované populace. Poslední fází tohoto projektu je lokalizace a navržení vhodných sekvencí pro design paralelní diagnostické techniky pro determinaci jednotlivých patovarů *Ps* (oligonukleotidový DNA čip).

Tato práce je součástí první fáze grantu č. 522/07/P338 Grantové agentury České republiky a výsledky budou použity pro další výzkum, který pomůže doplnit a rozšířit znalosti o tomto významném bakteriálním druhu. Díky tomu bude možné navrhnout spolehlivé a relativně jednoduché způsoby detekce patogenu u rostlin.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Popis patovarů

*Pseudomonas syringae* van Hall 1902 tvoří rovné nebo mírně zahnuté krátké tyčinky o velikosti 0,5-1 x 1,5-5 µm s jedním nebo více polárními bičíky. Je to gramnegativní, nesporující bakterie se striktně aerobně respiračním metabolismem. Kolonie jsou nejčastěji šedobílé, průhledné. Obsah C a G bází v DNA je 58-60 %.

Rod *Pseudomonas* patří do čeledi *Pseudomonadaceae*, která je Gama-podtřídou třídy Proteobacteria oddělení Gracilicutes. Druh *P. syringae* je rozdělen do 48 patovarů podle jejich patogenity a hostitelského okruhu. *P. syringae* je schopna vytvořit různé druhy symptomů závislých na druhu hostitele a místě nákazy (Feil *et al.*, 2005)

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

*Psa* způsobuje bakteriální hnědnutí báze plev obilí (Obr.1) (pšenice, ječmene, oves, žito, tritikále) a trav (Bradbury, 1986). Tato choroba, běžná ve mnoha oblastech, kde se pěstuje obilí je považována za hlavní bakteriální chorobu obilí ve střední a východní Evropě. V Bulharsku byly zaznamenány ztráty na výnosu obilí od 5 do 60%. Příznaky se projevují změnou barvy na bázi plev a tmavými nekrotickými pruhy na listech a stoncích. (Toben *et al.*, 1989).

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

*Psc* produkuje tabtoxin, který způsobuje bakteriální gloriolovou skvrnitost ovesa (Obr.2) a jednoděložných rostlin (Elliott, 1920; Sinden and Durbin, 1970). Gloriolová skvrnitost byla pozorována celosvětově, všude kde se pěstuje oves (Müller, 1964; Wilkie, 1972; Harder, 1973). Ačkoliv je tato bakterie nyní známa jako *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens*, byla poprvé izolována a charakterizována z ovesa, druhy této bakterie byly pozorovány i na jiných travách a obilí, včetně žita (*Secale cereale*) a bojínku lučního (*Phleum pretense*) (Taylor *et al.*, 1971; Cunfer and Schaad, 1976). Bakteriální původce nákazy sverepu stoklasého (*Bromus secalinus*) (Reddy and Godkin, 1923) je pravděpodobně také *Psc*, protože

izoláty z této rostliny byly schopny vyvolat nákazu u ovsa (Reddy and Godkin, 1923; Kingsolver, 1944). Navíc bakterie, která způsobuje onemocnění obilí zvané „chocolate spot“ byla původně určena jako *P. coronafaciens* pv. *zeae*, protože je z hlediska fyziologie a produkce toxinů nerozeznatelná od gloriolové skvrnitosti ovsa (Ribeiro *et al.*, 1977). Tyto bakterie jsou nyní považovány za totožné, jako *Psc* (Schaad and Cunfer, 1979).

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

Bakteriální spála způsobená *Psg*, je jedna z nejrozšířenějších chorob na sóji (Sinclair and Backman, 1989). Onemocnění je rozšířeno celosvětově a je závažnější v chladnějších oblastech (Ross, 1987). Na listech se objevují malé, hranaté, vodnaté skvrny obklopené nazelenalým žlutým prstencem (Obr.3). Nakažené mladé listy bývají chlorotické a zakrslé. Na starších listech se mohou rozšiřovat tmavé nekrotické skvrny, které později srůstají a dávají tak listu „otrhaný“ vzhled (Wolf, 1920). Patogen je přenosný osivem, které může být scvrklé a odbarvené (Tisselli *et al.*, 1980)

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

Listová skvrnitost bakteriálního původu se na slunečnici objevuje jen sporadicky. Skvrny způsobené *Psh* jsou hranaté, tmavě hnědé, obklopené chlorotickým halo (Obr.4). Může dojít i ke kolonizaci cévních svazků; listy jsou pak svráštělé v důsledku nerovnoměrného růstu vaskulárních a parenchymatických pletiv (Kůdela *et al.*, 2002)

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

Bakteriální hranatá skvrnitost listů okurky se vyskytuje v porostech okurky, ale také tykve a melounu. Běžně se vyskytuje ve všech pěstitelských oblastech v polních porostech, méně často ve sklenících. Symptomy této choroby jsou hranaté, vodnaté, později hnědé skvrny, které následně vysychají a někdy vypadávají (Obr.5). Na stoncích a řapících jsou někdy vodnaté skvrny pokryté bělavým exudátem. Patogen je přenosný semenem a může také přezimovat v rostlinných zbytcích hostitelských rostlin (Kůdela *et al.*, 2002)

***Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch 1921) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále jen *Psm*)**

Bakteriální listová skvrnitost způsobená *Psm* je celosvětově rozšířená na brukvovitých rostlinách včetně kvěťáku (Obr.6), kde byla poprvé pozorována už v roce 1911. *Psm* byla od té doby zaznamenána na nejméně 25 druzích rostlin patřících do čeledi *Brassicaceae* (Cintas *et al.*, 2002). Onemocnění je charakterizováno malými hnědými skvrnami na spodní straně listů, jako důsledek infekce po napadení skrz průduchy (Sherf and MacNab, 1986; Zhao *et al.*, 2000). *Psm* způsobuje tři typy symptomů: vodnaté, chlorotické a nekrotické léze. Infekce pokračuje srůstem lézí způsobující rozsáhlá poranění a deformace růstu, což má za následek snížení kvality porostu a sklizňové ztráty (Zhao *et al.*, 2000).

***Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Wormald 1893) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále jen *Psm*)**

*Psm* může parazitovat na většině druhů rodu *Prunus*, zejména na třešni (Obr.7), višni a slivoni (Kůdela *et al.*, 2002). Bakterie může přežít do další sezóny v nádorech v korové dřevu, ve zdánlivě zdravých pupenech a systémově ve vaskulárním systému. Bakterie se v těchto místech na jaře zmnoží a je rozšířena deštěm do květů a mladých listů. *Psm* může žít v epifytické fázi na povrchu listů a květů bez symptomů od kvetení až do opadu listů na podzim. Po opadání listů se bakterie může dostat do vnitřku rostliny skrz čerstvé jizvy. Propuknutí korové nekrózy je často spojeno s prodlouženou zimou, mrazem, vlhkým počasím pozdě na jaře nebo se silnými bouřemi, které poraní vznikající květy a listy. Mráz může podpořit infekci v listovém pletivu, to ale závisí na přítomnosti vlhkého počasí. Pro vznik silnější nákazy je potřeba, aby se nejméně 24 hodin vyskytovala volná voda na povrchu listu a byla vysoká relativní vlhkost vzduchu. Pokud se teploty pohybují mezi 21 a 27°C, první příznaky se projeví po 5 dnech (Jones, 2006).

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

*Psph* je původcem bakteriální gloriolové spály fazolu (*Phaseolus vulgaris*). Typickými příznaky jsou malé, nepravidelné, tmavě vodnaté skvrny na listech a luscích, často obklopené světle zeleným nebo nažloutlým prstencem – halo (Obr.8), způsobeným phaseolotoxinem (Kůdela *et al.*, 2002). Podobně jako u ostatních fluorescentních pseudomonád i buňky *Psph*



jsou pokryty slizem složeným hlavně z extracelulárních polysacharidů (EPS) levanu a alginátu (Rudolph, 1995; Hettwer *et al.*, 1997). Některé studie ukazují, že alginát produkovaný fytopatogenními pseudomonádami působí jako faktor virulence, který poskytuje enkapsulovaným bakteriím ochranné prostředí a je zodpovědný za vodnaté typy symptomů na infikované tkáni rostliny (Gross and Rudolph, 1987; Rudolph *et al.*, 1994)

#### ***Pseudomonas syringae* pv. *pisii* (Sackett 1916) Young, Dye & Wilkie 1978 (dále jen *Psp*)**

Bakteriální spála hrachu je ekonomicky významným patogenem, způsobující až 30% ztráty. Symptomy se vyskytují na všech nadzemních orgánech, ale nejčastěji na stoncích a palistech. Tvoří vodnaté, později olivově zelené až purpurové hnědé skvrny, které se šíří směrem nahoru k palistům a jednotlivým listům (Obr.9). Žilky hnědnou až černají. Rozšíří-li se infekce po celé rostlině, může dojít k jejímu uschnutí a odumření. Za suchého teplého počasí se může infekce zastavit. Patogen je přenosný osivem, přičemž vnější kontaminace není rozhodující (Kůdela *et al.*, 2002).

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

Onemocnění zvané bakteriální pruhovitost ovsa je způsobena *Psst*. Toto onemocnění je charakterizováno jako vodnaté léze, které srůstají a vytváří podlouhlé pruhy podél žilnatin listů, které nekrotizují (Obr.10). Symptomy postrádají chlorotické halo. Ačkoliv jsou příznaky nákazy vyvolané touto bakterií velmi odlišné od těch způsobených *Psc*, jsou fyziologicky nerozeznatelné až na jednu výjimku: *Psst* neprodukuje tabtoxin (Elliott, 1927; Schaad and Cunfer, 1979). Některé odrůdy ovsa vykazují stejný stupeň vnímavosti k pruhovitosti, jako ke gloriolové skvrnitosti. Některé spontánně mutované *Psc*, které ztratily produkci tabtoxinu, tvoří stejné symptomy jako *Psst* (Elliott, 1927).

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

*Pss* způsobuje onemocnění na mnoha druzích rostlin (Obr.11), ale jen specifická forma této bakterie způsobuje bakteriální skvrnitost fazolu. *Pss* může růst na povrchu rostliny, včetně puklých a vyschlých zrn, aniž by způsobovala nákazu. Bakteriální skvrnitost na fazolu často nastane po rozmachu epifytické populace. Více huňatá a jiné plevelné rostliny byly pozorovány jako přezimující zdroj nákazy. Nedávný výzkum napovídá, že plevelné rostliny nejsou tak významným zdrojem patogena, jako samotné posklizňové zbytky fazolu. Patogen

se rozšiřuje deštěm a zavlažovacími postřiky. Bakterie se taktéž může rozšiřovat náradím používaným na postižených polích a lidmi nebo zvířaty po nich se pohybujících. *Pss* může přežít i na osivu fazolu. Přenos osivem většinou slouží k zavlečení bakterie na nová místa, zatímco posklizňové zbytky slouží spíše k rozšíření epidemie (Jones, 2006).

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

Kmen DC3000, který byl nedávno osekvenován v The Institute of Genomic Research (TIGR), je modelovým organismem pro molekulární studie v oblasti interakcí patogen-rostlina (Buell *et al.*, 2003). V přirozeném prostředí patogen způsobuje bakteriální skvrnitost rajčete a může také nakazit *Arabidopsis thaliana* a některé brukvovité rostliny (Whalen *et al.*, 1991).

Rozvoj choroby podporují nízké teploty a četné jarní srážky, které mohou zapříčinit až 20% ztrát výnosu a sníženou kvalitu rajčat. Počátečními příznaky jsou malé (1-2 mm v průměru), vodnaté, tmavě hnědé až černé skvrny, rozvíjející se na mladých listech. Později se skvrny na starších listech a plodech zvětší a splynou, čímž způsobí jejich seschnutí a odbarvení (Obr.12). Na jaře 1999 a 2000 bylo značné rozšíření této choroby zaznamenáno ve východní Anatolii v Turecku, kde způsobila závažné škody na sklizni rajčat. (Sahin, 2001)

Klíčovým faktorem patogenity *Pst* a mnoha dalších rostlinných a živočišných bakterií je sekreční systém typu III, který dopravuje produkty genů virulence dovnitř hostitelských buněk. *Hrp/hrc* mutanty *Pst*, které postrádají funkční sekreční systém typu III, ztrácejí svoji schopnost vyvolat hypersenzitivní reakci v nehostitelských rostlinách a patogenitu v hostitelských rostlinách. (Collmer *et al.*, 2000).

## 2.2. Použité molekulárně biologické metody

### 2.2.1. Rep-PCR

Krátké rozptýlené repetitivní sekvence používané při rep-PCR byly popsány u eubakterií. Tyto oblasti patří do skupiny takzvaných rozptýlených repetice, které zpravidla nejsou delší než 200 bp, jsou nekódující, intercistronické (mezigénové), rovnoměrně rozmístěné po genomu a nemají tandemové uspořádání. Charakteristické prokaryotické repetice, jako jsou sekvence enterobakteriálního repetitivního intergenového konsenzu (ERIC, 124-127 bp) a repetitivní extragenické palindromické sekvence (REP, 35-40 bp), byly objeveny v mnoha různých enterobakteriálních druzích (Versalovic *et al.*, 1991). BOX (154 bp) oblast není svými vlastnostmi podobná výše zmiňovaným. Repetice vytváří stabilní sekundární struktury a v některých případech je transkribována. Většina BOX elementů se vyskytuje v těsné blízkosti genů. To poukazuje na potencionální roli regionu kontrolujícího expresi genů spojených s virulencí a kompetencí. Tato oblast byla také od počátku používána pro účely molekulární typizace.

Sekvence REP a ERIC byly popsány jen u Gram-negativních střevních bakterií a úzce příbuzných kmenů, zatímco BOX elementy byly popsány jen u Gram-pozitivní *Streptococcus pneumoniae* (Martin *et al.*, 1992). Shodné primery každého z elementů byly použity v polymerázové řetězové reakci navržené k amplifikaci regionů mezi sousedními repetitivními sekvencemi. Tento proces, nazývaný rep-PCR, produkuje jednoznačné DNA profily, které dovolují rozdělení eubakteriálních druhů a tříd. (Versalovic *et al.*, 1991). Navzdory sekvencím DNA a hybridizačním datům která naznačují, že ERIC, BOX a REP elementy mají restriční funkci jen u eubakteriálních druhů, je rep-PCR v současnosti často používáno pro fylogenetickou analýzu a diferenciaci bakteriálních druhů. Metoda byla aplikována na různé bakteriální rody, včetně *Rhizobium*, *Frankia*, *Staphylococcus*, *Legionella*, *Xanthomonas* a *Pseudomonas*. Rovněž se je známo použití rep-PCR u hub rodů *Aspergillus* a *Fusarium* (Williams *et al.*, 1990).

Bylo prokázáno, že fingerprinting pomocí rep-PCR je dobře opakovatelná a jednoduchá metoda použitelná pro rozlišení úzce příbuzných druhů a určení jejich fylogenetické příbuznosti, čímž lze studovat jejich rozmanitost v ekosystému. Následnou počítačovou analýzou lze zpracovat ucelené informace a po vytvoření databáze je možné provádět bakteriální diagnózu. (de Bruijn, 1996)

### 2.2.2. Makrorestrikční analýza a pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Metoda získání intaktní genomové DNA pro účely restrikční analýzy je založena na imobilizaci bakteriálních buněk v agarózovém bločku, ve kterém při izolačních a purifikačních krocích nedochází k mechanickému naštěpení nukleové kyseliny. Takto získaná DNA je štěpena pomocí vhodných restrikčních enzymů produkujících fragmenty ve velikostech 50kb až 2 000kb, které jsou následně separovány pomocí PFGE.

Metoda PFGE je založena na pohybu DNA v agarózovém gelu a umožňuje separaci fragmentů DNA o velikosti od 10kb do 10 000kb. V průběhu elektroforézy DNA nad 30-50 kb migruje stejnou rychlostí bez ohledu na velikost. To je pak na gelu vidět jako jediný, velký, rozptýlený pruh. Nicméně když je DNA nucena ke změně směru v průběhu elektroforézy, fragmenty různé velikosti se v tomto pruhu začnou rozdělovat. S každým přeorientováním směru elektrického pole vůči gelu se menší úseky DNA začnou pohybovat v novém směru rychleji, než úseky větší. Tak se větší fragmenty opožďují a začnou se oddělovat od menších.

Využití PFGE je různorodé. Zahrnuje klonování dlouhých rostlinných DNA za použití uměle vytvořeného kvasinkového chromozomu (yeast artificial chromosome - YAC) a klonovacího vektoru P1 (Ecker, 1990); identifikaci polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) a tvorbu fyzických map; zjišťování in vivo chromozomálních zlomů a degradací (Elia, *et al.*, 1991); a zjišťování počtu a velikosti chromozomů („elektroforetický karyotyp“) kvasinek, hub a parazitů jako *Leishmania*, *Plasmodium* a *Trypanosoma* (Gibson, 1986).

Nejpoužívanějšími technikami, které pro změnu elektrického pole používají úhly menší než 180° jsou „Contour-clamped homogeneous electric field“ (CHEF), která byla použita i v našem případě, „rotating gel electrophoresis“ (RGE), „transverse alternating field electrophoresis“ (TAFE) a podobná ST/RIDEm. (Clark, *et al.*, 1988). Tyto systémy vyžadují speciální elektroforetické vany se specifickými elektrodami a jsou napojeny na elektronickou kontrolu pro přepínání úhlů a programování běhu elektroforézy. CHEF a RGE udržují homogenní elektrické pole v kombinaci s horizontálním gelem. CHEF mění směr elektrického pole elektronicky a ke změně směru putování DNA využívá změnu polaritu v sadě elektrod. U RGE je elektrické pole stálé. Pro pohyb DNA jiným směrem se zde otočí gel. TAFE a ST/RIDEm pro vznik rovných drah používají komplikovanou geometrii mezi elektrodami a vertikálně umístěným gelem.

Pro zvýšení rozsahu oddělovaných velikostí a zlepšení rozlišení dlouhých fragmentů DNA je potřeba menší úhel změny směru migrace, který je mezi 96 a 140°, přičemž 120° se používá nejčastěji. Menší úhly (např. 100°) zvyšují mobilitu DNA, zpravidla bez většího vlivu na rozlišení fragmentů. Minimální úhel je přibližně 96°. Nižší úhly vážně narušují oddělování.

### 3. Cíl práce

1. Stanovení genetické variability mezi patovary bakterie *Pseudomonas syringae* pomocí metody rep-PCR a restrikčního mapování pomocí PFGE.
2. Zvolení nejvhodnějšího postupu pro izolaci bakteriální DNA z čistých bakteriálních kultur.
3. Rozšíření sbírky patovarů *Pseudomonas syringae*.
4. Optimalizování podmínek pro molekulární analýzu metodou PFGE.
5. Rozšíření poznatků o patovarech *Pseudomonas syringae*.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Bakteriální kmeny *Ps*

K analýze byly použity patovary z České sbírky mikroorganismů Masarykovy university v Brně (Tab.1). Ty byly uchovávány lyofilizované, nebo zmražené v živných médiích při  $-60^{\circ}\text{C}$ . Tyto patovary jsou shromažďovány ústavem molekulární biologie rostlin Akademie věd v Českých Budějovicích a tato sbírka je neustále rozšiřována v rámci řešení grantu, který si klade za cíl komplexní analýzu genomu patovarů *Ps*

### 4.2. rep-PCR

#### 4.2.1. Kultivační podmínky a živná média

Všechny patovary byly kultivovány při  $23^{\circ}\text{C}$  po dobu 48 hodin na pevném King-B médiu (2g Proteose Peptone no. 2; 1g glycerolu; 0,15g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,15g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5g agaru, 100ml destilované vody; upraveno na pH 7,2).

#### 4.2.2. Izolace bakteriální DNA

Bakteriální kolonie byly odebírány bakteriální kličkou a přeneseny do 100 $\mu\text{l}$  TE. Bakteriální suspenze byla následně zmražena při  $-68^{\circ}\text{C}$ .

Izolace DNA probíhala čtyřmi způsoby. První způsob zahrnuje 10 minutový lyzační krok ve vroucí lázni, kterým se uvolní DNA a z bakteriálních buněk. Následně byl lyzát centrifugován po 2 minuty při 10 000 RPM a umístěn do  $-20^{\circ}\text{C}$ . Takto získaná DNA nebyla dále purifikována. Druhým způsobem byla izolace využívající proteolytických vlastností lysozymu s následnou purifikací nukleové kyseliny (Tab.2). Třetím způsobem byla izolace pomocí komerčně dostupného kitu DNeasy plant mini (QiaGen). Tato metoda využívá kolonky se speciálně upravenou membránou, na které dochází v několika krocích k purifikaci DNA. Poslední způsob izolace DNA byl rovněž za použití komerčního kitu InstaGene Matrix (Biorad). Ten využívá negativně nabitě mikroskopické částice ve speciálním vazebném roztoku, které mají schopnost vázat kovové ionty a tím inhibovat aktivitu nukleolytických enzymů. K samotnému uvolnění DNA dochází rovněž ve vroucí lázni. Ve všech případech byla DNA uchovávána při  $-20^{\circ}\text{C}$

### **4.2.3. rep-PCR**

Reakční směs byla připravena do celkového objemu 15 $\mu$ l. Do 5,5  $\mu$ l sterilní H<sub>2</sub>O bylo přidáno 7,5  $\mu$ l PPP MasterMixu (Top-Bio), 1 $\mu$ l primeru (20 pmol/ $\mu$ l) a 1 $\mu$ l vyizolované DNA. Amplifikační program se skládal z úvodní denaturace 95°C/5min, 30 cyklů 94°C/1min, 50°C/2 min (pro BOX a ERIC) nebo 40°C/2min (pro REP), 70°C/5 min, závěrečná elongace 70°C/10min. Program byl převzat z předchozí vědecké práce (Rademarker and de Bruijn, 1997) a modifikován. Došlo ke prodloužení doby annealingu a zkrácení doby syntézy. Všechny reakce byly prováděny na termocykleru GenAmp system 9600 (Perkin Elmer).

Amplifikované PCR fragmenty byly rozděleny pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu (pufr 0,5x TBE), při 120V, po dobu 60 minut. DNA byla obarvena interkalačním činidlem SYBR Green<sup>®</sup>, které bylo obsaženo již ve vkládacím pufru (Xylen Cyanol/Bromphenol Blue). Pro rovnoměrné zahřívání gelu, byla elektroforetická vana umístěna během samotné separace na orbitální třepačku při rychlosti otáčení 50 ot./min.

Výsledný genetický otisk byl zpracován dokumentačním systémem Kodak EDAS 290 a analyzován specializovaným softwarem Kodak 1D. Získaná data byla dále analyzována ve statistickém balíku Statistica (Statsoft) pomocí modulu pro shlukovou analýzu s využitím metody UPGMA (Sneath and Sokal, 1973). Výsledná data byla graficky vyjádřena pomocí dendrogramu.

## **4.3. PFGE**

### **4.3.1. Kultivační podmínky a živná média**

Pro kultivaci všech patorarů bylo použito tekuté King-B médium. Kultivace probíhala za stálého promíchávání na orbitální třepačce, rychlostí 150 ot/min, při 23°C po dobu 48 hodin. Následně byla spektrofotometricky určena hustota bakterií v kultuře.

### **4.3.2. Izolace bakteriální DNA**

Pro izolaci a následné přečištění bakteriální DNA byl použit izolační kit CHEF Genomic DNA Plug kit (BioRad). Bylo postupováno podle přiloženého protokolu pro izolaci bakteriální DNA. Díky neuspokojivým výsledkům, bylo v protokolu provedeno několik modifikací (změny teplot a časů při některých krocích, použití jiných reagensí).



### **4.3.3. PFGE**

Byl použit přístroj CHEF-DR II (BioRad). Postupováno bylo podle manuálu. Počáteční „switch time“ byl nastaven na 30s a závěrečný na 60s. Elektrické napětí bylo nastaveno na 6V/cm a teplota na 14°C. Výsledný elektrický proud se pohyboval okolo 120mA.

## 5. Závěr

## 6. Závěr

1. Izolace bakteriální DNA pomocí komerčních kitů DNeasy plant mini a InstaGene Matrix a pomocí lysozymu je kvalitativně srovnatelná. Metoda izolace bakteriální DNA pomocí kitu InstaGene Matrix, při přibližně stejné časové náročnosti, jako metoda izolace DNA povařením, vykazuje výrazně lepší výsledky
2. Metoda rep-PCR je velmi perspektivní a univerzální metodou, která je využitelná jak pro studium genetické variability v rámci různě rozsáhlých skupin, tak pro specifickou a citlivou determinaci jednotlivých bakteriálních taxonů. K hlavním výhodám patří využití univerzálních PCR primerů pro jakýkoliv bakteriální druh při zachování vysoké specifčnosti i mezi velmi příbuznými jedinci.
3. Při použití techniky rep-PCR vykazují testované kmeny *Pseudomonas syringae* značnou genetickou variabilitu. Metoda produkuje spolehlivě odlišitelné genetické profily pro každý patovar.
4. Sběrka patovarů bakterie *Pseudomonas syringae* se v rámci řešení grantu GA ČR č. 522/07/P338 bude nadále rozšiřovat

## 7. Seznam použité literatury

- Bradbury, J. F.** (1986). *Pseudomonas* Migula 1894. In *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. 110-184. Egham, UK: International, Mycobiological Institute.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., DeBoy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., et al.** (2003). The complete sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10181–10186.
- Carle, G.F., Frank, M., Olson, M.V.** (1986). Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* **232**, 65-68.
- Cintas, N.A., Koike, S.T., Bull, C.T.** (2002). A new pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv. nov., proposed for the causal agent of bacterial blight of broccoli and broccoli raab. *Plant Dis.* **86**, 992–998.
- Clark, S.M., Lai, E., Birren, B.W., Hood, L.** (1988). A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogenous electric fields. *Science* **241**, 1203-1205.
- Collmer, A., Badel, J. L. , Charkowski A. O., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K., Alfano, J. R.** (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8770–8777.
- Cunfer, B.M, Schaad, N.W.** (1976). Halo blight of rye. *Plant Dis. Rep.* **60**, 61–64.
- De Bruijn, F. J., Rademaker, J., Schneider, M., Rossbach, U. Louws, F. J.** (1996). Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses In: *Biology of Plant-Microbe Interaction; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions* (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Eds.) *APS Press*, 497-502.
- Ecker, J.** (1990). PFGE and YAC analysis of the *Arabidopsis* genome. In *Methods: A Companion to Methods of Enzymology. PulsedField Electrophoresis* (B. Birren and E. Lai, eds.). *Academic Press, San Diego*. **2**, 186-194.
- Elia, M.C., DeLuca, J.G., Bradley, M.O.** (1991). Significance and measurement of DNA double strand breaks in mammalian cells. *Pharmacology & Therapeutics* **51**, 291-327.
- Elliott C.** (1920). Halo blight of oats. *J. Agric. Res.* **19**,139–172.

- Elliott, C.** (1927). Bacterial stripe blight of oats. *J. Agric. Res.* **35**, 811–824.
- Feil, H., Feil, W. S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E., et al.** (2005) Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch., R., Grimont, F., Grimont, P. A.** (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremiae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 469-478.
- Gibson, W., C., Miles, M., A.,** (1986). The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* **5**, 1299–1305.
- Gross, M., Rudolph, K.** (1987). Studies on the extracellular polysaccharides (EPS) produced in vitro by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. I. Indications for a polysaccharide resembling alginic acid in seven *Pseudomonas syringae* pathovars. *J. Phytopathol.* **118**, 276–287.
- Harder, D.E.** (1973). Halo blight of oats in Kenya. *East. African. Agric. For. J.* **38**, 241–245.
- Hettwer, U., Nöllenburg, M., Rudolph, K.** (1997). Occurrence of levansucrase in phytopathogenic bacteria. In: Rudolph, K., T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian and J. von Kietzell (eds), *Developments in Plant Pathology.* **9**, *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens, pp. 277–280. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Jones, J.** (2006). *Pseudomonas* Lecture, University of Florida, dostupné na World Wide Web: <<http://grove.ufl.edu/~jbjones/Pseudomonas%20lecture%202006.doc>>
- Kingsolver, C.H.** (1944). Pathogenicity on *Avena* and growth response of *Pseudomonas coronafaciens* (Elliott) Stapp. *IA. St. Col. J. Sci.* **19**, 29–31.
- Kůdela, V., Novacky, A., Fucikovský, L.** (2002). Rostlinolékařská bakteriologie. Vydání 1. 347 s. ISBN 80-200-0899-3
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchel, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R.** (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3479-3483.
- Müller, H.J.,** (1964). Studies on the leaf spot diseases of oats: III. Bacterial leaf spot pathogens of oats (*P. coronafaciens* and *P. striafaciens*). *Phytopathol Z* **49**, 325–338.

- Rademaker, J.L.W., de Bruijn F.J.** (1997). Characterization and classification of 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.
- Reddy, C.S., Godkin, J.** (1923). A bacterial disease of brome-grass. *Phytopathology* **13**,75–86.
- Ribeiro, R.D.L.D, Durbin, R.D., Army, D.C., Uchytil, T.F.** (1977). Characterization of the bacterium inciting chocolate spot of corn. *Phytopathology* **67**, 1427–1431.
- Ross, J. P.** (1987). Viral and bacterial diseases. Soybeans: Improvement, Production and Uses. J. R. Wilcox, ed. ASA, CSSA, SSSA Agron. **16**, 729-755.
- Rudolph, K. W. E.** (1995). *Pseudomonas syringae* pathovars. In: Singh, U. S., R. P. Singh and K. Kohmoto (eds), Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, *Prokaryotes* **1**, 47–138.
- Rudolph, K. W. E., Gross, M., Ebrahim-Nesbat, F., Nöllenburg, M., Zomorodian, A., Wydra, K., Neugebauer, M., Hettwer, U., El-Shouny, W., Sonnenberg, B., Klement, Z.** (1994). The role of extracellular polysaccharides as virulence factors for phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads. In: Kado, C. I. and J. H. Crosa (eds), Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence, pp. 357–378. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sahin, F.** (2001). Severe outbreak of bacterial speck, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, on field-grown tomatoes in the eastern Anatolia region of Turkey. NEW DISEASE REPORT *Plant Path.* **50** (6), 799–799.
- Sherf, A.F., MacNab, A.A.** (1986). Vegetable Diseases and their Control, 2nd edn. New York, USA: John Wiley & Sons.
- Schaad, N.W., Cunfer, B.M.** (1979). Synonymy of *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas coronafaciens* pathovar *zeae*, *Pseudomonas coronafaciens* subsp. *atropurpurea*, and *Pseudomonas striafaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**,213–221.
- Sinclair, J. B., Backman, P. A.** (1989). Compendium of Soybean Diseases. 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul,MN.
- Sinden, S.L., Durbin, R.D.** (1970). A comparison of the chlorosis-inducing toxin from *Pseudomonas coronafaciens* with wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci*. *Phytopathology* **60**, 360–364.
- Sneath, P. H. A., Sokal, R. R.** (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.

- Taylor, P.A., Maxwell, D.P., Durbin, R.D.** (1971). Occurrence in Wisconsin of halo blight of timothy incited by a *Pseudomonas* species. *Plant. Dis. Rep.* **55**, 361–362.
- Tisselli, O., Sinclair, J. B., Hymowitz, T.** (1980). Sources of resistance to selected fungal, bacterial, viral, and nematode diseases of soybeans. University of Illinois Urbana-Champaign International Publications, INTSOY Ser. no. **18**.
- Toben, H., Mavridis, A., Rudolph, K.** (1989). Basal glume rot (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*) on wheat and barley in FRG and resistance screening of wheat. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **19**, 119-25.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R.** (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6823-6831.
- Whalen, M., Innes, R., Bent, A., Staskawicz, B.** (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis thaliana* and a bacterial gene determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* **3**, 49–59.
- Wilkie, J.P.** (1972) Halo blight of oats in New Zealand. *N Z J. Agric. Res.* **15**, 461–468.
- Williams, J.G.K, Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- Wolf, F. A.** (1920). Bacterial blight of soybean. *Phytopathology* **10**, 121-132.
- Zhao, Y., Damicone, J.P., Demezas, D.H., Rangaswamy, V., Bender, C.L.,** (2000). Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Plant Dis.* **84**, 1015–20.

## 8. Tabulky

Tab.1 Použité bakteriální kmeny *Pseudomonas syringe*

Kmen	Patovar
BCCM/LMG 5093	<i>tomato</i>
BCCM/LMG 2330	<i>striafaciens</i>
BCCM/LMG 5060	<i>coronafaciens</i>
BCCM/LMG 5095	<i>atrofaciens</i>
BCCM/LMG 5066	<i>glycinea</i>
BCCM/LMG 2132	<i>apii</i>
BCCM/LMG 5067	<i>helianthi</i>
BCCM/LMG 5070	<i>lachrymans</i>
BCCM/LMG 5075	<i>morsprunorum</i>
BCCM/LMG 2245	<i>phaseolicola</i>

Tab.2 Přesný postup izolace bakteriální DNA pomocí lysozymu

<ul style="list-style-type: none"><li>• přenesení malého množství bakteriální pasty do 100µl TE pomocí párátko a následná homogenizace</li><li>• přidání roztoku lysozymu (vždy čerstvě připravený z 3mg lysozymu + 100µl TE)</li><li>• přidání 800µl TE a promíchání</li><li>• umístění do 37°C na 15 minut</li><li>• centrifugace při 10 000 RPM/ 1 minutu při 4°C</li><li>• odstranění supernatantu</li><li>• přidání 300µl TE a důkladná homogenizace</li><li>• přidání 100µl SDS (10%)</li><li>• promíchání a inkubace při 56°C do vyčerení roztoku</li><li>• přidání 200µl K-acetátu a promíchání</li><li>• centrifugace při 15 000 RPM/ 5 minut při 4°C</li><li>• přenesení supernatantu bez sraženin do nové mikrozkušavky</li><li>• přidání 1V izopropanolu</li><li>• umístění do -20°C na 10 minut</li><li>• centrifugace při 18 000 RPM/ 5 minut při 4°C</li><li>• odstranění supernatantu</li><li>• promytí pelety etanolem (70%)</li><li>• vysušení</li><li>• rozpuštění ve 100µl TE při 65°C</li></ul>
--

## 9. Obrázky

Obr.1 Symptomy na ječmenu způsobené *Psa*



Obr.2 Symptomy na ovsu způsobené *Psc*



Obr.3 Symptomy na sóji způsobené *Psg*





Obr.4 Symptomy na slunečnici způsobené *Psh*



Obr.5 Symptomy na okurce způsobené *Psl*



Obr.6 Symptomy na kvěťáku způsobené *Psm*



Obr.7 Symptomy na třešni způsobené *Psm*



Obr.8 Symptomy na fazolu způsobené *Psp*



Obr.9 Symptomy na hrachu způsobené *Psp*



Obr.10 Symptomy na ovsu způsobené *Psst*



Obr.11 Symptomy na čiroku způsobené *Pss*

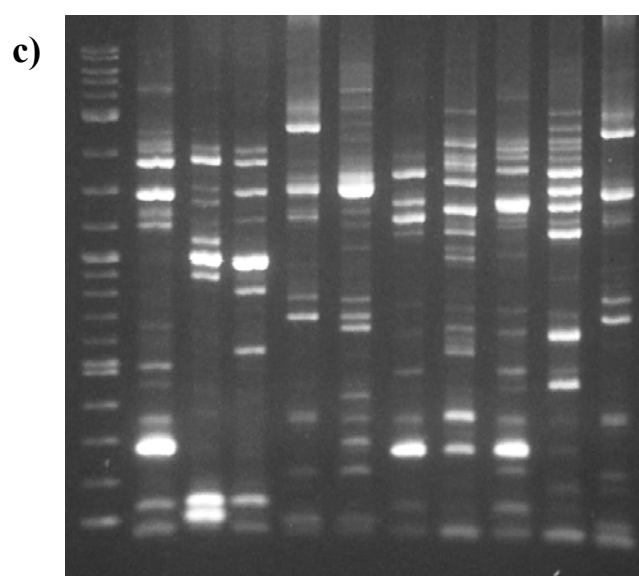
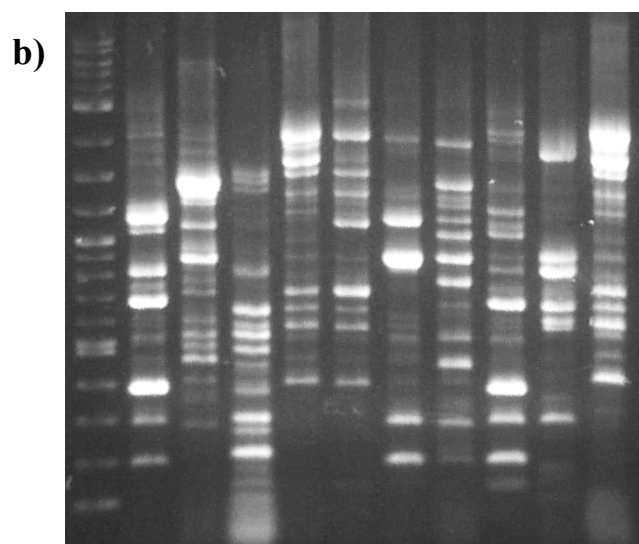
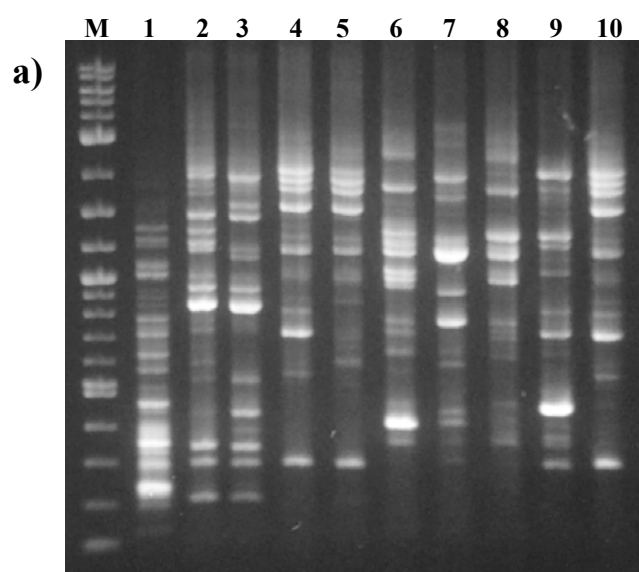


Obr.12 Symptomy na rajčeti způsobené *Pst*





Obr.13 rep-PCR při použití primerů BOX (a), ERIC (b) a REP (c)



M – 2-log DNA Ladder (New England Biolabs)

1 – *P. syringe* pv. *tomato*

2 – *P. syringe* pv. *striafaciens*

3 – *P. syringe* pv. *coronafaciens*

4 – *P. syringe* pv. *atrofaciens*

5 – *P. syringe* pv. *glycinea*

6 – *P. syringe* pv. *apii*

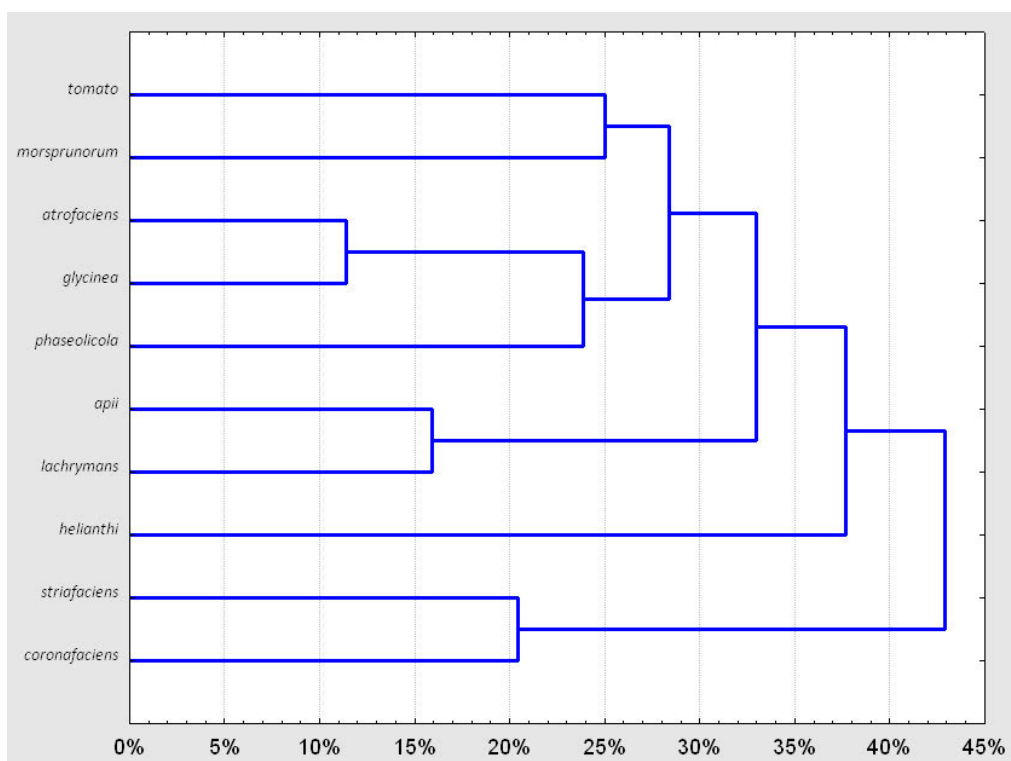
7 – *P. syringe* pv. *helianthi*

8 – *P. syringe* pv. *lachrymans*

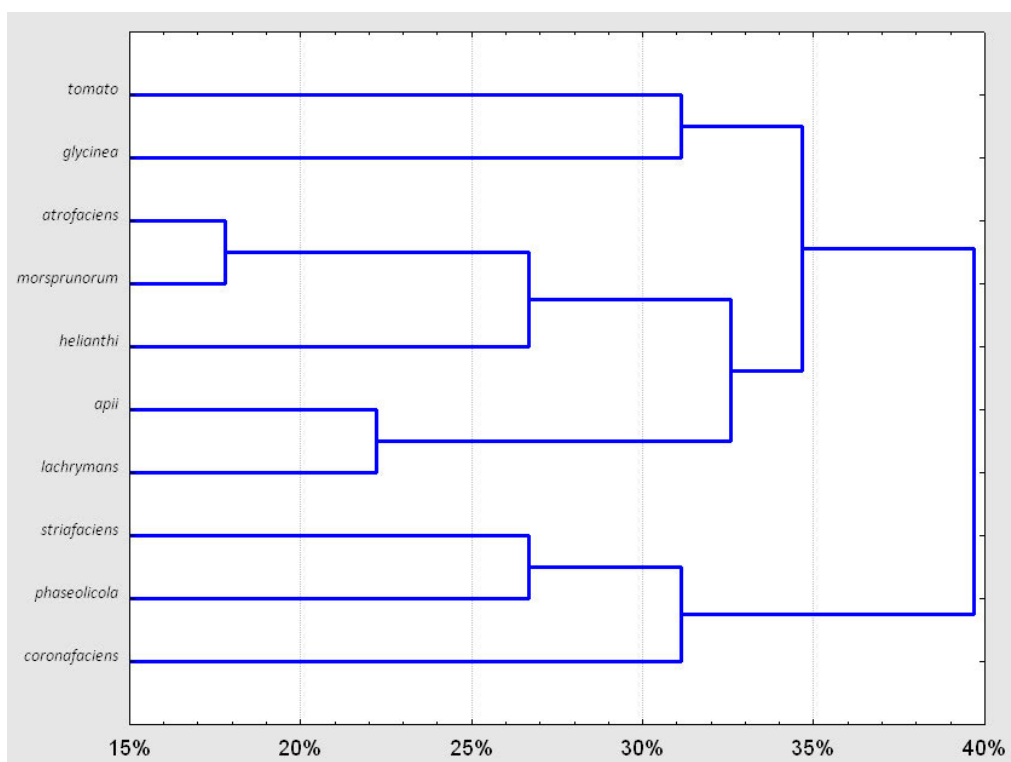
9 – *P. syringe* pv. *morsprunorum*

10 – *P. syringe* pv. *phaseolicola*

Obr.14 Dendrogram shlukové analýzy rep-PCR při použití primeru BOX



Obr.15 Dendrogram shlukové analýzy rep-PCR při použití primeru ERIC



Obr.16 Dendrogram shlukové analýzy rep-PCR při použití primeru REP

