

# Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



## Nejvýznamnější fytopatogenní bakterie druhu *Pseudomonas syringae* na území ČR

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Ryšánek Pavel CSc.

Školitel specialista: Ing. Kokošková Blanka CSc.

Autor práce: Jindrová Iva

2009

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: **Nejvýznamnější fytopatogenní bakterie druhu *Pseudomonas syringae* na území ČR** vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne 1.4.2009

.....

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlu Ryšánkovi CSc. za zprostředkování bakalářské práce ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Ruzyni. Dále bych chtěla poděkovat za pomoc a trpělivost při zpracování práce Ing. Blance Kokoškové, CSc., pod jejímž odborným vedením práce vznikla.

## Autorský referát

První část bakalářské práce je zaměřena teoreticky a zabývá se patovary fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae* významnými v České republice. V rámci druhu *P. syringae* je známo více než 45 různých patovarů. Nejdůležitější z nich je bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, která škodí na mnoha druzích rostlin. Většina ostatních patovarů je charakteristická spíše úzkým hostitelským okruhem. K takovým patovarům patří např. patovar *morsprunorum* škodící na peckovinách, pv. *tomato* škodící na rajčeti a pv. *lachrymans* na okurce, pv. *pisi*, *phaseolicola* a *glycinea*, které najdeme na luskovinách a dále pv. *coronafaciens*, *atrofaciens* a *striaefaciens* vyskytující se na obilninách.

Bakterie *P. s.* pv. *syringae* je velmi rozšířena po celém světě nejen jako patogen, ale i jako epifyt ve fylosféře. Na rostlinách může přežívat v tzv. rezidentské fázi, kdy rostlinám neškodí. Nejčastěji způsobuje listové nekrózy, pro které je typické, že bývají ohraničeny světlým kruhem tzv. halo. U peckovin způsobuje tato bakterie černání pupenů, někdy i spálu, pokud infekce postupuje velmi rychle.

O bakterii *P. s.* pv. *syringae* je známo, že je jedním ze zdrojů krystalizační aktivity. Ta se projevuje tím, že některé kmeny této bakterie podněcují tvorbu krystalizačních jader při teplotách těsně pod bodem mrazu. Krystalizačně aktivní bakterie mají v přírodě velký význam. Spolupodílí se na mrazovém poškození bylin a dřevin v době jarních a podzimních mrazů, kdy teploty kolísají kolem 0°C.

Cílem druhé části bakalářské práce bylo zjistit, zda se v případě napadených rajčat z jižní a střední Moravy jedná o bakteriálního patogena. Dle charakteristických příznaků na listech i zelených plodech, jsme se domnívaly, že se jedná o bakteriální tečkovitost rajčete. Tuto chorobu způsobuje bakterie *P. s.* pv. *tomato*, avšak stejné příznaky vyvolává i *P. s.* pv. *syringae*. V testech jsme zjišťovaly, zda získané izoláty byly fytopatogenní i to, o jaký patovar se jedná.

Části rostlinného pletiva se skvrnami jsme z rajčat vyřízly sterilními skalpely a rozmacerovaly. Poté jsme provedly křížový roztěr na King B médium. Na něm bakterie rodu *Pseudomonas* fluoreskovaly. Po opakovaných roztěrech a kultivaci *P. misek* s bakteriemi v termostatu při teplotě 23 - 25 °C jsme získaly čisté kultury izolátů, které jsme zařadily do identifikačních testů.

Izoláty jsme určily pomocí testu oxidázy, kde byly fytopatogenní bakterie negativní a testu hypersenzitivity na tabáku, kde byly naopak pozitivní. Aglutinační test, který jsme

provedly se dvěma komerčními antiséry pro dva patovary druhu *Pseudomonas syringae* vyskytující se na rajčeti, pocházely od firmy Neogén Europe Ltd. (VB).

Celkem jsme testovaly 30 izolátů podezřelých na *Pseudomonas syringae*. Z nich bylo 28 fytopatogenních, protože to byly izoláty oxidáza negativní a zároveň pozitivní v testu hypersenzitivity na tabáku. Dva další izoláty byly podle výsledků v obou těchto testech nefytopatogenní.

Všech 30 izolátů jsme ověřovaly v aglutinačním testu s polyklonálními antiséry pro bakterie *P. s. pv. tomato* a *P. s. pv. syringae*. Celkem 83 % z testovaných izolátů reagovalo úplnou aglutinací s antisérem pro *P. s. pv. tomato* a tím jsme potvrdily, že patří k patovaru *tomato*. Některé z těchto izolátů reagovaly křížově i s antisérem pro *P. s. pv. syringae*. V případě 2 nefytopatogenních izolátů jsme jejich pozitivní reakci s oběma antiséry hodnotily jako falešně pozitivní, neboť neměly reagovat ani s jedním z antisér.

I když se u některých izolátů objevily křížové reakce s antisérem pro necílovou bakterii, což je u polyklonálních antisér časté, umožnily výsledky testů jednoznačný závěr. Na základě provedených testů jsme ve vzorcích rajčat získaných z různých pěstitelských oblastí jižní a střední Moravy spolehlivě prokázaly přítomnost původce tečkovitosti rajčete.

V bakalářské práci jsem použila k určení fytopatogenní bakterie v infikovaných rostlinných vzorcích jednoduché, rychlé, finančně nenáročné testy, které umožnily určit bakteriální příčinu poškození rostlin s dostatečnou spolehlivostí. Tato informace již postačí pěstiteli k tomu, aby mohl zajistit případná ochranná opatření, protože ochrana proti fytopatogenním bakteriím je stejná, ať se jedná o jakýkoli druh či patovar.

**Klíčová slova:** *Pseudomonas syringae*, oxidáza, hypersenzitivita, aglutinace

## Abstract

First part of my Bc. Thesis is aimed theoretically, and considers pathovars of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* important for Czech Republic area. Within *P. syringae* species are known more than 45 different pathovars. One of most important is *P. syringae* pv. *syringae*, which harms a lot of plant species. Major part of rest pathovars is characteristic by narrow circuit of hosts, such as pv. *morsprunorum*, which harms stone fruits, pv. *tomato* harming tomatoes, pv. *lachrymans* on cucumber, pv. *phaseolicola*, *pisi* and *glycinea* which can be found on pulse crops. Next specialized pathovars are *coronafaciens*, *atrofaciens* and *striafaciens* found able on pulse crops.

*P. s.* pv. *syringae* is widely spread over whole world not only such as pathogen but like an epiphytic bacteria in phyllosphere. On plants can survive in so-called resident phase, when plants are not harmed. Most often causes leaf necrosis, which are demarcated by bright circle, also called halo. That bacteria cause on stone fruits blacking of bud, sometimes bacterial blight, when the infection process is very fast.

*P. s.* pv. *syringae* is one of agent of soil crystallization activity, that is demonstrated by several strains of bacteria which initiate the creation of crystallization cores at temperatures very near to freezing point. Crystallization active bacteria are participating on frost damage of plant tissues, in spring and autumn period, when temperature swaying around 0 °C.

Aim of second part of this thesis was to find out if in the case of harmed potatoes from south and middle Moravia is cause by bacterial pathogen. Regarding to characteristic symptoms on leaves and fruits, we thought that the bacterial speck is presented. We tried to find out, which of pathovars *P. s.* pv. *tomato* or *P. s.* pv. *syringae* is causal agent of that disease. In test we tried to locate if the isolates were pathogenic and which pathovar is present.

Parts of plants tissues were cut by sterile dissector and macerated. After that we did a cross smear on King B medium. On that medium the *Pseudomonas* bacteria are showing the fluorescent pattern. After repeated smearing and cultivation of P. plates with bacteria in thermoregulator with temperature 23 - 25 °C we earn clear cultures of isolates, which were inserted to the identification tests.

Isolates were determined by oxidase test, where the phytopathogenic bacteria were negative, and by test of hypersensitivity on tobacco, which was positive. Agglutination test was performed by two commercial availability antibodies from Neogén Europe Ltd. (UK).

Fully were tested 30 isolates suspicious to *Pseudomonas syringae*. From that amount were 28 phytopathogenic isolates, because they were oxidase negative and simultaneously positive in tobacco hypersensitivity test. Two next isolates were in both of test negative.

All 30 isolates were determined in agglutination test with polyclonal antiserum for *P. s. pv. tomato* a *P. s. pv. syringae* bacteria. From total amount of tested isolates 83% response by full agglutination with antiserum for *P. s. pv. tomato*, that confirmed the origin. Some of that isolates reacted in cross with antiserum for *P. s. pv. syringae*. In case of two non-phytopathogenic isolates we appreciated like false positive, because they reacted with both of antisera, and they have not reacted with even of one antiserum.

Even of one isolates had cross reaction with antiserum for non-target bacteria, the results showed that samples of tomatoes contained the bacterial speck of tomato.

For disposing of this Bc. thesis I have used to evaluation of phytopathogenic bacteria in infected samples easy, fast and non-expensive tests, which allowed to us to determine the bacterial reason with sufficient reliability. That information is enough for plant grower to make a protection measures.

Key words: *Pseudomonas syringae*, oxidase, hypersensitivity, agglutination

## Obsah

1.	Úvod .....	3
2.	Cíl .....	4
3.	Literární rešerše .....	5
3.1.	Obecná část .....	5
3.2.	Rostlinolékařská bakteriologie .....	5
3.2.1.	Způsob pronikání bakterií do rostlin .....	6
3.2.2.	Šíření bakterióz a ochrana rostlin .....	6
3.2.3.	Fylosférní a rhizosférní bakterie .....	7
3.2.4.	Ambilaterální patogenita bakterií .....	7
3.2.5.	Krystalizační aktivita .....	8
3.3.	Systematika čeledě <i>Pseudomonadaceae</i> .....	8
3.3.1.	Čeleď <i>Pseudomonadaceae</i> .....	8
3.3.2.	Rod <i>Pseudomonas</i> .....	9
3.3.2.1.	Užití <i>Pseudomonas</i> jako biologické ochrany .....	10
3.4.	Významné patovary <i>Pseudomonas syringae</i> .....	11
3.4.1.	Polyfágní bakterie .....	11
3.4.1.1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> .....	11
3.4.2.	Peckoviny .....	14
3.4.2.1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> .....	14
3.4.3.	Zelenina .....	16
3.4.3.1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	16
3.4.3.2.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> .....	17
3.4.4.	Luskoviny .....	19
3.4.4.1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisii</i> .....	19
3.4.4.2.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> .....	21
3.4.4.3.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> .....	23
3.4.5.	Obiloviny .....	24
3.4.5.1.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> .....	24
3.4.5.2.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> .....	26
3.4.5.3.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>stratifaciens</i> .....	27
3.5.	Testy prováděné v bakalářské práci .....	29
3.5.1.	Test oxidázy .....	29



3.5.2.	Test hypersenzitivity na tabáku .....	29
3.5.3.	Sérologický aglutinační test .....	29
4.	Materiál a metody .....	32
4.1.	Izolace bakterií z rostlinného materiálu .....	32
4.1.1.	Médium .....	32
4.2.	Test oxidázy .....	33
4.2.3.	Postup přípravy činidel .....	33
4.3.	Test hypersenzitivity na tabáku .....	34
4.4.	Sérologický aglutinační test .....	34
5.	Výsledky .....	36
6.	Diskuse .....	40
7.	Závěr .....	43
8.	Seznam literatury .....	45
9.	Přílohy .....	49

# 1. Úvod

Bakalářská práce se zabývá studiem patovarů fytopatogenní bakterie druhu *Pseudomonas syringae*, které jsou významné v České republice. Bakterie *Pseudomonas syringae* náleží do rodu *Pseudomonas* a čeledě *Pseudomonadaceae*. Tato čeleď zahrnuje široké spektrum bakterií, které mohou být pro rostliny jednak užitečné, jednak škodlivé. Mají mnoho důležitých biologických vlastností, které jsou mnohdy vhodně využívány dokonce i v průmyslu. Tyto bakterie jsou také velmi zajímavé jako genetický materiál.

Účelem bakalářské práce bylo shrnout literární údaje o jednotlivých chorobách, které tyto fytopatogenní bakterie způsobují. Hospodářsky významnými jsou například bakterie *P. s. pv. syringae*, škodící na mnoha druzích rostlin, ale nejvíce na ovocných stromech, dále *P. s. pv. phaseolicola*, vyskytující se na fazolu a *P. s. pv. tomato*, napadající rajče. Nejméně důležité patovary z druhu *P. syringae* jsou na našem území ty, které se vyskytují na obilninách.

Pro rostlinu jsou bakterie nebezpečné především za vhodných povětrnostních podmínek, které umožňují jejich rychlý rozvoj a šíření. K přežití na povrchu rostlin potřebují bakterie příznivou teplotu a dostatečnou vlhkost. Vstupním místem bakterií do rostliny jsou přirozené otvory, především průduchy a hydatody. Nemalý význam mají mechanická poškození rostlin, ať už ta, která jsou zapříčiněna člověkem, anebo ta, která jsou způsobena větrnými dešti nebo hmyzem.

V ochraně proti bakteriálním chorobám jsou důležitá preventivní opatření. Jedním z důležitých faktorů ochrany rostlin před bakteriemi, je pěstování zdravého osiva. Dalším důležitým opatřením je výběr vhodného stanoviště, kterým jsou slunná a větrná místa umožňující rychlé osychání rostliny. K přímým ochranným opatřením náleží přípravky na bázi mědi. Antibiotika jsou sice také proti bakteriím účinná, ale v České republice jsou v ochraně rostlin zakázána. To je jistě dostatečně opodstatněné vzhledem k tomu, že si bakterie k antibiotikům vytvářejí rezistenci. V případě ošetření semen proti bakteriálním patogenům se uplatňují termická opatření, kdy se ošetřují semena rostlin tak, že se vystavují působení vyšší teplotě. Tento způsob ošetření může mít nepříznivý vliv na klíčivost semen. Výběr vhodné rezistentní odrůdy do dané oblasti je jedním z nejspolehlivějších opatření proti výskytu a šíření bakteriálních chorob.

## 2. Cíl

Cílem bakalářské práce bylo studium ekonomicky významných patovarů *Pseudomonas syringae*, které způsobují listové skvrnitosti a spály na ovocných stromech, plodových zeleninách, luskovinách a obilninách. Pozornost byla soustředěna především na polyfágní bakterii *P. syringae* pv. *syringae*.

### Dílčí cíle:

#### Teoretická část:

- Shrnutí literárních údajů o fytopatogenních bakteriích druhu *P. syringae* významných v České republice

#### Praktická část:

- Bakteriologické rozborů vzorků rajčat
  - Získání izolátů podezřelých na *P. syringae*
  - Testy oxidázy
  - Testy hypersenzitivity na tabáku
  - Sérologické testy
- Zpracování výsledků

### 3. Literární rešerše

#### 3.1. Obecná část

Bakterie jsou jednobuněčné organismy, které řadíme do říše *Prokaryota*. Nemají buněčné jádro ohraničené membránou, jasně oddělené od jiných organel buňky. Bakteriální buňky mají různé tvary (Kazda et al., 2007). Nejčastěji je to tvar tyčinkovitý, méně často kulovitý. Vlákňitý tvar se vyskytuje u poměrně rozsáhlé skupiny půdních bakterií patřících do řádu *Actinomycetales* a několika dalších rodů (Šilhánková, 1995). Při kultivaci v laboratorních podmínkách, tvoří na Petriho miskách různě barevné a tvarově odlišné kolonie. V přírodě se vyskytují ve všech prostředích—na souši, ve vodě, ve vzduchu, najdeme je i na povrchu rostlin, těl živočichů, ale i neživých předmětů. Jsou nedílnou součástí naší přírody (Kazda et al., 2007).

Bakterie rodu *Pseudomonas* mají tyčinkovitý tvar. Dle Šilhánkové (1995) jsou tyčinkovité buňky buď rovné, zakřivené, tvaru pravidelné spirály nebo dlouhé nepravidelné spirály. Různé druhy bakterií se liší poměrem délky buňky k šířce, vyskytují se jak druhy tvořící velmi krátké tyčinky podobné kokům, tak i druhy tvořící dlouhé tyčinky připomínající krátká vlákna. U většiny druhů se délka tyčinek pohybuje v rozmezí od 1 do 3  $\mu\text{m}$ ; u téhož druhu závisí na vnějších podmínkách, tedy na fyziologickém stavu buněk. Buňky, které se intenzívně rozmnožují, jsou mnohem kratší než buňky klidové. Šířka je u daného druhu poměrně stálá, nejčastěji v rozmezí od 0,5 do 1,5  $\mu\text{m}$ . Tyčinkovité bakterie se rozmnožují příčným dělením buňky.

#### 3.2. Rostlinolékařská bakteriologie

Rostlinolékařská bakteriologie pojednává o vztazích mezi prokaryotickými organismy a rostlinami, které spolu s houbami a živočichy patří k eukaryotickým organismům. Čerpá z poznatků obecné fytopatologie a bakteriologie. Bakterie, způsobující choroby rostlin (fytopatogenní bakterie) napadají hostitelské rostliny a škodí jim obdobným způsobem jako ostatní původci infekčních chorob, tj. viroidy, viry a houby. Odlišují se od nich svým specifickým postavením v systému živé přírody, genotypovými, fenotypovými, patogenními a ekologickými zvláštnostmi. Význam rostlinolékařské bakteriologie je dán především škodlivostí fytopatogenních bakterií a fytoplazem pro pěstované druhy rostlin včetně skladovaných produktů. Celkem je známo asi 500 bakterióz, fytoplazmóz, spiroplazmóz, z nichž se asi pětina až čtvrtina může vyskytovat na našem území (Kúdela et al., 2002).

### **3.2.1. Způsob pronikání bakterií do rostlin**

Bakterie mohou pronikat do rostlin v místech poranění, průduchy, lenticelami, nektariemi, hydatodami. Významnou úlohu při přenosu hraje hmyz (Rozsypal et al., 1981).

Vstup patogenů do pletiv hostitele je prvním kritickým krokem, způsobující infekci. Pro listové bakteriální patogeny jsou důležitými vstupními místy přirozené povrchové otvory, jako jsou například průduchy. Historicky byly tyto otvory považovány za pasivní vstup fytopatogenní bakterie do rostliny. Nedávná studie ukázala, že průduchy mohou hrát aktivní roli v omezení vstupu bakterie do rostliny (vrozený imunitní systém). Zjistilo se, že rostlinný patogen *P. s. pv. tomato* DC 3000 užívá k aktivnímu otevírání průduchů fytotoxin coronatin, který působí jako faktor virulence. V přírodě zpravidla vyžadují bakterie pro proniknutí do rostliny vysokou vlhkost, deštivé počasí či bouře, které by mohly podporovat otevírání průduchů nebo způsobovat zranění jako alternativní vstupní místa (Melloto et al., 2008).

### **3.2.2. Šíření bakterióz a ochrana rostlin**

Schopnost bakterie vyvolat infekci podmiňuje vnější prostředí. Pro šíření bakteriálních patogenů jsou nejdůležitější napadená semena, půda, podpovrchová voda i voda ve formě rosy, deště dále hmyz, půdní hlodavci, infikované hospodářské nářadí a stroje. Významnou roli hrají teplota a vlhkost prostředí. Fytopatogenní bakterie mohou vyvolat onemocnění rostlin, jestliže tvoří jednu či více toxických látek, vylučují enzymy rozkládající buněčnou stěnu a rostlinné hormony, což má za následek abnormální růst hostitele. Nadměrným růstem zaplňují a ucpávají cévní svazky, rostliny vadnou.

Poněvadž rostliny netvoří protilátky, jejich rezistence k infekci je jiná než u zvířat. Pro boj s rostlinnou infekcí jsou nejúčinnější vyšlechtěné rostliny rezistentní k infekci, správná kultivace, chemická dezinfekce, kontrola a karanténní opatření.

Onemocnění, které způsobují pseudomonády, jsou převážně skvrnitosti listů a plodů (Rozsypal et al., 1981).

### 3.2.3. Fylosféra a rhizosféra bakterie

Fylosféra představuje nadzemní část rostliny a je podstatně méně osídlena bakteriemi než rhizosféra. Nadzemní části rostlin trpí značným vysoušením, a proto mají na svém povrchu voskovou vrstvu, zabraňující vysychání, ale také rozvoji mikroorganismů. Za zdroj epifytické mikroflóry se považují semena, protože na jejich povrchu převládají stejné bakterie jako na povrchu rostlin (Rozsypal et al., 1981).

Ekologickými výzkumy byla prokázána neparazitická fáze v životním cyklu některých fytopatogenních bakterií. Bakterie *P. s. pv. syringae*, ale i další bakterie, plní jako epifyt významnou funkci katalyzátorů tvorby ledu na povrchu rostlin při teplotách -2 až -5°C. Patogen zabraňuje podchlazení vody při teplotách těsně pod bodem mrazu a podílí se tak na mrazových škodách způsobovaných během vegetace pozdními jarními nebo časnými podzimními mrazy. Z rostlin se bakterie dostávají do ovzduší a podílejí se jako tzv. biotická kondenzační jádra na vzniku vodních srážek (Kůdela, 1998).

Rhizosféra je oblast, kde kořeny přicházejí do styku s půdou. Mikrobiální populace, ve které převažují bakterie, je v rhizosféře mnohem větší než v okolní půdě bez kořenů. Na počet a druhové zastoupení bakterií v rhizosféře má vliv několik faktorů. Patří mezi ně druh rostliny, vegetační stádium, půdní typ a hnojení. Nejvíce bakterií se v rhizosféře nachází v období raného vývoje, kdy rostliny produkují největší množství kořenových výměšků, zatímco nejméně v období zrání. Na povrchu kořenů se nacházejí zejména fluorescentní druhy rodu *Pseudomonas*, v rhizosférní půdě nepigmentující druhy. Vyskytují se zde i fytopatogenní bakterie *P. syringae*, např. na kořenech pšenice, rajčat, fazolu a sóje (Rozsypal et al., 1981).

### 3.2.4. Ambilaterální patogenita bakterií

U některých druhů bakterií existuje dvoustranná patogenita. Tyto bakterie mají schopnost vyvolat onemocnění nejen u rostlin, ale i u živočichů a člověka. Takové vlastnosti mají např. některé kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* a *Pantoea agglomerans*. Fytopatogenní bakterie lze uplatnit i v biologické ochraně rostlin. Kmeny některých druhů *P. syringae*, zbavené genu virulence, mohou být využity v protimrazové ochraně rostlin během vegetace (Kůdela, 1998).

*P. aeruginosa* způsobuje u rostlin měkké hniloby dužnatých orgánů, listové skvrnitosti a u člověka má spojitost s cystickou fibrózou (CF), záněty močových cest, mozkových blan, středního ucha a hnisání kůže po popáleninách. Uvádí se, že 40 – 90 % pacientů s příznaky CF má dýchací cesty kolonizovány *P. aeruginosa* (Kůdela et al., 2002).

### 3.2.5. Krystalizační aktivita

Každoročně dochází k velkým ekonomickým ztrátám v důsledku poškození ovocných dřevin mrazem. Mrazové poškození může být výsledkem mechanického působení růstu ledových krystalů na buňku nebo dehydratací buněk během odčerpávání vody do rostoucích ledových krystalů. Mrazuvzdorné rostliny mohou odolávat působení mrazu několika způsoby, tolerancí ledových krystalů v pletivech či vyhnutí se jejich tvorbě, např. podchlazením vody, tj. poklesem teploty pod 0 °C bez vzniku ledových krystalů (Bilavčík et al., 1998).

Nukleační aktivita bakterií *P. syringae* je lokalizována na vnější membráně bakteriálních buněk a je podmíněna přítomností specifického oktapeptidu, který je ze 70 % tvořen proteinem. Tento oktapeptid vytváří hexagonální strukturu, která plní roli matrice, podle níž se molekuly vody uskupují do krystalové mřížky ledu. Nukleárně aktivní látky lze diferencovat do tří typů podle nukleační aktivity: typ I (třída A) je protein, který působí jako nukleátor při -5 °C a vyšších teplotách; typ II (třída B) je považován za glykoprotein působící při -5 až -8 °C; typ III (třída C) je lipoglykoprotein působící při -10 °C.

Předpokládá se, že schopnost bakterií iniciovat tvorbu ledu jim zřejmě poskytuje výhodu pro přežití. Nukleační aktivita bakterií *P. syringae* usnadňuje vstup patogena dovnitř rostlinných pletiv poraněných působením ledu (Kúdela et al., 2002).

## 3.3. Systematika čeledě Pseudomonadaceae

### 3.3.1. Čeleď: *Pseudomonadaceae*

Do čeledi *Pseudomonaceae* patří gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru, většinou to jsou přímé nebo mírně zakřivené tyčinky. Pohybují se pomocí jednoho (monotricha) nebo mnoha (lofotricha) bičíků. Jsou chemoorganotrofní a energii získávají pochody aerobní respirace. Některé druhy jsou fakultativně chemolitotrofní a využívají H<sub>2</sub> nebo CO jako zdroj energie a některé druhy se vyznačují denitrifikací. Všechny jsou obligátně aerobní vyjma těch, které způsobují denitrifikaci (Rozsypal et al., 1981). Čeleď *Pseudomonadaceae* patří do řádu *Pseudomonadales* a třídy *Gamaproteobacteria* (Garrity et al., 2007).

Kromě rodu *Pseudomonas* patří do této čeledi také rody: *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mezophilobacter*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, *Serpens* (Garrity et al., 2007).

### 3.3.2. Rod *Pseudomonas*

Název tohoto rodu bakterií je utvořen z řeckých slov *pseudos* = nepravý, falešný a *monas* = jednotka, část, díl. Bakterie *Pseudomonas spp.* jsou v přírodě velmi rozšířené. Najdeme je v půdě, na rostlinách, ve vodách, ve stolici lidí i exkrementech zvířat. Jsou to gramnegativní tyčinky, které se pod mikroskopem jeví jako rovné nebo mírně zahnuté. Netvoří spóry a patří k tzv. nefermentujícím tyčinkovitým bakteriím (Klaban, 2001). Rod *Pseudomonas* zahrnuje přísně aerobní druhy, které nemají schopnost zkvašovat substráty. Bakterie rodu *Pseudomonas* využívají nejrůznější organické sloučeniny jako zdroj energie a uhlíku a jsou bez nároků na specifické růstové látky. Díky velkému počtu enzymů, které tyto bakterie obsahují, se některé druhy tohoto rodu používají pro průmyslové oxidace různých organických sloučenin, hlavně při výrobě léků apod. Některé druhy jsou schopny využívat jednoduhlíkaté sloučeniny, např. metanol jako zdroje živin a energie, a proto se s nimi konaly pokusy pro získávání krmných bílkovin (Šilhánková, 1995). Z kultivačního hlediska nemají vysoké nároky na živnou půdu. Některé druhy rodu *Pseudomonas* dovedou rozkládat chitin v půdě, který je obsažen v buněčné stěně tzv. chitinoklastických hub. Největší podíl na dekompozici chitinu v půdě však mají aktinomycety. Bakterie *P. denitrificans* je schopna syntetizovat vitamin B<sub>12</sub>. Jiný druh, a to *P. putida*, nese geny pro tvorbu enzymů rozkládajících uhlovodíky v ropě a ropných produktech na neškodné plyny a další látky.

Z biologického hlediska patří rod *Pseudomonas* k nejzajímavější skupině bakterií. Vyznačuje se velkou genetickou variabilitou. Z toho vyplývá velká schopnost adaptace pseudomonád na nejrůznější substráty ve vnějším prostředí (Klaban, 2001). Řada druhů tvoří fenazinová barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů, která se uvolňují do růstového prostředí. Tím způsobují nežádoucí zbarvení potravin, např. modrání nebo červenání mléka. Některé druhy uvolňují do prostředí fluoreskující žlutozelené barvivo. Určité druhy vyvolávají v potravinách cizí vůně nebo pachy jako např. ovocné či rybí nebo pachuti, např. mýdlovou, hořkou apod.

Silné proteolytické schopnosti jim umožňují rozklad bílkovinných potravin, a proto patří k nejpočetnějším mikroorganismům kontaminujícím povrch masa. Jejich lipolytické vlastnosti se uplatňují při kažení tuků. Většinou jsou psychrofilní povahy, takže jejich nežádoucí činnost v potravinách probíhá i při poměrně nízkých skladovacích teplotách. Některé druhy, jako např. *P. aeruginosa*, jsou patogenní pro člověka, zvířata i rostliny, jiné druhy jsou patogenní jen pro rostliny. Jsou hostiteli specifických bakteriofágů (Šilhánková, 1995). Rod *Pseudomonas* je poměrně rozsáhlý a rozčleňuje se na několik



skupin: fluorescenční, *stutzeri*, *alcaligenes*, *pseudomallei*, *acidovorans* a *diminuta* (Klaban, 2001).

### 3.3.2.1. Užití *Pseudomonas* jako biologické ochrany

Od poloviny 80. let minulého století se některé antagonisticky působící kmeny různých druhů rodu *Pseudomonas* uplatnily v biologické ochraně rostlin. Byly aplikovány na semena obilnin nebo přímo do půdy jako prevence proti jiným rostlinným patogenům. Vlastnosti některých kmenů *P. fluorescens* (např. CHA0 nebo Pf - 5) jako biologické ochrany jsou velmi dobře prozkoumány, přesto však není zcela jasné, jakým způsobem podporují růst rostlin. Předpokládá se, že by bakterie mohla v hostitelské rostlině navozovat systémovou rezistenci a rostlina pak může lépe vzdorovat opravdovému patogenu. Tato bakterie by mohla konkurovat fytopatogenním bakteriím, půdním mikroorganismům při získávání železa pro tvorbu sideroforů a mohla by také vytvářet metabolity působící toxicky proti jiným půdním mikrobům, jako je antibiotikum fenazin nebo kyanovodík. Tyto teorie jsou experimentálně ověřeny (Haas a Defago, 2005).

Mezi další významné pseudomonády využívané v biologické ochraně patří *P. chloraphis*, která produkuje fenazin jako aktivní antibiotikum proti určitým houbovým fytopatogenům, a její blízce příbuzný druh *P. aurantiaca*, která produkuje di-2,4-diacetylfluoroglucylmethan jako aktivní antibiotikum proti grampozitivním organismům (wikipedia.com).

Někteří členové rodu *Pseudomonas* jsou schopni metabolizovat chemické imise v prostředí a následkem toho mohou být použity pro bioremediaci. Významné druhy, které se ukázaly jako vhodné pro bioremediaci zahrnují:

*P. alcaligenes*-degraduje polycyklické aromatické uhlovodíky;

*P. mendocina*–je schopna degradovat toluen;

*P. pseudoalcaligenes*-je schopna využívat kyanid jako zdroj nitrátu;

*P. resinovorans*-může degradovat karbazol;

*P. veronii*-může degradovat jednotlivé varianty aromatických organických sloučenin;

*P. putina*-má schopnost degradovat organická rozpouštědla jako je toluen.

Nejméně jeden druh této bakterie může přeměnit morfin ve vodném roztoku na poněkud silnější a draze vyráběnou drogu hydromorfon.

Kmeny *P. stutzeri*-jsou schopny degradovat tetrachlormethan (wikipedia.com).

### 3.4. Významné patovary *Pseudomonas syringae*

V rámci tohoto druhu je známo více než 45 různých patovarů. Nejznámější je *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, která je polyfágní a škodí na mnoha hostitelských rostlinách po celém světě. Většina ostatních patovarů se vyznačuje hostitelským okruhem tvořeným úzce příbuznými druhy rostlin v rámci jedné nebo několika málo čeledí (Kokošková, 2006).

#### 3.4.1. Polyfágní bakterie

##### 3.4.1.1. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902

Bakterie *P. s.* pv. *syringae* škodí na mnoha druzích rostlin. Najdeme ji na ovocných stromech, zvláště peckovinách, dále na rostlinách pšenice, kukuřice, fazolu, hrachu, jetele a rajčete (Kokošková 2003, 2006).

Tato bakterie je známa krystalizační aktivitou (INA<sup>+</sup>), což znamená že některé kmeny iniciují tvorbu krystalizačních jader při tvorbě ledu, tj. při teplotách těsně pod bodem mrazu, do -5 °C (Kokošková et al., 2006). Četnost krystalizačně aktivních kmenů této bakterie je různá na různých hostitelských rostlinách, navíc se v průběhu roku dynamicky mění. INA<sup>+</sup> bakterie mají v přírodě velký význam. Škody způsobované na nadzemních částech rostlin mrazy během vegetace souvisí s četností INA<sup>+</sup> bakterií na povrchu rostlinných orgánů.

Bakterie *P. s.* pv. *syringae* má schopnost produkovat fluorescentní sideroforní pigment (Orser et al., 1983). V době, kdy je nedostatek železa na listu, siderofory podporují jeho příjem touto bakterií (Kúdela et al., 2002). Fluorescentní barviva *P. fluorescens* a jiných fluorescentních bakterií se chovají podobně jako siderofory. Kromě toho mají schopnost inhibovat rozvoj některých fytopatogenních mikroorganismů (Orser et al., 1983).

### 3.4.1.1.1. Způsobená onemocnění

#### Jádroviny

Na jabloni způsobuje *P. s. pv. syringae* bakteriální puchýřovou nekrózu kůry. Příznaky způsobené tímto patogenem a původcem spály růžovitých rostlin, bakterií *Erwinia*



Foto: www.ppd.org

*amylovora*, se od sebe liší. V případě napadení stromů bakterií *P. s. pv. syringae* se vnější kůra větví nebo kmene puchýřovitě vydouvá, později praská a odchlípuje se. Hranice mezi zdravými a nekrotickými pletivy jsou ostré a na povrchu postižených pletiv se nevyskytuje bakteriální sliz. Spála květů způsobená bakterií

*P. s. pv. syringae* se vykytuje na hrušních, pokud v době květu klesají noční teploty k bodu mrazu (Kůdela et al., 2002).

#### Peckoviny

Na peckovinách způsobuje bakterie *P. s. pv. syringae* korové nekrózy, jež mají za následek pozvolné (chronické) odumírání větví a celých stromů. Kromě bakterií se na něm podílejí nízké teploty během vegetačního klidu. Nejnebezpečnější je onemocnění mladých stromků, zvláště slivoní, které mohou na základě silné infekce i odumřít. Ostatní hostitelské druhy bývají vůči napadení odolnější než slivoně, nicméně kmeny a koruny silně infikovaných stromů bývají často tvarově deformovány. Po napadení starších stromů dochází často k odumírání větví a plodonošů.

Příznaky onemocnění jsou patrné nejen v korovém pletivu větví a kmene, ale také na listech i plodech. Nejnápadnější jsou nekrózy na jaře jako mírně vkleslá místa v kůře větví, z nichž vytékají kapky jantarově zbarvené gumy podobné pryskyřici. Pokud nekróza obepne celý obvod větve nebo kmenu, strom začne odumírat. To se projeví tím, že pupeny na jaře neraší, listy, květy a mladé plody se nevyvinou nebo zvadnou a uschnou (Kůdela et al., 2002).

Bakterie *P. s. pv. syringae* se podílí také na apoplektickém neboli mrtvičném odumírání meruňky. Tato choroba se vyskytuje v celé Evropě s výjimkou středozezemních oblastí a má narůstající tendenci. Patogen způsobuje rakovinu, charakteristickou rozsáhlými hlubokými nekrotickými ranami na větvích a kmenu a usychání vrcholků stromů meruňky. Pro chorobu je typické, že na jaře jsou infikované části kůry mírně propadlé, na omak měkké až gumovité, jakoby promočené a vyznačují se charakteristickou trpkou vůní.

Důvodem je, že odhalení této patogenní bakterie u nemocných stromů je velmi obtížné a komplikované skutečností, že symptomy způsobené touto bakterií jsou velmi podobné těm, které jsou způsobeny houbami. Navíc se tyto dva patogeny velmi často vyskytují společně (Klement, 1997).

### **Okrasné dřeviny**

Na šeříku a okrasných druzích *Malus* sp. a *Pyrus* sp. způsobuje *P. s. pv. syringae* bakteriální květní spálu a korovou nekrózu (Kůdela et al., 2002).

### **Obilniny**

Na obilninách bakterie *P. s. pv. syringae* způsobuje černání obilek, které má ekonomický význam u jarního ječmene, určeného pro výrobu sladu. Pokud partie sladovnického ječmene obsahují více než 4 % diskolorovaných zrn, mají nižší sladovnickou hodnotu, případně se považují za zcela nevhodné pro výrobu sladu. Mají nepříznivý poměr proteinů, což negativně ovlivňuje barvu sladiny, chuť a vůni piva.

Na vzniku černání obilek se kromě bakterie *P. s. pv. syringae* podílejí i houby rodů *Cochliobolus*, *Alternaria* a *Cladosporium*. Pokud jsou obilky ječmene napadeny v rané fázi vývoje, scvrkávají se, černají a neklíčí (Kokošková, 2003).

Výskyt této choroby je přímo závislý na průběhu počasí. Problémem je vlhké a deštivé počasí v rané fázi vývoje (Kokošková, 2004). Kůdela et al. (2002) uvádějí, že pro vznik infekce a rozvoj choroby je nezbytná vlhkost v období mezi mléčnou zralostí a ranou fází voskové zralosti. Z dlouhodobého hlediska je škodlivost choroby u obilnin v ČR malá, takže se proti nim neuplatňují žádná zvláštní ochranná opatření (Kokošková, 2004).

#### **3.4.1.1.2. Šíření**

Bakterie *P. s. pv. syringae* se šíří za vlhkého a deštivého počasí, zvláště v raných fázích vývoje rostlin (Kokošková, 2006). Patogen přežívá v semenech nebo v pupenech rostlin. Do rostliny proniká přirozenými otvory, jako jsou průduchy, nektartody nebo poraněními, která mohou být způsobena řezem, hmyzem, krupobitím aj. Nukleační schopnost potovaru *syringae* zvyšuje u mnohých rostlin rozsah mrazových poškození (Kůdela et al., 2002).

### 3.4.1.1.3. Ochrana

Prevence zahrnuje kontrolu sadů i polních porostů a používání rezistentních odrůd, pokud jsou k dispozici. Postřiky měďnatými přípravky se používají přednostně v době, kdy jsou rostliny k infekci nejnáchylnější. Nejčastěji bývají aplikovány oxychloridy a hydroxidy mědi. U nás je nejpoužívanějším přípravkem Kuprikol 50 (84 % oxychlorid mědi). Účinnost měďnatých preparátů není dostatečná a navíc jsou někdy v závislosti na době použití a na odrůdě fyto toxické (Olson et al., 1983; Kůdela et al., 2002). Proti listové skvrnitosti se používají měďnaté látky v týdenních intervalech podle potřeby. Na podzim se aplikují preventivně v třítýdenních intervalech po celou dobu opadu listů.

Řez peckovin je lepší provádět až po rašení pupenů (Kůdela et al., 2002). Kmeny stromů je třeba chránit před poraněním, aby se zabránilo vstupu bakterií do rostlinných pletiv. V některých zemích se provádí šlechtění podnoží a odrůd na rezistenci k původcům choroby.

## 3.4.2. Peckoviny

### 3.4.2.1. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Wormald 1931) Young et al. 1978

#### Choroba

Bakteriální korová nekróza peckovin

#### Význam a škodlivost

U peckovin způsobuje onemocnění nekrózy kůry a odumírání mladých stromků. V mládí může infekce silně ovlivnit tvar stromků. U starších stromů způsobuje odumírání větví. Tato choroba je rozšířena po celém světě (Kůdela et al., 2002).

#### Hostitelské rostliny

Nejčastěji jsou napadány peckoviny, druhy rodu *Prunus*, zejména třešeň, višně, slivoň, myrobalán, mandloň, broskvoň a meruňka (Kůdela et al., 2002).

## Příznaky



Foto: [www.rns.org.uk](http://www.rns.org.uk)

Příznaky bývají lokalizovány na větvích v okolí plodonožů nebo ve vidlici větví stromů. Symptomy jsou většinou patrné na jaře jako mírně vkleslá místa v kůře spolu s kapkami jantarově zbarvené gumy. Pupeny na jaře vyraší v listy i květy, ale mladé plody mnohdy uschnou. Skvrny na listech bývají tmavé, okrouhlé nebo téměř hranaté a často se kolem nich vytváří žluté halo (Kůdela et al., 2002).

## Šíření

Bakterie přežívá v rezidentské fázi na povrchu kůry stromů, do nichž proniká původce nektróz peckovin čerstvými listovými jizvami, vzniklými na podzim při opadu listů. Existuje velmi těsná spojitost mezi působením nízkých teplot během vegetačního klidu a škodlivostí fytopatogenní bakterie *P. syringae* při vzniku chronického a apoplektického (náhlého, mrtvičního) odumírání peckovin (Kůdela et al., 2002).

## Ochrana

Ochrana spočívá v používání měďnatých přípravků po celou dobu opadu listů. Kmeny stromů je třeba chránit před poraněními, abychom zabránili vstupu patogena dovnitř pletiv (Kůdela et al., 2002).

### 3.4.3. Zelenina

Dužnaté plodiny, kam patří mnoho druhů zeleniny, představují pro fytopatogenní bakterie vhodnější zdroj kontaminace a výživy než jiné plodiny. Bakterie druhu *P. syringae* škodí především na plodových zeleninách.

#### 3.4.3.1. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young Dye and Wilkie 1978

#### Choroba

Bakteriální tečkovitost rajčete

#### Význam a škodlivost

Škodlivost tohoto bakteriálního patogena způsobuje v České republice značný pokles výnosu a neprodejnost infikovaných plodů na trhu (Kokošková, 2008). Na základě průzkumů bakteriálních chorob rajčete provedených v České a Slovenské republice v letech 1992 a 1993 byl nejčastěji izolován původce bakteriální skvrnitosti rajčete *P. s. pv. tomato*. Převážná většina vzorků, v nichž byl původce tečkovitosti rajčete potvrzen, pocházela z jižní Moravy. Jen málo pozitivních nálezů pocházelo ze Slovenska (Pernezy et al., 1995).

#### Hostitelské rostliny

Jako přirozený hostitel se uvádí pouze rajče, ale při umělých infekcích se podařilo vyvolat onemocnění i u bramboru (Kúdela et al., 2002).

#### Příznaky

Patogen napadá všechny nadzemní orgány rajčete. Na listech a plodech způsobuje



Foto: [www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)

bakterie 1 až 3 mm velké, tmavé, žlutě lemované skvrny (Rod et al., 2005). Takové ohraničení skvrn se nazývá halo. Skvrny mohou splývat, a tak vytvářet souvislé nekrotické plochy (Kúdela et al., 2002). Ty se vytváří především podél žilnatiny nebo na okrajích listů (Rod et al., 2005). Vodnaté a postupně

černající nekrózy se objevují také na řapících, stoncích a květních stopkách. Může dojít i k infekci cévního systému, což se projevuje diskolorací a zakrslostí rostlin. Stejně příznaky může způsobit také bakterie *P. s. pv. syringae*. Příčinou podobných příznaků mohou být i houby *Phytophthora infestans*, původce plísně bramborové a *Alternaria solani*, která způsobuje hnědou skvrnitost rajčete (Kokošková, 2008). Na plodech jsou rovněž tmavé skvrny, slabě vyvýšené a nepronikají do vnitřních pletiv (Rod et al., 2005).

### **Šíření**

Do rostlin proniká bakterie průduchy nebo rankami po odlomených trichomech či po jiném poranění. Původce tečkovitosti rajčete přežívá v latentní formě na rajčeti a nehostitelských plevelných rostlinách v tzv. rezidentské fázi, což znamená, že rostlinám neškodí. Přenáší se semeny, kde jsou schopny bakterie přežít dokonce až 20 let (Rod et al., 2005). Optimální podmínky pro šíření bakterií jsou vysoká vzdušná vlhkost a teploty v rozsahu 18-21 °C (Kokošková, 2008).

### **Ochrana**

Ozdravení semen se provádí tak, že se semena ponechávají ve vodě při 48 °C po dobu 60 minut nebo 50-56 °C po dobu 25-30 minut. Bohužel jsou některé odrůdy na ošetření semen teplou vodou citlivé, což se může projevit sníženou klíčivostí. Dále se doporučují postřikové přípravky, např. měďnaté preparáty v kombinaci s manebem, i když nezaručují 100% účinnost a dále závlaha podmokem a pěstování rezistentních odrůd, jako je např. odrůda Rehovot-13 (Kokošková, 2008).

#### **3.4.3.2. *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith and Bryan 1915) Young et al. 1978**

### **Choroba**

Bakteriální hranatá skvrnitost okurky

### **Význam a škodlivost**

Choroba se běžně vyskytuje ve všech oblastech, kde se pěstují tykvovité zeleniny v polních podmínkách (Kúdela et al., 2002). Onemocnění je nejvýznamnější na počátku vegetačního období. Rané infekce významně snižují výnosy a kvalitu plodů (Kokošková, 2008).



## Hostitelské rostliny

okurky, meloun, tykev (Kůdela et al., 2002)

## Příznaky

K úhynu dochází obvykle již u vzcházejících rostlin (Rod et al., 2005). Na děložních lístcích se vyskytují vodnaté skvrny okrouhlého tvaru. Na pravých listech bývají hranaté, vodnaté, později hnědé skvrny, které vysychají a někdy i vypadávají (Kůdela et al., 2002). Silněji napadené listy jsou roztrhané a roztrpené. Za vysoké vzdušné vlhkosti či za deště se



Foto: [www.science.oregonstate.edu](http://www.science.oregonstate.edu)

na spodní straně listových skvrn vytvářejí mléčně zbarvené kapky bakteriálního slizu (exsudátu), které daly název odbornému názvu původce (*lachrymans*=slzet). Za sucha nastává přeměna exsudátu v bílý nebo stříbřitý povlak, který působí jako šupinky a krusty (Rod et al., 2005).

Na plodech se vyskytují okrouhlé, vodnaté skvrny. Jestliže pronikne patogen hlouběji do dužniny, mohou plody hnit (Kůdela et al., 2002). Bakterie mohou kolonizovat i cévní svazky. Poté jsou oslabené rostliny často sekundárně napadeny hnilobnými bakteriemi (Kokošková, 2008).

## Šíření

Patogen se přenáší semeny i prostřednictvím nerozložených infikovaných rostlinných zbytků. Na kratší vzdálenost se bakterie šíří přímým kontaktem zdravých a infikovaných rostlin bez a nebo prostřednictvím člověka, na delší vzdálenosti se přenáší deštěm a hmyzem (Kokošková, 2008). Do rostlin se bakterie dostávají hydatodami, průduchy a opylujícím hmyzem. Význam mechanického poškození roste na písčitých půdách při větrné erozi, kdy písek poraní rostliny (Rod et al., 2005).

## Ochrana

Ochrana spočívá v používání zdravého osiva, střídání pěstitelských ploch nejpozději v tříletých intervalech, v postřicích porostů měďnatými přípravky a v pečlivé likvidaci infikovaných rostlinných zbytků (Kokošková, 2008). Pěstování by mělo probíhat na pozemcích s dostatkem slunce a větru, které rychle osychají. Vhodné je též vertikální vedení rostlin, dezinfekce nářadí, šetrná zálaha a omezený pohyb v porostu v době, kdy jsou

rostliny ovlhčeny, např. po dešti nebo za rosy a též v pečlivém odstraňování napadených rostlin nebo jejich částí (Rod et al., 2005).

### **3.4.4. Luskoviny**

Na luskovinách škodí kromě tří fytopatogenních bakterií druhu *P. syringae* též polyfágní bakterie *P. s. pv. syringae*. Všechny tyto druhy vyvolávají listové skvrnitosti.

#### **3.4.4.1. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sacket 1916) Young, Dye & Wilkie 1978**

##### **Choroba**

Bakteriální spála hrachu

##### **Význam a škodlivost**

Bakterie *P. s. pv. pisi* patří v mnoha zemích ke karanténním organismům, ale nikoliv v České republice (Smith et al., 1997). Rozsah onemocnění v polních podmínkách je velmi závislý na povětrnostních faktorech. Choroba působí větší škody během jarního období než později (Roberts, 1997).

První zmínka o *P. s. pv. pisi* na našem území pochází pravděpodobně z roku 1953. U bakterie *P. s. pv. pisi* existuje 7 ras. Z pokusů probíhajících v 90. letech minulého století na území České republiky vyplynulo, že se u nás mohou vyskytovat s největší pravděpodobností rasy 1 a 7. Některé odrůdy jako např. odrůda Komet a některá novošlechtění jako SG – L - 7 a SG - L- 38 byla relativně odolná vůči oběma rasám (Kokošková et al., 1998).

##### **Hostilelské rostliny**

Patogen napadá zejména hrách polní, rolní, dřeňový a cukrový, ale i hrachor a jiné druhy (Kúdela et al., 2002).

##### **Příznaky**

Příznaky napadení se objevují na všech nadzemních částech rostliny, včetně palistů, listů, řapíků, stopek, úponků, květních pupenů a lusků, nejvíce charakteristické jsou však na stopkách a palistech (Smith et al., 1997).

Na mladých rostlinách se zpočátku vyskytují podlouhlé, jakoby vodou prosycené, lesklé skvrny, olivově zelené až olivově hnědé barvy. Někdy jsou skvrny téměř červené. Při

počáteční infekci se skvrny objevují převážně v místech, kde přisedají řapíky k lodyze a poté se šíří podél lodyhy dále. Šíří-li se infekce směrem k vrcholu rostliny, skvrny na infikovaných místech splývají a žilky listů hnědnou a až černají (Benada et al., 1958). Infekce květních stopek má za následek, že květy a lusky usychají a odumírají (Kůdela et al., 2002).

Lusky bývají nejčastěji infikovány na švech. Když k invazi bakterie do lusku dochází



Foto: [www.agriculture.gov.sk.ca](http://www.agriculture.gov.sk.ca)

podél hřbetního švu, semeno může být infikováno uvnitř i vně, což se projevuje tvorbou bakteriálního slizu na povrchu semene. Infikovaná semena bývají vlhká, s mokravými skvrnami u pupku nebo jsou scvrklá, s žlutohnědou nekrotózou. Pokud jsou infikovány kališní lístky, rozšíří se infekce až na květy nebo květní pupeny, které mohou odumřít dříve, než se otevřou. Rostlinná pletiva vodnatá a později žloutnou až hnědnou, nakonec vysychají a papírování (Smith et al., 1997). Při silném napadení rostliny hnědnou téměř rovnoměrně a brzy poté odumírají (Benada et al., 1958).

## Šíření

Uvádí se, že v rostlinných zbytcích na poli přežívá bakterie po dobu několika měsíců (Harris, 1964). Uvnitř semen může přežít více než deset měsíců (Skoric, 1927). Na rozdíl od bakteriózy fazole se bakterie v rostlině nešíří cévním systémem. Přenos choroby ze semen na vzcházející rostliny souvisí s nákazou semen a s půdní vlhkostí během klíčení a vývoje rostlin (Hollaway et al., 1996).

Dešťové kapky odrážející se od povrchu půdy mají pravděpodobně velký vliv při šíření choroby v porostech. Zjistilo se, že při počátečních fázích infekce se nejvýraznější příznaky objevují na spodních částech rostlin, které jsou jen několik centimetrů nad povrchem půdy (Benada et al., 1958).

## Ochrana

Doporučuje se především pěstování odolných odrůd (Benada et al., 1958). Každá rasa *P. s. pv. pisi* způsobuje trochu rozdílné příznaky na jednotlivých odrůdách diferenciačního souboru odrůd, na němž je možné rasy spolehlivě rozlišit. V určitých lokalitách mohou zdroje nákazy představovat i odolné odrůdy hrachu, protože mohou přenášet rasy *P. s. pv. pisi*, vůči kterým jsou samy rezistentní. Znalost genetické variability u odrůd hrachu s ohledem na jejich

rezistenci nebo náchylnost k jednotlivým rasám *P. s. pv. pisi* je důležitým předpokladem pro jejich úspěšné pěstování (Kokošková et al., 1998).

#### **3.4.4.2. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder 1926) Gardan et al. 1992**

##### **Choroba**

Bakteriální gloriová spála fazolu

##### **Význam a škodlivost**

Choroba je hospodářsky nejvýznamnější bakteriózou luskovin a může působit značné škody především u mladých rostlin (Kůdela et al., 2002; Rod et al., 2005). Vyskytuje se ve všech pěstitelských oblastech fazolu na světě. Poprvé byla zaznamenána v USA v roce 1924. V roce 1927 byla vyizolována Burkholderem ze vzorků fazolí švýcarského původu. Největší škody bývají způsobovány za chladnějšího a vlhkého počasí. Nebývá vzácností, že je touto chorobou napaden celý porost (Benada et al., 1958).

##### **Hostitelské rostliny**

Přirozenými hostiteli jsou hlavně fazol obecný a fazol šarlatový, ale mohou to být i další druhy fazolu. Není vyloučeno, že mezi hostitelské rostliny patovarů *phaseolicola* byly zařazeny ty druhy bakterií, které jsou ve skutečnosti napadány jinými patovary druhu *P. syringae*, např. *pv. syringae* (Kůdela et al., 2002).

##### **Příznaky**

Při vzcházení rostlin z infikovaných semen se na dělohách objevují vodnaté, hnědě zabarvené skvrny. Při silném napadení semen bakterie přechází i na vegetační vrchol a rostlina v raném stádiu odumírá (Benada et al., 1958). Patogen pronikne do cévních svazků a dochází k systémové infekci. Postižené rostliny jsou zakrslé a chlorotické nebo reverzibilně vadnoucí. Listy bývají mozaikové a znetvořené. Poměrně běžným příznakem u rostlin vyrostlých z infikovaných semen je vodnatá léze v místě prvního listového nodia, postupně se zvětšující, až obepíná celý stonek (Kůdela et al., 2002).

Na listech, do nichž bakterie vnikají průduchy, se vytvářejí menší nekrotické hnědnoucí a zasychající skvrny. Kolem těchto skvrn se vytváří nápadná žlutozelená obruba až 2,5 cm velká, tzv. halo (Benada et al., 1958). Je způsobeno phaseolotoxinem, vylučovaným patogenem. Halo není patrné, jestliže jsou skvrny početné nebo je horké počasí. Tvorba

phaseolotoxinu závisí na kmenu patogena a okolní teplotě, jejíž optimum pro projev tohoto příznaku je 16-20 °C (Kúdela et al., 2002).

Vytvoří – li se lusky, objevují se na nich zpočátku okrouhlé, pak splývající sytě zelené, vodnaté, jakoby mastnotou prosycené skvrny. Skvrny po dozrání lusků hnědnou. Za vlhkého počasí, zejména v ranních hodinách se vylučuje ze skvrn jak na listech, tak na



Foto: <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu>

lodyhách a luscích bezbarvý nebo bělavý sliz, který po zaschnutí pokrývá skvrny jako stříbřitě lesklý povlak (Benada et al., 1958). Skvrny na luscích mohou zasáhnout i cévní svazky hřbetního a spodního švu, v okolním

pletivu se pak objeví podlouhlé léze. Infikovaná semena mají diskolorované osemení, což je nápadné na bílé a světle zbarvených semenech nebo jsou semena sevrklá a svráštělá (Kúdela et al., 2002). Zrna mohou být infikována buď proniknutím bakterií stěnami lusku nebo ze svazků cévních. V tomto případě bakterie pronikají poutkem (funikulem) a šíří se pod osemením zrna (Benada et al., 1958).

## Šíření

Šíření bakterióz a jejich výskyt podporuje převážně déšť. Pomocí dešťových kapek se bakterie rozstříkují z povrchu skvrn do okolí. Na šíření bakterií má velký podíl vítr (Rod et al., 2005). Bakterie se dostávají do rostliny průduchy, hydatodami a mechanickými poškozeními vždy jen tehdy, nachází-li se na povrchu rostlin voda (Rod et al., 2005). Zdrojem infekce mohou být infikovaná semena, infikované plevelné rostliny nebo zbytky rostlin v půdě.

## Ochrana

Pěstovat luskoviny se doporučuje v sušších, vzdušných a slunných oblastech, upřednostňují se luskoviny s vyšším stupněm odolnosti proti bakteriózám. Nepřímou ochranou je používání zdravého osiva (Rod et al., 2005). Vybírají se partie osiva, které jsou prosté nákazy. Moření semen streptomycinem je účinné, ale ve většině evropských zemí zakázané (Kúdela et al., 2002). Semenářská pole se postříkují nebo poprašují měďnatými přípravky. Důležité je zachovávat oseední postupy (Benada et al., 1958). Za prozatím jedinou,

ale značně riskantní přímou ochranu lze považovat termickou dezinfekci semen 10 minut při 50 °C nebo 30 minut při 45 °C (Rod et al., 2005).

#### 3.4.4.3. *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper 1919) Young et al. 1976

##### **Choroba**

Bakteriální spála sóji

##### **Význam a škodlivost**

Tato choroba je v oblastech intenzivního pěstování sóji velmi rozšířená, protože je přenosná osivem z napadených lusků. Při silném napadení porostu sóje způsobuje bakterie předčasný opad listů a tím i snížení výnosu (Benada et al., 1958).

##### **Hostitelské rostliny**

Hostitelskými rostlinami jsou druhy sóji.

##### **Příznaky**

Charakteristickými příznaky jsou skvrny na listech o velikosti 1-2 mm, většinou nepravidelného tvaru. Skvrny jsou nejprve žluté, později nahnědlé a tmavnoucí, obklopené



Foto: [www.ext.vt.edu](http://www.ext.vt.edu)

tzv. halo, uprostřed mají obvykle vodnatý dvůrek (Benada et al., 1958). Kromě listů najdeme nekrózy i na stoncích a luscích. Napadená místa se postupně zvětšují a splývají, rostlinné pletivo zasychá a vypadává, takže listy jsou potrhané. Na spodní straně listů se na skvrnách často hromadí bakteriální sliz, který zaschne a zůstane jako lesklé šupinky lpět na povrchu. Za vlhka se rychle rozpouští a je zdrojem další nákazy.

Bakteriální spála postihuje sóju v každém vývojovém stádiu, od klíčících až po dospělé rostliny. Na dělohách se vyskytují nahnědlé skvrny brzy po vzejití rostlin. Mnohdy se rychle zvětšují a zachvátí i hypokotyl a rostlinka pak hyne. Z děloh postupuje infekce do pravých listů. Napadená pletiva jsou nejprve vodnatá, pak žloutnou a hnědnou. V době zralosti jsou temně hnědá až purpurově černá (Benada et al., 1958). Napadená semena jsou skvrnitá, ale též zdánlivě nepoškozená semena mohou být infikována.

## Šíření

Rozvoj této choroby podporuje studené deštivé počasí. Patogen proniká do hostitelské rostliny nejčastěji prūdouchy, do semen se dostává zpravidla po infekci květů. Bakterie přežívá na rostlině v rezidentské fázi. Její přenos na zdravé porosty je významný při silném deštivém větru, např. při bouřce bylo zjištěno okolo 150 bakterií *P. s. pv. glycinea* v 1 metru krychlovém vzduchu nad napadeným porostem sóje (Kůdela et al., 2002). Na delší vzdálenost je bakterie přenosná osivem z napadených lusků. Mikroorganismus většinou přezimuje v napadených rostlinných zbytcích sóje, pokud nejsou včas zapraveny do půdy (Benada et al., 1958).

## Ochrana

Doporučuje se používat zdravé osivo. Protože bakterie přezimuje v pletivech semene, moření není zcela účinné, zničí však alespoň patogeny na povrchu. Mezi účinnější opatření patří pěstování odolných odrůd, odstraňování posklizňových zbytků z pozemku a dodržování osevního postupu (Benada et al., 1958). V pokusech se osvědčila ultrazvuková radiace proti bakterii v semenech sóji po ošetření dávkou 23,3 kHz po dobu 15 minut (Kůdela et al., 2002).

### 3.4.5. Obiloviny

Choroby obilnin způsobené bakteriemi druhu *P. syringae* nejsou v našich podmínkách tak časté, neboť klimatické podmínky na našem území nejsou optimální pro jejich rozvoj a šíření. V porostech obilnin se můžeme kromě polyfágní fytopatogenní bakterie *P. s. pv. syringae* setkat s dalšími třemi druhy, které vyvolávají hlavně listové skvrnitosti.

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

## Choroba

Bakteriální gloriová skvrnitost

## Výskyt a škodlivost

I když ji najdeme ve všech pěstitelských oblastech ovsa, nezpůsobuje u nás žádné hospodářsky významné výnosové ztráty (Kokošková, 2003). Benada et al. (1958) uvádí, že

v rané vývojové fázi choroba nepůsobí zvláštní snížení výnosu, v době metání však může úrodu značně poškodit.

### Hostitelské rostliny

Vykytuje se především na ovsu, ale můžeme ji najít i na kukuřici, výjimečně také na žitu, ječmeni, pšenici a některých travách (Kokošková, 2006).

### Příznaky

Charakteristickými příznaky jsou drobné vodnaté skvrny s chlorotickým prstencem po obvodu, tzv. halo, které můžeme najít na všech nadzemních orgánech, nejčastěji však na



Foto: <http://pubs.caes.uga.edu>

listech. Při silném napadení rostlin patogenem skvrny splývají, listy žloutnou, usychají a mnohdy se i zkrucují (Kokošková, 2003). Na listové čepeli, zřídka na pochvě nebo plevách, se zpočátku tvoří světle zelené, částečně hnědé, většinou oválné skvrny. Někdy jsou obklopeny olejovým lemem. Občas lze ve středu lézí vidět malé stříbrné šupinky vyschlého exsudátu (Kúdela et al., 2002).

Příznaky lze zaměnit s bakteriózami způsobenými jinými patovary druhu *P. syringae*, zvláště když se nevytvoří výrazné chlorotické halo okolo nekrotické léze, které je pro bakteriální gloriovou skvrnitost charakteristické.

To vzniká působením toxinu vylučovaného patogenem, ale při teplotách vyšších než 22 °C se halo netvoří (Kokošková, 2003).

### Šíření

Patogen proniká do rostlin zpravidla přirozenými otvory jako jsou průduchy nebo po poranění mšicemi nebo jiným hmyzem. Doba inkubace je 2-3 dny. Za příznivých povětrnostních podmínek se onemocnění šíří i sekundárně. Klásky bývají infikovány většinou v době metání. Hlavním zdrojem infekce jsou posklizňové zbytky, ale v malé míře se bakterie mohou přenášet také na pluchách a v perikarpu (Benada et al., 1958).

### Ochrana

Doporučuje se strniště po infikovaných porostech hluboko zaorat. V osevním postupu je nutné dbát na to, aby se oves na daném pozemku nepřestoval v jednotlivých letech po sobě.



Přes tato opatření se patogen může vyskytnout, ale hlavně ve vlhčích oblastech (Benada et al., 1958).

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

#### **Choroba**

Bakteriální hnědnutí báze plev

#### **Výskyt a škodlivost**

Choroba je rozšířena takřka ve všech oblastech, kde se pěstuje pšenice a kde v době metání převládá vlhké počasí. U nás škodlivost choroby nebývá významná (Kokošková, 2003). Při pozdním napadení bakterií není ovlivněna sklizeň. Pokud však dojde k napadení v období mléčné zralosti, choroba přejde na obilky a zabrání jejich normálnímu vývoji. Obilky zakrní, část zrna zčerná a embryo odumře (Benada et al., 1958).

#### **Hostitelské rostliny**

Hostiteli jsou převážně pšenice a ječmen (Kokošková, 2003).

#### **Příznaky**

Na bazálních částech pluch, často jen na jejich vnitřní straně, je patrné zhnědnutí. V horní polovině stébla bývají nepravidelné tmavohnědé skvrny (Kůdela et al., 2002).



Foto: [www.teachersparadise.com](http://www.teachersparadise.com)

Infikované báze plev a stébla hostitelských rostlin vykazující poté hnědé zbarvení, které je tím intenzivnější, čím bohatší jsou dešťové srážky od počátku metání do konce mléčné zralosti (Kokošková, 2003). Choroba napadá obilky, pluchy i listy. Vyvolává zhnědnutí spodní části pluch, což je rozlišovacím znakem od černání

pluch pšenice. Někdy při silném napadení černá celá plucha. Při slabém průběhu choroby se zbarví temně jen vnitřní část pluchy a navenek se choroba neprojevuje. U obilek zčerná

embryo. Na listech se objevují hnědé nebo bělavé skvrny. Kromě toho mohou bakterie vyvolat trouchnivění horního listu a klasu, zhnědnutí koleoptile, zčervenání pluch a zrn a zakrslost rostlin. Na napadených místech se tvoří nenápadný šedý bakteriální exudát. Těmito příznaky se bakterióza pluch zřetelně liší od nákazy *Helminthosporium sativum* a jinými houbami, ačkoli bakterióza se s nimi často vyskytuje společně (Benada et al., 1958).

### **Šíření**

Napadení bakterií *P. s. pv. atrofaciens* se na rostlinách šíří hlavně v deštivém počasí v období od počátku metání do konce voskové zralosti (Kokošková, 2003).

### **Ochrana**

Je nutné věnovat pozornost výběru osiva (Benada et al., 1958).

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

### **Choroba**

Bakteriální pruhovitost

### **Výskyt a škodlivost**

K významnějším škodám došlo koncem 80. let minulého století v Jižní Africe (Kokošková, 2008).

### **Hostitelská rostlina**

Patogen napadá hlavně oves a ječmen (Kokošková, 2003)



Foto: [www.agric.gov.ab.ca](http://www.agric.gov.ab.ca)

### **Příznaky**

Příznaky se projevují jako podélné žlutohnědé skvrny objevující se na listové čepeli, které později nekrotizují a při silnějším napadení splývají v podélné pruhy. Bývají často zaměňovány s poškozením rostlin nízkými teplotami nebo houbou rodu *Septoria* (Kokošková, 2008).

### **Šíření**

Choroba se šíří za deštivého a větrného počasí, kdy bakterie vstupují do rostlin přirozenými otvory a po poranění rostlin.

### **Ochrana**

Ochrana spočívá v dodržování stejných opatření jako u jiných bakteriálních chorob obilnin. Výběr odolných odrůd pro oblasti se zvýšeným výskytem tohoto patogena představuje slibnou možnost, jak snížit výskyt choroby.

### **3.5. Testy prováděné v bakalářské práci**

V bakalářské práci byly použity tři základní testy, které se běžně používají v bakteriologické laboratoři při rozbořech vzorků podezřelých z napadení patogeny bakteriálního původu, zvláště v případě podezření na fytopatogenní bakterie druhu *P. syringae*.

#### **3.5.1. Test oxidázy**

Tímto testem se prokazuje schopnost tvorby enzymu diaminoxidázy. Test spočívá v tom, že u bakterií, které obsahují enzym diaminoxidázu dojde v přítomnosti vody a kyslíku k odštěpení aminoskupiny z diaminů za vzniku peroxidu vodíku, což se projeví fialovým zabarvením reakce. Takto se rozlišují v rámci rodu *Pseudomonas* fytopatogenní druhy, které jsou v testu negativní od druhů nefytopatogenních, které jsou v testu pozitivní (Klement et al., 1990). Výjimku tvoří např. bakterie *P. marginalis* či *P. cichorii*, které jsou sice fytopatogenní, ale oxidáza pozitivní (Schaad et al., 2001).

#### **3.5.2. Test hypersenzitivity na tabáku**

Test hypersenzitivity na tabáku umožňuje rozlišení fytopatogenních hostitelsky specializovaných bakterií (*P. syringae* pv. *tabaci*), vyvolávajících příznaky onemocnění, od hostitelsky nespécializovaných bakterií (fytopatogenní druhy *Pseudomonas* a *Erwinia*), které vyvolávají hypersenzitivní reakci. Saprophytické bakterie nezpůsobují žádné příznaky.

Hypersenzitivní reakce je charakteristická tím, že do 24 hodin po aplikaci bakteriální suspenze do listů tabáku se objeví ohraničená nekróza, zatímco při normální infekci dochází v průběhu několika dnů k postupné neohraničené nekrotizaci rostlinných pletiv.

Test hypersenzitivity a tabáku je nejběžnější z testů používaných k rozlišení fytopatogenních a saprophytických pseudomonád. Bakterie *P. s.* pv. *syringae* a další patovary rostlinná pletiva tabáku nekrotizují, zatímco nefytopatogenní pseudomonády nezpůsobují na rostlinách tabáku žádné příznaky (Kokošková, 2006).

#### **3.5.3. Sérologický aglutinační test**

Sérologické metody jsou založeny na reakci specifických protilátek s antigenem. Těmito protilátkami jsou nejčastěji imunoglobuliny, které se tvoří v krevním séru obratlovců jako reakce na přítomnost antigenu. Pokud se antigen setká s homologní protilátkou, reakce je

pozitivní a projeví se aglutinací antigenu s protilátkou. Pro tento test se používá polyklonální antisérum o známé citlivosti a specifčnosti (Kokošková, 1998).

Antigenem se původně označovala částice, na kterou se váží protilátky. Objekty vyvolávající tvorbu protilátek se označovaly jako imunogeny-dnes nahrazeny slovem antigen. Jsou to objekty, vůči nimž vzniká v těle imunitní reakce. Hlavním rysem antigenu je jeho cizorodost (Jílek, 2002). U bakterií rozlišujeme antigeny hloubkové, které se nacházejí v cytoplazmě bakterií a antigeny povrchové, které jsou na povrchu bakteriální buňky. Pohyblivé druhy bakterií s bičíky mají navíc zvláštní antigeny bičíkové. Antigeny jsou rozpustné nebo koloidní látky, které se vyznačují určitým strukturálním uspořádáním a většinou také velkou molekulovou hmotností. Jsou to zpravidla bílkoviny. Antigeny se dělí na celobuněčné nebo purifikované, to jsou např. ribozómy, glykoproteiny, somatický O antigen a membránový komplex MCP (Kokošková, 1998).

Pro přípravu polyklonálních antisér se používají většinou králíci. Po obdržení vzorku protilátky v odpovídajícím titru je králíkům odebírána krev z ušní vény. Odebraná krev se nechá aglutinovat při pokojové teplotě. K úplnému oddělení plazmy od krevní sraženiny dochází do 24 hodin při teplotě 4 °C. Poté se plazma, v níž je soustředěna většina protilátek, sterilně odsaje a centrifuguje. Takto získané antisérum nazýváme surovým a skladujeme jej při teplotě 4 °C a konzervujeme azidem sodným. Citlivost a specifčnost antiséra vůči homolognímu antigenu se stanoví asi po měsíci (Kokošková, 1998).

Aglutinační test patří k nejjednodušším sérologickým testům. Výsledky testu souvisí s kvalitou použitého antiséra. Polyklonální antiséra mívají zpravidla méně či více křížových reakcí s jinými bakteriemi než je bakterie cílová, neboť jsou to směsi protilátek. Proto se musí často před použitím upravit.

Citlivost antiséra se stanoví způsobem, že se cílová bakterie testuje v ředící řadě a titr, neboli nejvyšší ředění, při kterém je aglutinační reakce s cílovou bakterií ještě spolehlivě rozlišena, se zvolí jako funkční titr. Sérum se pak v laboratorních testech používá v tomto ředění. Specifčnost polyklonálního antiséra se stanoví tak, že se antisérum testuje s různými fytopatogenními a saprofytickými bakteriemi, které se mohou vyskytovat na stejné hostitelské rostlině jako cílová bakterie. Pokud se zjistí křížová reakce antiséra s některou z těchto bakterií, provádí se vysycení antiséra. Po této úpravě již antisérum většinou křížově nereaguje (Jermoljev a Pozděna, 1972).

Mnohé firmy, které se zabývají výrobou protilátek stanovují sice odpovědně citlivost, ale nikoliv specifčnost antisér. Prodávají-li antiséra neupravená, u nichž se objevují křížové

rakce s doprovodnými bakteriemi, nemohou být pak výsledky testů, v nichž se antiséra používají, dostatečně spolehlivé.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Izolace bakterií z rostlinného materiálu

Bakterie jsme izolovaly z nekrotických skvrn na plodech, listech a řapících rostlin rajčete a listech okurky. Části rostlin jsme velmi jemně postříkaly lihem. Bylo to z důvodu potlačení saprofytických organismů na povrchu listů a zmírnění nárůstu těchto bakterií na živném mediu v Petriho misce. Poté jsme ožehly žiletky, nechaly jsme je vychladnout a vybíraly vhodná místa k izolaci. Takovým místem byla např. nekrotická skvrna na listu rajčete. Její okrajovou část a část zdravého pletiva jsme vyřízly. Vznikl asi 2 mm silný kousek pletiva. Takto získaný segment jsme daly do kapky sterilní vody na vychladlém hodinovém sklíčku, které bylo předem vysterilizované plamenem. Vysterilizovanými skalpely jsme daný kousek pletiva řádně rozmělnily.

Poté jsme provedly křížové roztěry na King B médium (King et al., 1954), které je považováno za jedno z nejvhodnějších živných médií pro izolaci a kultivaci bakterií *Pseudomonas spp.*, neboť bakterie tohoto rodu na něm fluoreskují a odlišují se tak od jiných fytopatogenních či saprofytických bakterií. Po dvou dnech jsme pod binolupou vybíraly ze směsi různých narostlých kolonií takové, které svojí morfologií odpovídaly pseudomonádám a opět je křížovým roztěrem nanášely na čerstvě připravený agar v P. miskách. Misky s bakteriemi jsme inkubovaly v termostatu při 23-25 °C.

Takto jsme postupně vyizolovaly čistou kulturu, kterou jsme dále přeočkovávaly v hadovitých roztěrech a používaly pro následné testy.

#### 4.1.1. Médium

Médium King B (King et al., 1954)

Na 300ml destilované vody

Pepton	6g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,45g
MgSO <sub>4</sub> x7 H <sub>2</sub> O	0,45g
Glycerol	2,7 ml
Agar	10g

Médium se upravuje na pH 7,2 (pomocí HCl či NaOH) a následně sterilizuje v tlakové nádobě při 120 °C po dobu 20 minut.

Nejprve jsme provedly testy, které nám pomohly zjistit, zda se jedná o fytopatogenní či nefytopatogenní bakterie. Těmi jsou např. test oxidázy a test hypersenzitivity na tabáku. Při potvrzení fytopatogenity jsme tyto izoláty použily do testu aglutinace.

## 4.2. Test oxidázy

Pro tento test jsme si připravily dvoudenní kulturu bakteriálních izolátů podezřelých na bakterie rodu *Pseudomonas*. Oxidační činidla jsme měly předem připraveny a byly zabaleny v alobalu, aby nedocházelo ke kontaktu činidel se světlem. Skladovány byly v chladu v lednici. Dále jsme použily filtrační papír o velikosti A 3 přeložený na polovinu, mezi jehož spodní a vrchní vrstvu jsme vložily vrstvu alobalu. Připravily jsme si P. misky s již narostlými testovanými izoláty a sterilní skalpely. Poté jsme odebraly z misky část bakteriální masy o velikosti asi 0,25 cm<sup>3</sup> vyžíhaným a vychladlým skalpelem a setřely ji na filtrační papír. Na přenesenou kolonii bylo nakapáno malé množství směsi oxidačních činidel. Během několika minut se bakterie obsahující enzym diaminooxidázu zbarvila fialově, ostatním zůstala jejich původní barva.

Jako pozitivní kontrola byla použita bakterie *P. fluorescens* CCM 2115 a jako negativní kontrola bakterie *P. s. pv. syringae* CCM 4073.

### 4.2.1. Postup přípravy činidel

Pro tento test je třeba připravit čerstvá oxidační činidla:

Činidlo A: 0,1 g p – fenylendiaminu  
10 ml destilované vody

Činidlo B: 0,05 g alfa naftolu  
5 ml alkoholu

Těsně před použitím byla činidla smíchána v poměru 2A:1B



### 4.3. Test hypersenzitivity na tabáku

Pro tento test jsme využívaly zdravých rostlin tabáku již dostatečně vzrostlých. Nejdříve jsme si připravily suspenzi bakterií v destilované vodě. Nabraly jsme velké množství bakteriální masy (vrchovatou kličku), kterou jsme vložily do mikrozkušavek (Ependorf) a rozptýlily asi v 1,5 ml destilované vody. Poté jsme takto připravené zkumavky vložily do stojánku a nechaly jsme je třepat na třepačce asi půl hodiny, až vznikla homogenní směs.

Během této doby jsme si připravily sterilní injekční stříkačky a popsaly je čísly daných vzorků. Připravily jsme si popisky na samolepky o velikosti 1-1,5 cm, které jsme vlepovaly na listy tabáku těsně vedle každého vpichu. Poté jsme si nabraly suspenzi do injekční stříkačky, vybraly vhodný list tabáku a do jeho hlavní žilky jsme injikovaly inokulum. Ne vždy se podařilo napíchnout správně žilku v listu, proto existuje ještě jeden způsob vpravení suspenze do rostliny a to tak, že odejmeme jehlu z injekční stříkačky, uchopíme list a otočíme spodní stranu směrem k sobě, na ni přiložíme injekční stříkačku a pod tlakem aplikujeme do listu inokulum. Na jednom listě, pokud je dostatečně velký, je možné jeden vzorek aplikovat do více míst. My jsme se snažily napíchnout paždí hlavní žilky. Poté jsme odejmuly jehlu a pro druhé místo aplikace na listu jsme využily druhý způsob bez jehly. Každý izolát jsme tak inokulovaly ve dvou opakováních, prvním a druhým způsobem provedení. Na list jsme nalepily již připravenou samolepku s číslem vzorku. Jako pozitivní kontrolu jsme používaly sbírkový kmen *P. s. pv. syringae* CCM 4073 a jako negativní kontrolu sbírkový kmen *P. fluorescens* CCM 2115.

Test jsme hodnotily po 24 hodinách. Jako pozitivní reakci jsme hodnotily nekrotickou skvrnu, která se vytvořila na listové čepeli v místě aplikace inokula. Tam, kde byla aplikována negativní kontrola, k žádné reakci nedošlo a pletivo se jevílo zdravé, proto jsme tuto reakci hodnotily jako negativní.

Výsledky tohoto testu získáme poměrně rychle a jsou relativně spolehlivé. Tento test nevyžaduje sterilní podmínky a speciální vybavení laboratoře.

### 4.4. Sérologický aglutinační test

Pro tento test jsme používaly polyklonální antiséra od firmy Neogén Europe Ltd. (VB) pro druh *P. syringae*. První antisérum bylo připraveno firmou pro identifikaci *P. s. pv. tomato* a druhé pro *P. s. pv. syringae*. V testech jsme použily postupně obě antiséra, která jsme testovaly s našimi izoláty, abychom zjistily, o který patogen se jedná. Bakterie obou patogenů vyvolávají na rostlinách rajčete stejné příznaky a jsou proto nerozlišitelné.

Kromě antisér dodává firma Neogén Europe Ltd. (VB) ve svém balení speciální papírové kartičky, na které jsme napipetovaly antisérum a přibalenými sterilními párátky nabraly bakteriální masu z P. misky a důkladně rozetřely v kapičce antiséra. Po třech minutách jsme hodnotily vznik vloček, a to buď jedním, dvěma nebo třemi znaménky plus dle intenzity reakce. V případě, že se vločky nevytvořily vůbec, hodnotily jsme výsledek reakce znaménkem mínus (viz. obrázek 4 v příloze).

- +++ úplná aglutinace
- ++ neúplná aglutinace
- + slabá nebo stopy aglutinace
- žádná aglutinace

Do tohoto testu jsme zařadily oxidáza negativní (negativní v testu oxidázy), fytopatogenní (pozitivní v testu hypersenzitivity na tabáku) izoláty, u kterých jsme měly podezření buď na *P. s. pv. syringae* nebo na *P. s. pv. tomato*.

Výsledky všech prováděných testů jsme zaznamenaly do tabulky a graficky vyjádřily.

## 5. Výsledky

Izoláty, které jsme získaly ze vzorků napadených rostlin byly zaznamenány do tabulky č. 1. Vzorky rostlin pocházely z různých pěstitelských oblastí plodové zeleniny na Moravě.

**Tabulka 1: Seznam testovaných izolátů podezřelých na *Pseudomonas syringae***

Pořadové číslo	Číslo izolátu	Hostitel/ rostlinný orgán	Odrůda/ novošlechtění	Pěstitelská oblast
1	1/1	Rajče/list	-	Znojemsko
2	2/1	Okurka/list	-	Znojemsko
3	4/3	Rajče/plod	-	Znojemsko
4	12/2	Rajče/list	Šejk	Břeclavsko
5	13/1	Rajče/list	Dublet	Břeclavsko
6	15/1	Rajče/list	Denár	Přerovsko
7	15/2	Rajče/list	Bery	Přerovsko
8	16/2	Rajče/list	Ďábl	Přerovsko
9	17/1	Rajče/list	Eskort	Přerovsko
10	17/4	Rajče/list	Eskort	Přerovsko
11	17/7	Rajče/plod	Eskort	Přerovsko
12	18/1	Rajče/list	Karla	Přerovsko
13	19/3	Rajče/list	Pavčina	Přerovsko
14	20/3	Rajče/list	Proton	Přerovsko
15	21/1	Rajče/list	Semarol	Přerovsko
16	21/6	Rajče/list	Semarol	Přerovsko
17	21/7	Rajče/plod	Semarol	Přerovsko
18	22/6	Rajče/list	Toro	Přerovsko
19	23/4	Rajče/list	Tritonex	Přerovsko
20	101/1	Rajče/list	101	Přerovsko
21	108/4	Rajče/plod	108	Přerovsko
22	110/2	Rajče/list	110	Přerovsko
23	203/3	Rajče/list	203	Přerovsko
24	213/2	Rajče/list	213	Přerovsko
25	215/1	Rajče/list	215	Přerovsko
26	223/2	Rajče/list	223	Přerovsko
27	232/1	Rajče/list	232	Přerovsko
28	235/1	Rajče/list	235	Přerovsko
29	243/3	Rajče/list	243	Přerovsko
30	261/1	Rajče/list	261	Přerovsko

V tabulce č. 2 jsou zaznamenány výsledky laboratorních testů, které jsme použily pro určení izolátů, které jsme získaly z napadených rostlin.

**Tabulka 2: Výsledky laboratorních testů s izoláty podezřelými na *Pseudomonas syringae***

Pořadové číslo	Číslo izolátu	Test oxidázy	Test hypersenzitivity na tabáku	Aglutinační test	
				<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
1	1/1	-	+	+++	++
2	2/1	-	+	-	+(+)
3	4/3	-	+	+++	-
4	12/2	-	+	+++	(+)
5	13/1	+	-	+++	++
6	15/1	-	+	+++	(+)
7	15/2	-	+	+++	-
8	16/2	-	+	+++	(+)
9	17/1	-	+	++	-
10	17/4	-	+	+++	-
11	17/7	-	+	+++	-
12	18/1	-	+	+++	-
13	19/3	-	+	+++	-
14	20/3	-	+	++	-
15	21/1	-	+	+++	-
16	21/6	-	+	+++	+
17	21/7	-	+	+++	-
18	22/6	+	-	+++	+
19	23/4	-	+	+++	+
20	101/1	-	+	+++	-
21	108/4	-	+	+++	-
22	110/2	-	+	+++	+(+)
23	203/3	-	+	++(+)	-
24	213/2	-	+	++(+)	-
25	215/1	-	+	++(+)	-
26	223/2	-	+	+++	-
27	232/1	-	+	+++	(+)
28	235/1	-	+	+++	(+)
29	243/3	-	+	+++	+(+)
30	261/1	-	+	+++	-

Celkem jsme testovaly 30 izolátů podezřelých na *P. syringae*. Z těchto izolátů bylo 28 oxidáza negativních a zároveň pozitivních v testu hypersenzitivity na tabáku. Z výsledků obou testů vyplynulo, že tyto izoláty byly fytopatogenní. Dva izoláty, a to 13/1 a 22/6, byly oxidáza pozitivní a zároveň negativní v testu hypersenzitivity na tabáku. Na základě výsledků obou těchto testů bylo zřejmé, že oba izoláty byly nefytopatogenní.

Všech 30 izolátů jsme ověřovaly v aglutinačním testu s polyklonálními antiséry pro *P. s. pv. tomato* a *P. s. pv. syringae* od firmy Neogen Europe Ltd.(VB). Dvacet sedm fytopatogenních izolátů, pocházejících z rajčete, reagovalo velmi silně (vesměs na tři plus) s antisérem pro *P. s. pv. tomato*, a proto jsme je považovaly za izoláty, které patřily k tomuto patovaru.

Jen jeden izolát, a to 2/1, který pocházel z okurky, reagoval pouze s antisérem pro *P. s. pv. syringae*, a proto jsme mohly předpokládat, že patří k tomuto patovaru.

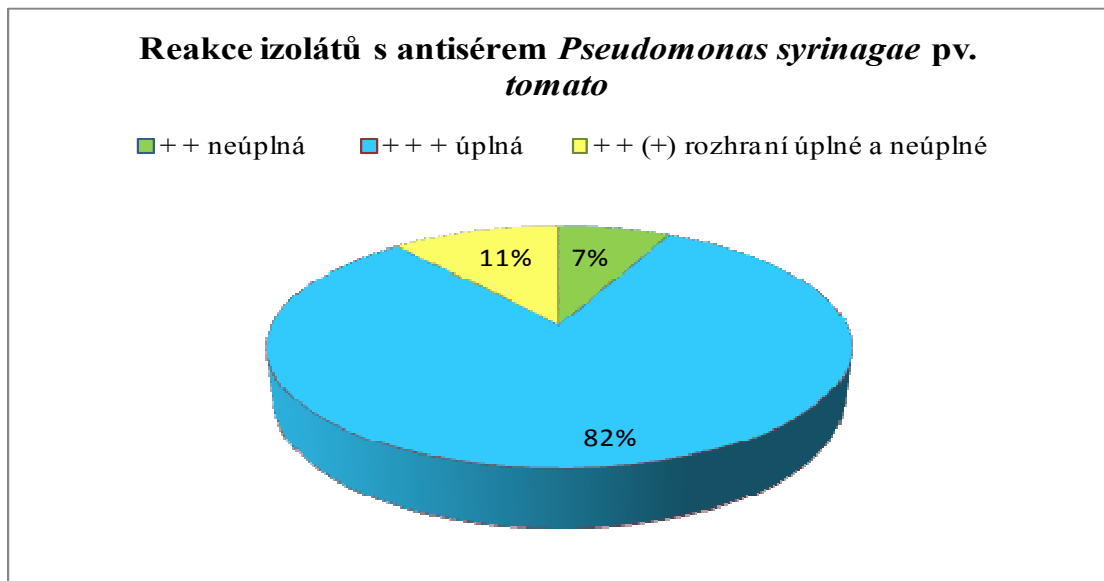
U některých fytopatogenních izolátů jsme zaznamenaly také křížové reakce s oběma antiséry. Deset izolátů určených jako *P. s. pv. tomato* (na tři plus) reagovalo i s antisérem pro *P. s. pv. syringae*. Tato křížová reakce však byla mnohem slabší.

Dva nefytopatogenní izoláty, a to 13/1 a 22/6, reagovaly pozitivně s oběma antiséry, i když neměly reagovat ani s jedním z nich. Proto jsme hodnotily reakce obou izolátů s oběma antiséry jako falešně pozitivní reakce.

Na základě provedených testů jsme ve vzorcích rajčete získaných z různých pěstitelských oblastí jižní a střední Moravy spolehlivě prokázaly přítomnost původce tečkovitosti rajčete.

## Grafické znázornění

Graf 1:



Jak je z grafu č. 1 patrné, z celkového počtu 27 izolátů potvrzených jako *P. s. pv. tomato*, 82 % izolátů poskytlo úplnou reakci aglutinace, vyjádřenou třemi plus, 7 % izolátů neúplnou reakci aglutinace vyjádřenou dvěma plus a 11 % izolátů reagovalo na hranici úplné a neúplné aglutinace.

## 6. Diskuse

Výsledky, ke kterým jsme dospěly na základě testů, prokázaly, že v roce 2008 se na jižní a střední Moravě vyskytoval v porostech polních rajčat původce bakteriální tečkovitosti rajčete, bakterie *P. s. pv. tomato*.

Příznaky na listech a plodech rajčat nás vedly k domněnce, že se jedná o bakteriální tečkovitost rajčete, kterou může způsobit *P. s. pv. tomato*, ale také *P. s. pv. syringae*. Oba tyto původci způsobují pouhým okem nerozlišitelné příznaky (Kůdela et al., 2002; Kokošková, 2008). Dle příznaků jsme si však nemohly být jisté, zda se nemůže jednat také o bakteriální skvrnitost rajčete, kterou způsobuje *Xanthomonas vesicatoria*, která patří v ČR mezi karanténní organismy. Obě tyto choroby vyvolávají podobné příznaky, nekrózy ohraničené žlutým okrajem (Kůdela et al., 2002; Kokošková, 2008). Určitý rozdíl je však patrný na plodech, kde bakterie *Xanthomonas vesicatoria* tvoří vpadlé strupovité skvrny, zatímco bakterie *P. s. pv. tomato* i *pv. syringae* způsobují vyvýšené „asfaltové“ skvrny (Kůdela et al., 2002; Kokošková, 2008). Testování bylo zaměřeno na tyto tři bakterie, přičemž já jsem se věnovala druhu *Pseudomonas syringae*.

Izolaci bakterií jsem prováděla na King B médium. Toto médium je pro pseudomonády nejpoužívanější, protože většina bakterií rodu *Pseudomonas* na něm tvoří charakteristický fluorescentní pigment a tím se odlišují od jiných fytopatogenních a saprofytických bakterií (Roberts, 1997; Smith et al., 1997; Kokošková et al., 1998; Kůdela et al., 2002; Kokošková, 2006).

Vybrané izoláty jsem zařadila do testů, které měly zodpovědět otázku, zda se jedná o fytopatogenní bakterie či nikoli. Prvním z nich byl test oxidázy. V tom fytopatogenní bakterie vycházejí jako negativní (Otta a English, 1970; Kůdela et al., 2002; Kokošková, 2006.). Oxidační činidla, používaná pro tento test, musí být čerstvá a smíchaná těsně před použitím. Jinak jsou zoxidována a špatně reagují a nelze jasně odlišit pozitivní a negativní reakci. Proto také test oxidázy patří k orientačním testům a nelze se na něj vždy s jistotou spolehnout. Oxidační činidla musíme chránit před světlem. Proto byla vždy zabalena v alobalu a použitou injekční stříkačku jsme rovněž balily předem do alobalu. Pracovat musíme rychle, aby reakce byla co nejpřesnější.

Dále jsme izoláty testovaly v biologickém testu, a to testu hypersenzitivity na tabáku. Bakteriální suspenzi jsme aplikovaly do listů tabáku pomocí injekční stříkačky. Existují dva způsoby aplikace. První z nich je ten, kdy se snažíme injikovat suspenzi do hlavní žilky listu. Tento způsob je obtížnější, vyžaduje určitou praxi a ne vždy se povede. Proto existuje ještě

druhý způsob injikace do listů tabáku a to takový, že uchopíme list a z jeho vnitřní strany přitiskneme injekční stříkačku bez jehly proti listové čepeli, z vnější strany podložíme prst a injikujeme inokulum do rostlinného pletiva. Bakteriální suspenze nám vytvoří okolo aplikovaného místa mapu, a tak máme jistotu, že se bakteriální suspenze dostala dovnitř listu pod pokožku. Problémem této aplikace je však to, že při hodnocení musíme zohlednit primární poškození listu, pokud k němu dojde. Tam, kde jsme přitiskly injekční stříkačku, se může vytvořit malý, pravidelný nekrotický kroužek. Ten nesmíme hodnotit jako pozitivní reakci. Jako pozitivní kontrola byl v testu použit kmen *P. s. pv. syringae* CCM 4073 a jako negativní kontrola kmen *P. fluorescens* CCM 2115. Nekrotická skvrna, která se vytvořila na listu do 24 hodin po injikaci pozitivní kontroly byla stejná jako nekrózy, které se vytvořily po aplikaci našich izolátů, což souhlasí s výsledky jiných autorů (Goodman a Novacky, 1994; Kúdela et al., 2002; Kokošková, 2006).

Izoláty, které vyšly v testu oxidázy negativně a v testu hypersenzitivity pozitivně, jsme zařadily do testu aglutinace, protože se o nich již dalo předpokládat, že budou pozitivně reagovat s antisérem *P. s. pv. syringae* nebo s *P. s. pv. tomato*.

V testu aglutinace byla použita polyklonální antiséra od firmy Neogén Europe Ltd. (VB) pro *P. s. pv. tomato* a pro *P. s. pv. syringae*. U antisér byly přiloženy speciální kartičky, na kterých reakce probíhala a sterilní párátko, kterými jsme roztíraly bakteriální masu izolátu v antiséru. Jak je z výsledků patrné, všech 27 izolátů bylo určeno jako *P. s. pv. tomato*. Z těchto 27 izolátů 17 reagovalo jen s antisérem pro *P. s. pv. tomato*, avšak u dalších deseti se objevila křížová reakce s antisérem pro *P. s. pv. syringae*. Vzhledem k tomu, že tato křížová reakce byla velmi slabá, můžeme izoláty potvrdit jako *P. s. pv. tomato*. Podle charakteru reakce jsme v případě antiséra pro *P. s. pv. syringae* hodnotily reakce jako neúplné, zatímco v případě antiséra pro *P. s. pv. tomato* se téměř ve všech případech jednalo o úplnou aglutinační reakci.

Jen jeden z celkového počtu testovaných izolátů, a to 2/1, pocházející jako jediný z okurky, vyšel pozitivně na *P. s. pv. syringae*. Na okurce se vyskytují *P. s. pv. lachrymans* a *P. s. pv. syringae*, které vyvolávají na pohled stejné příznaky a i po serologické stránce jsou si velmi podobné (Kúdela et al., 2002). U izolátu 2/1 byla reakce v aglutinačním testu hodnocena jako neúplná. Je možné, že by tento izolát reagoval i s antisérem pro *P. s. pv. lachrymans*, kdybychom ho použily. Antisérum pro tento patovar jsme bohužel neměly k dispozici. Kdyby tento izolát reagoval s antisérem pro *P. s. pv. lachrymans* intenzivněji než s antisérem pro *P. s. pv. syringae*, považovaly bychom ho za bakterii



*P. s. pv. lachrymans* a jeho reakci s antisérem pro *P. s. pv. syringae* bychom hodnotily jako křížovou.

Křížově s oběma antiséry reagovaly také izoláty 13/1 a 22/6, které vyšly v testu oxidázy pozitivně a v testu hypersenzitivity negativně, proto je tedy více než pravděpodobné, že se jednalo o nefytopatogenní bakterie rodu *Pseudomonas*.

Pro naše testy aglutinace jsme využívaly polyklonální antiséra, která mají značnou nevýhodu oproti monoklonálním. Mají zpravidla nižší specifitost a nižší citlivost. Jejich výhodou jsou však nízké náklady a snadná příprava. Polyklonální antiséra jsou směsí protilátek z různých tříd Ig. Podle Jílka (2005) jsou to imunoglobuliny náležející do 5 tříd, a to IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. Tyto jednotlivé třídy se liší hmotností řetězců a uspořádáním molekuly, dále jsou charakteristické různou specifitou a vazebnou konstantou. Rozdílné vazebné konstanty mají dokonce i protilátky proti jednotlivým antigenním determinantům. Křížové reakce se odstraňují vysycováním s křížově reagujícími antigeny nebo naředěním antiséra na koncentraci, při které již ke křížovým reakcím nedochází (Jermoljev a Pozděna, 1972; Kokošková, 1998). Dle našich výsledků můžeme soudit, že firma, od které jsme antiséra koupily, nedodala antiséra dostatečně kvalitní.

Pro zemědělskou praxi je důležité, že tyto jednoduché testy jsou pro určení fytopatogenních druhů *Pseudomonas syringae* dostatečně spolehlivé, rychlé a nejsou příliš nákladné. Pěstitel nepotřebuje přesně vědět, o jaký patovar druhu *P. syringae* se jedná, protože ochranná opatření jsou v obou případech stejná. Uvedené testy mohou posloužit k rychlé informaci pěstitele při napadení porostu, okamžité aplikaci baktericidů a tím ke snížení škod, způsobených patogenem. Proto také tyto testy mohou být snadno využity pracovníky Státní rostlinolékařské správy, která je v přímém kontaktu s pěstiteli.

## 7. Závěr

V první části bakalářské práce, která byla zaměřena teoreticky, jsem shrnula literární údaje o patovarech bakterie *Pseudomonas syringae* významných v České Republice. V rámci druhu *P. syringae* je známo více než 45 různých patovarů. Nejvýznamnější z nich je bakterie *P. s. pv. syringae*, která škodí na mnoha druzích rostlin. Většina ostatních patovarů je charakteristická spíše úzkým hostitelským okruhem. K takovým patovarům patří např. patovar *morsprunorum* škodící na peckovinách, *pv. tomato* škodící na rajčeti a *pv. lachrymans* na okurce, *pv. pisi*, *phaseolicola* a *glycinea*, které najdeme na luskovinách a dále *pv. coronafaciens*, *atrofaciens* a *striafaciens* vyskytující se na obilninách.

Bakterie *P. s. pv. syringae* je velmi rozšířena po celém světě nejen jako patogen, ale i jako epifyt v rostlinné mikroflóře, kde přežívá v rezidentské fázi, kdy rostlinám neškodí. Na rostlinách způsobuje nejčastěji listové nekrózy, černání pupenů, např. u peckovin nebo spálu, pokud je průběh infekce velmi rychlý. Na infikovaných listech bývají nekrotické skvrny často ohraničeny světlým kruhem, tzv. halo.

O bakterii *P. s. pv. syringae* je známo, že je jedním ze zdrojů krystalizační aktivity. Ta se projevuje tím, že některé kmeny této bakterie podněcují tvorbu krystalizačních jader při teplotách těsně pod bodem mrazu. Krystalizačně aktivní bakterie mají v přírodě velký význam. Spolupodílí se na mrazovém poškození bylin a dřevin v době jarních a podzimních mrazů, kdy teploty kolísají kolem 0 °C. Projev krystalizační aktivity je podmíněn přítomností specifického proteinového oktapeptidu lokalizovaného na vnější membráně bakteriálních buněk, který dává podnět k uskupování molekul vody do krystalové mřížky ledu. Takto se krystalizačně aktivní bakterie snadno dostanou dovnitř rostlinných pletiv, které poškodí.

V druhé části bakalářské práce, která byla zaměřena prakticky, jsem se zabývala bakteriologickým rozbořem vzorků rajčat podezřelých na napadení původcem bakteriální tečkovitosti rajčete, bakterií *P. s. pv. tomato*.

V roce 2008 se na jižní a střední Moravě objevilo značné napadení rajčat původci bakterióz. Dle charakteristických příznaků napadení, kterými byly nekrotické skvrny na listech a zelených plodech, jsme usoudily, že by se mohlo jednat o bakterie druhu *P. syringae*.

Nejprve jsme rozbořovaly vzorky pomocí roztěrů na King B médium, které nám umožnilo vybrat pro další testy fluoreskující izoláty. Bakterie rodu *Pseudomonas* na tomto živném médiu fluoreskují a tím se odlišují od jiných fytopatogenních a saprofytických bakterií. Po opakovaných roztěrech a kultivaci P. misek s bakteriemi v termostatu při teplotě 23-25 °C jsme získaly čisté kultury izolátů, které jsme zařadily do identifikačních testů.

Izoláty jsme určily pomocí testu oxidázy, testu hypersenzitivity na tabáku a aglutinačního testu se dvěma komerčními antiséry pro dva patovary *P. syringae* vyskytující se na rajčeti od firmy Neogén Europe Ltd.(VB).

Celkem jsme testovaly 30 izolátů podezřelých na *P. syringae*. Z nich bylo 28 fytopatogenních, protože to byly izoláty oxidáza negativní a zároveň pozitivní v testu hypersenzitivity na tabáku. Dva další izoláty byly podle výsledků v obou těchto testech nefytopatogenní.

Všech 30 izolátů jsme ověřovaly v aglutinačním testu s polyklonálními antiséry pro bakterie *P. s. pv. tomato* a *P. s. pv. syringae*. Dvacet sedm fytopatogenních izolátů, pocházejících z rajčete, reagovalo velmi silně s antisérem pro *P. s. pv. tomato*, a proto jsme je považovaly za izoláty, které patřily k tomuto patovaru. Jeden izolát, který pocházel z okurky, reagoval s antisérem pro *P. s. pv. syringae*, a proto jsme mohly předpokládat, že patřil k patovaru *syringae*.

U 10 izolátů určených jako *P. s. pv. tomato* jsme zaznamenaly také falešně pozitivní reakce s antisérem pro *P. s. pv. syringae*, což se projevilo slabou až střední křížovou reakcí s tímto antisérem. Oba nefytopatogenní izoláty reagovaly falešně pozitivně, a to dokonce s oběma antiséry.

I když se u některých izolátů objevily křížové reakce s antisérem pro necílovou bakterii, což je u polyklonálních antisér časté, umožnily výsledky testů jednoznačný závěr. Na základě provedených testů jsme ve vzorcích rajčete získaných z různých pěstitelských oblastí jižní a střední Moravy spolehlivě prokázaly přítomnost původce tečkovitosti rajčete.

V bakalářské práci jsem použila k určení fytopatogenní bakterie v infikovaných rostlinných vzorcích jednoduché, rychlé, finančně nenáročné testy, které umožnily určit bakteriální příčinu poškození rostlin s dostatečnou spolehlivostí. I pro pěstitele byla informace o výsledcích testů dostatečná, zvláště když se v praxi používají proti všem fytopatogenním bakteriím stejné baktericidy.

## 8. Seznam literatury

Benada, J., Špaček, J., Baudyš, E. 1958. Zemědělská fytopatologie, 2. díl, Choroby polních plodin. Státní Zemědělské Nakladatelství, Praha, 775 s.

Bilavčík, A., Zámečník, J., Kokošková, B. 1998. Poškození květů jabloní mrazem způsobené endogenními a exogenními krystalizačními jádry ledu. Zprávy České Botanické společnosti, Praha, 16, 33-39.

Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J., Tindall, B.J. The Bacteria: Phylum "Proteobacteria", Class Gammaproteobacteria [online]. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 6th March 2007 [cit. 2009-01-05]. Dostupné z <<http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/181/214>>.

Goodman, R. N., Novacky, A. J., 1994. The hypersensitive reaction in plant to pathogens: a resistance phenomenon. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, p. 244.

Haas, D., Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology. [online]. Uppsala, 10. března 2005 [cit. 2009-01-22]. Dostupné na <<http://www-mykopat.slu.se/Newwebsite/kurser/SUMMER05/READING/Nybroe/Haas05.pdf>>

Harris, D. E. 1964. Bacterial blight of peas. Journal of Agriculture, Victoria Department of Agriculture, 62, 276–280.

Hollaway, G. J., Bretaň, T. W., Gooden, J. M., Hannah, M. C. 1996. Effect of soil water content and temperature on the transmission of *Pseudomonas syringae* pv. *psis* from pea seed (*Pisum sativum*) to seedling. Australasian Plant Pathology, 25, 26-30.

Jermoljev, E., Pozděna, J., 1972. Sérologie rostlinných patogenů. Academia, Praha, 261 s.

Jílek, P., 2002. Základy imunologie. Anyway, Praha 2, 75 s.

Kazda, J., Prokinová, E., Ryšánek, P. 2007. Škůdci a choroby rostlin, domácí rostlinolékař. Knižní klub, Praha, 288 s.

King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 44, 301-307.

Klaban, V., 2001. Svět mikrobů. Ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí. Gaudeamus při Univerzitě Hradec Králové, Hradec Králové, 416 s.

Klement, Z. 1997. Bacterial canker and dieback disease of apricots (*Pseudomonas syringae* van Hall). EPPO Bull, 7 (1), 57–68.

Klement, Z., Rudolph K., Sands, D.C. 1990. Methods in phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, p. 568.

Kokošková B., 1998. Detekce a identifikace bakterií sérologickými metodami. In: „Klasifikace, nomenklatura a identifikace fytopatogenních prokaryot – současný stav a výhled.“ Praha, 34–41.

Kokošková, B. 2003. Bakteriózy obilnin. In: „Významné choroby obilnin, jejich epidemiologie, kontrola a odolnost odrůd.“ Praha, 8–11 s.

Kokošková, B. 2004. Bakteriózy obilnin zatím nehrozí. Úroda, 3, 12.

Kokošková, B. 2006. Význam a diagnostika bakterie *Pseudomonas syringae* a patovarů vyskytujících se na obilninách. In: „Diagnostika a hodnocení chorob rostlin, se zaměřením na obilniny.“ Praha, 47-51.

Kokošková, B. 2008. Bakteriální choroby plodové zeleniny. Zahradnictví, časopis profesionálních zahradníků, 10, 18–19.

Kokošková, B., Pánková, I., Kúdela, V. 1998. Reaction of czech pea varieties to races of *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*. Plant Protection Science, 34 (4), 126-130.

Kůdela, V., 1998. Obecná fytopatologie. Fytopatogenní prokaryota (přednášky). České Budějovice: Jihočeská univerzita Zemědělská fakulta, České Budějovice, 152 s.

Kůdela, V., Novacky, A., Fucikovsky, L. 2002. Rostlinolékařská bakteriologie. Academia, Praha, 347 s.

Melloto, M., Uderwood, W., Yang He, S. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. [online]. Annual Review of Phytopathology, September 2008 [cit. 2009-01-20]. Dostupné z <<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>>.

Olson, B. D., Jones, A. L. 1983. Reduction of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on montmorency sour cherry with copper and dynamics of the copper residues. Phytopathology, 73 (11), 1520-1525.

Orser, C., Staskawicz, B. J., Loper, J., Panopoulos, N. J., Dahlbeck, D., Lindow, S. E., Schroth, M. N. 1983. Cloning of genes involved in bacterial ice nucleation and fluorescent pigment/siderophore production. In: „Molecular Genetics of the Bacteria–Plant Interaction“. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 353–354.

Otta, J. D., English, H., 1971. Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. Phytopathology, 61 (5), 443–451.

Pernezny, K., Kůdela, V., Kokošková, B., Hládka, I. 1995. Bacterial diseases of tomato in Czech and Slovak Republics and lack of streptomycin resistance among copper-tolerant bacterial strains. Crop Protection, 14 (4), 267–270.

Roberts, S. J. 1997. Effect of weather conditions on local spread and infection by pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*). European Journal of Plant Pathology, 103, 711–719.

Rod, J., Hluchý, M., Zavadil, K., Prášil, J., Somssich, I., Zacharda, M. 2005. Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy. Ochrana zeleniny v integrované produkci včetně prostředků biologické ochrany rostlin. Biocont Laboratory, spol. s.r.o, Brno, 400 s.

Rozsypal, S., Hoďák, K., Martinec, T., Kocur, M. 1981. Obecná bakteriologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 750 s.

Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, p. 398.

Skoric, V. 1927. Bacterial blight of peas; over wintering, dissemination and pathological histology. Phytopathology, 17, 611-628.

Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R., Holderness, M., Burger, B. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in quarantine pests for Europe, second edition, Data sheets on quarantine pests for the European Union and for European and Mediterranean Plant Protection Organization, 1067–1070.

Šilhánková, L. 1995. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Victoria Publishing, a. s., Praha, 360 s.

Wikipedia: the free encyclopedia [online]. 24. ledna 2009 [cit. 2009-02-22]. Dostupné na <<http://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>>.

## 9. Přílohy

Obrázek 1: Příznaky bakteriální tečkovitosti na listu rajčete



Obrázek 2: Test oxidázy

Vlevo: oxidáza negativní izoláty, jsou tedy fytopatogenní,  
Vpravo: oxidáza pozitivní, jsou nefytopatogenní,





### Obrázek 3: Test hypersenzitivity na tabáku

Pozitivní reakce na listu po aplikaci fytopatogenního izolátu



## Obrázek 4: Sérologický aglutinační test

Antisérum pro *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* od firmy Neogen Europe Ltd. (VB)

Sloupce vlevo:

2. firemní negativní kontrola
4. křížová reakce antiséra pro *P. s.* pv. *tomato* s kmenem *P. s.* pv. *syringe* CCM 4073
6. testovaný kmen, označený jako 8014, odpovídá v testech izolátu č. 2/1, který pocházel z okurky, a je tedy negativní s antisérem pro *P. s.* pv. *tomato*

Sloupce vpravo:

1. firemní pozitivní kontrola
3. vlastní negativní kontrola (*P. fluorescens* CCM 2115)
5. testovaný kmen, označený jako 8013, odpovídá v testech izolátu č. 1/1, který pocházel z rajčete, je pozitivní s antisérem pro *P. s.* pv. *tomato*

