

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

---

Katedra rostlinné výroby a agroekologie  
Studijní program: B4131 - Zemědělství  
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Genotypizace bakterií rodu *Xanthomonas*  
patogenních pro rajče a papriku multilokusovým  
sekvenováním**

DAGMAR STEHLÍKOVÁ

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.

Konzultant:

Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

---

České Budějovice

2013

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 20. 3. 2013

.....

Dagmar Stehlíková

## **Poděkování**

Především bych chtěla poděkovat doc. Ing. Ivanu Mrázovi, CSc., vedoucímu bakalářské práce, za odborné vedení, které mi poskytl při vypracování bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavlu Beranovi, Ph.D. a prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky.

# Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce je zjištění míry příbuznosti u 20 sbírkových izolátů rodu *Xanthomonas* způsobujících bakteriální skvrnitost rajčat a paprik. K určení příbuznosti byla použita metoda multilokusové sekvenční analýzy (MLSA). Byly zjištěny sekvence genů *atpD*, *rpoD*, *gyrB*, *glnA* a *efP*, které byly analyzovány pomocí softwaru MEGA verze 5.1. Výsledek byl vyhodnocen pomocí dendrogramu, dle kterého byly izoláty rozděleny do dvou klastřů. První klastř zahrnuje izoláty druhu *Xanthomonas euvesicatoria* spadající do skupiny A. Druhý klastř pak zahrnuje izoláty druhu *Xanthomonas vesicatoria* skupiny B. Výsledky dosažené v této práci se shodují se současnou klasifikací xanthomonád způsobujících bakteriální skvrnitost rajčat a paprik.

## **Klíčová slova:**

*Xanthomonas*, sekvenování, MLSA, klasifikace, rajče a paprika

# Abstract

The subject of this bachelor thesis is to estimate the degree of relationship of 20 collected isolated samples of *Xanthomonas* genus causing bacterial spot of tomatoes and peppers. To assess the relationship, the method of multilocus sequence analysis has been used (MLSA). Sequences of genes *atpD*, *rpoD*, *gyrB*, *glnA* and *efP* were found and analyzed using MEGA software version 5.1. The result was evaluated using a dendrogram according to which the isolates were divided into two clusters. The first cluster includes isolated of *Xanthomonas euvesicatoria* belonging to group A. The second cluster includes isolates of the species *Xanthomonas vesicatoria* belonging to group B. The results obtained in this work are consistent with the present classification of the xanthomonads causing bacterial spot of tomatoes and peppers.

## **Key words:**

*Xanthomonas*, sequencing, MLSA, classification, tomato and pepper

## Obsah

1	Úvod.....	7
2	Literární přehled.....	8
2.1	Bakterie rodu <i>Xanthomonas</i> patogenní pro rajče a papriku.....	8
2.1.1	Hostitelé.....	8
2.1.2	Rozšíření.....	8
2.1.3	Morfologie.....	9
2.1.4	Symptomy.....	9
2.1.5	Biologie.....	9
2.1.6	Klasifikace.....	10
2.1.7	Ochrana.....	11
2.1.8	Molekulární charakteristika.....	11
2.2	Použité metody.....	13
2.2.1	PCR.....	13
2.2.2	Sekvenování.....	14
2.2.3	Multilokusové sekvenování.....	14
3	Cíl práce.....	16
4	Materiál a metody.....	17
4.1	Bakteriální kmeny a kultivační podmínky.....	17
4.2	Izolace bakteriální DNA.....	17
4.3	PCR.....	17
4.4	Elektroforéza.....	17
4.5	Přečištění PCR.....	18
4.6	Sekvenování DNA.....	18
4.7	Multilokusová sekvenční analýza.....	18
5	Výsledky a diskuse.....	19
6	Závěr.....	21
7	Seznam použité literatury.....	22
8	Tabulky.....	28
9	Obrázky.....	32

## Seznam zkratek použitých v bakalářské práci

ATP – Adenosintrifosfát, *adenosine triphosphate*

CDS – kódující sekvence, *coding sequence*

DNA - deoxyribonukleová kyselina, *deoxyribonucleic acid*

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina, *ethylenediaminetetraacetic acid*

IS – vložená sekvence, *insertion sequence*

kb – kilobáze [1kb = 1000 nukleotidů (bází)], *base*

PCR – polymerázová řetězová reakce, *polymerase chain reaction*

RNA - ribonukleová kyselina, *ribonucleic acid*

rRNA – ribozomální RNA, *ribosomal ribonucleic acid*

ST – sekvenční typ, *sequence type*

TBE – tris borate EDTA

tRNA – transferová RNA, *transfer ribonucleic acid*

# 1 Úvod

Rajče (*Lycopersicum* spp.) a paprika (*Capsicum* spp.) jsou pěstovány po celém světě. Hlavní produkční oblastí jsou sice země v tropických a subtropických oblastech, ale pěstují se i ve sklenících v zemích mírného klimatu. Významným bakteriálním patogenem způsobujícím bakteriální skvrnitost u rajčat a paprik jsou některé druhy bakterií rodu *Xanthomonas* Dowson 1939 (Approved Lists 1980) emend. Vauterin et al. 1995.

Ozdravení takto napadených porostů je velmi časově i finančně náročné, mnohdy i zbytečné. Napadení by se mělo předcházet, a to správnou identifikací patogena a detekcí zdravých semen a rostlin. K tomu nám slouží tradiční metody, jako je např. kultivace na agaru, imunochemické či molekulárně biologické metody, např. PCR a sekvenování.

K zjištění míry příbuznosti v rámci daného druhu slouží genotypizační metody. Mezi tyto metody patří např. AFLP (amplified fragment length polymorphism), RAPD (random amplification of polymorphic DNA), RFLP (restriction fragment length polymorphism) aj.

Hlavním cílem této bakalářské práce je určení genetické příbuznosti mezi 20 sbírkovými kmeny xanthomonád způsobujících bakteriální skvrnitost u rajčat a paprik. Získáním sekvencí těchto sbírkových kmenů s následným vyhodnocením jednotlivých skupin pomocí MLSA bude možno následně přiřazovat testované izoláty tohoto bakteriálního rodu do příslušných skupin.

Tato práce je zaměřena na srovnání sekvencí vybraných genů (ATP syntáza beta řetězce - *atpD*, RNA polymeráza sigma faktor - *rpoD*, DNA gyráza podjednotky B - *gyrB*, glutamin syntáza I - *glnA* a elongační faktor P - *epF*) metodou MLSA.

Tato práce vznikla v rámci projektu OPVK "Rozvoj postdoktorandských pozic na JU" (CZ.1.07/2.3.00/30.0049), spolufinancovaného Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Bakterie rodu *Xanthomonas* patogenní pro rajče a papriku

#### 2.1.1 Hostitelé

Hlavními hostiteli bakterie *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin et al. 1995 a *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al. 2006 jsou rajče (*Lycopersicon* spp.) a paprika (*Capsicum* spp.). Mezi další hostitele patří durman (*Datura* spp.), blín (*Hyoscyamus* spp.), kustovnice (*Lycium* spp.), tabák selský (*Nicotiana rustica*), mochně (*Physalis* spp.) a rostliny rodu *Solanum* – především nekulturní plodiny (Hayward a Waterston, 1964)

#### 2.1.2 Rozšíření

Bakteriální skvrnitost má široké geografické rozšíření (Sahin a Miller, 1996). Je hlavním problémem v tropických a subtropických oblastech (Jones a kol., 1986). V mírném podnebném pásmu mají význam jen některé pátovary (Kúdela a kol., 2002).

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

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

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

Severní Amerika: Bermudy, Kanada, Mexiko, USA.

Střední a Jižní Amerika: Barbados, Kostarika, Kuba, Dominika, Dominikánská republika, Salvador, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Jamajka, Martinik, Nikaragua, Portoriko, Svatý Kryštof a Nevis, Svatý Vincenc a Grenadiny, Trinidad a Tobago,



Americké Panenské ostrovy, Argentina, Brazílie, Chile, Kolumbie, Paraguay, Surinam, Uruguay, Venezuela.

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

### **2.1.3 Morfologie**

Buňky mají tyčinkovitý tvar, oblé zakončení a jejich rozměry se pohybují cca v délce od 0,7  $\mu\text{m}$  do 2,0  $\mu\text{m}$  a šířce od 0,4  $\mu\text{m}$  do 0,7  $\mu\text{m}$ . Pohybují se jedním polárním bičíkem. Xanthomonády jsou katalyticky pozitivní, neredukují dusičnany a slabě produkují kyseliny ze sacharidů (Jackson, 2009).

Xanthomonády jsou nesporulující, obligátně aerobní, gramnegativní bakterie. Na masopeptanovém agaru s glukosou vytváří žluté mukoidní hladké kolonie. Zbarvení je způsobeno žlutými pigmenty zvanými xanthomonadiny a exopolysacharidem xanthanem (Kůdela a kol., 2002).

### **2.1.4 Symptomy**

Příznakem onemocnění rostlin paprik a rajčat jsou vodnaté léze, skvrny, chlorózy a nekrózy, které jsou viditelné hlavně na listech, stoncích a plodech. U rajčat se vyskytují malé kruhové léze o velikosti cca 1 – 5 mm (Obr.1, 2).

U paprik jsou na listech nekrotické léze a skvrny různého tvaru a velikosti, ale na stoncích a plodech jsou léze kruhové o přibližně stejné velikosti jako u rajčat (Obr.1, 2). Řapík a čepel jsou zvláště citlivé k bakteriální skvrnitosti. Bakteriální skvrnitost se liší od houbových listových skvrn matným vzhledem.

U paprik i rajčat se v listech vyvíjí chloróza. Ta předchází epinastii listů a následnému opadu listů u paprik a kompletní nekróze mladých lístků u rajčat. Chloróza, opad listů a následná nekróza může být ovlivněna snížením obsahu ethylenu v rostlinách (Swings a Civerolo, 1993).

### **2.1.5 Biologie**

Patogen vstupuje do rostlinné tkáně prostřednictvím průduchů a hydatod nebo oděrkami způsobenými větrem, hmyzími vpichy nebo mechanickými prostředky (Jones, 1991).

Xanthomonády způsobující bakteriální skvrnitost u rajčat a paprik přežívají především na semenech, rostlinných zbytcích a v rhizosféře jiných nehostitelských rostlin – pšenice a sóji (Bashan a kol., 1982a). Patogen je přenášen z infikovaných rostlin na osivo, kde je schopen přežít až 10 let (Bashan a kol., 1982b). Patogen může epifytně přežít na povrchu listů, když má příznivé podmínky. Xanthomonády byly detekovány i v aerosolech nad poli, kde se vyskytovaly jejich hostitelské rostliny. Z této skutečnosti se soudí, že xanthomonády jsou přenášeny vzduchem (McInnes a kol., 1988).

V suchých obdobích je šíření patogena omezeno. Toto šíření patogena se výrazně zvyšuje, když se prořezávání porostu provádí za vlhkého počasí. Je doporučeno dodržovat hygienické zásady (Pohronezny a kol., 1990). Šíření onemocnění je podporováno vysokými teplotami, které se pohybují mezi 30 - 35°C (Diab a kol., 1982).

### 2.1.6 Klasifikace

Klasifikace a nomenklatura rodu *Xanthomonas* prošla výraznými změnami. Před zavedením současné klasifikace Vauterin a kol. (1995) identifikovali tři odlišné skupiny A, B a C, které byly klasifikovány jako rasy *X. campestris* pv. *vesicatoria* na základě fenotypových a genotypových testů.

V současné době se xanthomonády patogenní pro rajče a papriku řadí do čtyř skupin. Tyto skupiny byly rozlišeny na základě amylolytických a pektolytických aktivit v pulzní gelové elektroforéze. Podrobnější molekulárně biologické techniky umožnily klasifikaci samostatných skupin A (*X. euvesicatoria*), B (*X. vesicatoria*), C (*X. perforans*) a D (*X. gardneri*) (Jones a kol., 2004). *X. euvesicatoria* obsahuje většinu ras *X. campestris* pv. *vesicatoria* (skupina A). Původně Jones a kol. (2000) uváděli, že *X. vesicatoria* (skupina B) tvořily samostatnou skupinu a kmeny ze skupiny C byly považovány za poddruh *X. campestris* pv. *vesicatoria* (skupina A). Skupina D byla dříve nazvána *Pseudomonas gardneri* (Sutic, 1957). Dye (1966) však prokázal její shodnost s rodem *Xanthomonas*.

Vzhledem k tomu, že xanthomonády skupiny A a B se vyskytují po celém světě a jsou patogenní pro rajčata i papriky, jsou nejvýznamnějšími skupinami těchto patogenů. Xanthomonády ze skupiny C byly objeveny v USA, Mexiku a na pobřeží Tichého oceánu, a to pouze na rajčatech. Pro papriky není skupina C patogenní.

Xanthomonády ze skupiny D byly detekovány na rajčatech i paprikách v Kostarice, zemích bývalé Jugoslávie, Kanadě, Brazílii a oblastech Tichého oceánu (Jones a kol., 2005).

Young a kol. (2008) navrhli na základě podobnosti nad 99% u MLST sloučit *X. euvesicatoria* a *X. perforans* v jednu skupinu. Poddruhy *X. fuscans*, *X. citri* a *X. axonopodis* potvrzují shodu na 98,34% a měly by být přiřazeny ke stejnému druhu jako *X. perforans* a *X. euvesicatoria*. Tato jednotná skupina by měla být pojmenována *X. axonopodis* (Young a kol., 2008).

### 2.1.7 Ochrana

Xanthomonády způsobující bakteriální skvrnitost mají nepříznivý vliv na produkci rajčat a paprik. Onemocnění se rozšiřuje rychle a jeho kontrola je složitá. Doporučuje se používat certifikované osivo. Na trhu jsou dostupné i rezistentní odrůdy. Rostliny jsou běžně ošetřovány přípravky s obsahem mědi (Dougherty, 1979). Závažnost choroby je redukována použitím bakteriálních fágů (bakteriofágů), a to hlavně ve sklenicích. Použití bakteriofágů je účinnější než měďnaté přípravky. Studie potvrzují snížení onemocnění s použitím bakteriofágů o 17% a u přípravků na bázi mědi o 11% (Flaherty, 2000). Nevýhodou bakteriofágů je, že jejich účinnost je eliminována deštěm a slunečním zářením. Aplikace se musí provádět brzy ráno před svítáním (Balogh a kol., 2003)

*Xanthomonas vesicatoria* a *Xanthomonas euvesicatoria* jsou podle legislativy ČR i EU řazeny ke karanténním organismům (EPPO/CABI, 1997).

### 2.1.8 Molekulární charakteristika

Genom tvoří jeden kruhový chromozom o velikosti 5 178 466 bp a čtyři extrachromozomální plazmidy. Původně byly známy plazmidy - pXCV2 (1852 bp), pXCV38 (38116 bp) a pXCV183 (182572 bp). Později byl objeven plazmid pXCV19 (19146 bp).

U chromozomální DNA je vysoký obsah G+C bazí. Pohybuje se v rozmezí 63,7 – 65 %. U plazmidů je obsah G+C mezi 56,59 – 60,79 %. Xanthomonády patogenní pro rajčata a papriky obsahují celkem 4726 kódujících sekvencí (CDS). Kódovací kapacita

je 87,13 %, což je typické pro většinu bakterií. Na základě anotace byla biologická role přidělena 3080 CDS, 697 CDS je hypotetických a 949 CDS má neznámou funkci. Xanthomonády způsobující bakteriální skvrnitost obsahují dva rRNA operony, které jsou uspořádány v pořadí 16S-23S-5S. Nachází se v oblasti 500 kb (mezi 4600000 bp a 5100000 bp) na levém replichoru. Pro 20 aminokyselin bylo zjištěno 56 tRNA. Z toho je 54 tRNA umístěno na chromozomu a 2 tRNA na plazmidech pXCV19 a pXCV183. Genom obsahuje 66 IS prvků. Z toho je 58 IS na chromozomu a zbylých 8 IS na čtyřech plazmidech (Thieme a kol., 2005; Vöhrhler a kol., 2007).

## 2.2 Použité metody

### 2.2.1 PCR

Průkopníkem polymerázové řetězcové reakce (PCR) byl v roce 1983 Kary B. Mullis. O deset let později za tento objev dostal Nobelovu cenu (Butler, 2005). PCR se používá v mnoha oblastech biologie. Umožňuje nám *in vitro* amplifikaci specifických sekvencí DNA bez klonování (Erlich, 1989; Innis a kol., 1990). Proces PCR je jednoduchý a zároveň rychlý a přesný. PCR lze považovat za zjednodušenou verzi procesu DNA replikace, která probíhá v průběhu buněčného dělení (Lo a kol., 2006).

Mezi komponenty každé PCR patří templátová DNA, přesně definované primery (syntetické oligonukleotidy s délkou přibližně 20-30 bp), volné deoxynukleotidy, termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza (většinou Taq polymeráza izolována z bakterie *Thermus aquaticus*) a pufr s hořečnatými ionty (Pusterla a kol., 2006).

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Určitý úsek nukleotidové sekvence je vymezen dvěma primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. DNA polymeráza zajišťuje nasedání nukleotidů. Následně se začnou syntetizovat nová vlákna na obou matricových řetězcích.

PCR probíhá ve třech hlavních krocích:

1. denaturace: denaturace dvouřetězcové DNA při teplotě cca 94 °C za vzniku dvou molekul jednořetězcové DNA
2. annealing: připojení primerů k rozpleteným řetězcům DNA při teplotě cca 40 – 65 °C
3. elongace: syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy při teplotě cca 65 – 75 °C (Šmarda a kol., 2005; White, 1993)

Tyto kroky se postupně opakují 20x – 30x. Počet cyklů ovlivňuje množství amplifikovaného fragmentu. Jako vedlejší krok se na začátku PCR často provádí úvodní denaturace, která probíhá při přibližně 94 °C po dobu 3 minut. Celý PCR program může zakončovat závěrečná elongace, která trvá přibližně 7 minut při 72 °C. Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, který umožňuje programování jednotlivých teplot (Clark a Pazdernik, 2013).

Výsledkem PCR jsou amplikony tj. mnohonásobně zmnožený vybraný úsek DNA. K vizualizaci slouží elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. K zviditelnění pod UV světlem se nejčastěji používá interkalační fluorescenční barvivo ethidium bromid nebo SYBR Green (Šmarda a kol., 2005).

### **2.2.2 Sekvenování**

Cílem sekvenování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA (Šmarda et al., 2005). Počátky sekvenování sahají až do roku 1968, avšak moderní sekvenování DNA se datuje k roku 1977 s příchodem Maxam-Gilbertovy a Sangerovy metody (Hutchison, 2007). Nejpoužívanější je Sangerova metoda založená na polymerázové řetězové reakci.

V dřívější době sekvenace probíhala ve čtyřech nezávislých reakcích. Každá reakční směs obsahuje templátovou DNA, primery, dNTP a jeden z dideoxyribonukleotidtrifosfátů (ddNTP). DNA polymeráza začne syntetizovat nové vlákno na základě komplementarity bází. dNTP jsou připojovány na 3'OH skupinu. ddNTP ukončují syntézu. Následující dNTP by se neměl kam navázat, protože ddNTP má místo hydroxylové skupiny pouze H<sup>+</sup> (Ipser, 2005). Vzniklé fragmenty se denaturují a separují na polyakrylamidovém gelu. Z ozářených proužků, které jsou viditelné, je možné odvodit sekvenci DNA. Tato metoda stanovuje sekvence o délce 300 – 400 bází (Šmarda a kol., 2005).

Dnes se používá především kapilární elektroforéza, která umožňuje sekvenaci v jedné reakci. Každý ddNTP je značen jiným fluorescenčním barvivem a elektroforéza probíhá v jedné skleněné kapiláře (Adams a kol., 1994). Délka stanovené sekvence je mezi 500 – 1 000 bázemi (Šmarda a kol., 2005).

### **2.2.3 Multilokusové sekvenování**

Metoda multilokusové sekvenční typizace (Multilocus sequence typing, MLST) byla poprvé popsána roku 1998 (Maiden a kol., 1998). Používá se ke studiu genetické struktury patogenních i nepatogenních bakterií (Maiden, 2006).

Tato metoda se skládá ze sekvencí více lokusů. Pro konkrétní bakteriální druh jsou určovány sekvence několika vybraných „housekeeping genů“, které mají základní metabolickou funkci. Kombinace jejich bodových sekvenčních polymorfismů pak

jednoznačně určí příslušnost určitého izolátu ke konkrétnímu kmenu (Almeida a kol., 2010).

Používá se 450 – 500 bp vnitřních fragmentů každého z vybraných genů (Enright a Spratt, 1999; Urwin a Maiden, 2003). Kmeny jsou definovány jako sekvenční typy (ST). Určují se podle zvláštních alel přítomných v genu. Průměrně je v každém lokusu přítomno 42 alel. Pokud je změna v izolátech stejná, lze kmeny považovat za stejný klon.

Metoda multilokusové sekvenční analýzy (Multilocus sequence analysis, MLSA) je rozšířenou metodou MLST. Zaměřuje se na stanovení fylogenetických příbuzností mezi kmeny (Gevers a kol., 2005).

MLSA a MLST studie byly publikovány pro několik rostlinných patogenů. Mezi nimi je i *Xanthomonas* spp. Tyto studie byly provedeny především k objasnění evoluce a populační genetiky těchto patogenů (Young a kol., 2008; Ah-You a kol., 2009). Xanthomonády patogenní pro rajčata a papriky tvoří sice odlišné, ale komplexní fylogenetické populace. Metody slouží k rozvoji molekulárních technik, a to k identifikaci patogena a určení zdravých semen a rostlin (Fargier a kol., 2011).

Jako každá genotypová metoda, tak i MLSA má své výhody a nevýhody. Je sice přesná, ale časově a finančně náročná. Díky povaze dat (nukleotidovou sekvencí lze zapsat jako prostý text) si laboratoře nemusí mezi sebou měnit referenční kmeny, stačí jen mezilaboratorní komunikace přes internet, což umožňuje globální epidemiologické studie (Nelson a Williams, 2007). Pro lepší přehlednost se výsledná data zobrazují pomocí fylogenetických stromů (Parkinson a kol., 2009).

### 3 Cíl práce

1. Stanovení genetické příbuznosti mezi sbírkovými bakteriálními kmeny rodu *Xanthomonas* patogenních pro rajče a papriku pomocí metody MLSA.
2. Analýza vztahu mezi jednotlivými geny a stanovení souvislosti mezi zřetěženými geny. Vizualizace dosažených výsledků pomocí dendrogramů.
3. Stanovení sekvencí DNA vybraných pěti genů pro celkem dvacet testovaných sbírkových kmenů xanthomonád patogenních pro rajče a papriku.



## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Bakteriální kmeny a kultivační podmínky**

K analýze byly použity bakteriální kmeny (Tab.1) získané z Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms v Gentu (BCCM/LMG), Collection Francaise de Bactéries Phytopathogénes v Beaucauzé (CFBP) a České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM).

Všechny kmeny byly kultivovány při 28 °C po dobu 1 až 3 dnů na MPAg (masopeptonovém agaru s glukosou: 40 g živného agaru č. 2, 5 g kvasničného autolyzátu, 10 g glukózy, 20 g agaru, doplněno dH<sub>2</sub>O do 1 litru, pH upraveno na 7,2).

### **4.2 Izolace bakteriální DNA**

DNA byla izolována z narostlých bakteriálních kultur pomocí komerčně dostupného kitu Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA).

### **4.3 PCR**

Reakční směs PCR byla připravena v celkovém objemu 25 µl v následujícím složení: 12,5 µl PPP MasterMix Combi (Top-Bio, ČR), 9,5 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O, 1 µl templátové DNA a po 1 µl každého z primerů (10 pmol). Program PCR se skládal z úvodní denaturace při 94 °C trvající 3 minuty. Následovala vlastní denaturace při 94 °C trvající 50 sekund s následným annealingem po dobu 50 sekund (Tab.2). Elongace proběhla při 72 °C po dobu 1 minuty. Předěšlé tři i kroky se opakovaly v 35 cyklech. Celý program byl zakončen elongací při 72 °C po dobu 7 minut. Po dokončení programu byly vzorky zchlazeny a udržovány při 4 °C.

### **4.4 Elektroforéza**

Po PCR byla každá z reakcí smíchána s interkalačním činidlem SYBR Green (Lonza, USA) a nanesena na 1% agarózový gel (Lonza, USA) s 0,5 × TBE. Elektroforéza probíhala 15 minut při 1 V/cm a následně 80 minut při 4 V/cm. Během samotné separace byla elektroforetická vana umístěna na orbitální třepačku při rychlosti 50 ot/min, aby bylo zajištěno rovnoměrné zahřívání gelu a pufry. Agarózový gel byl

vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení Kodak EDAS 290.

#### **4.5 Přečištění PCR**

K přečištění PCR fragmentů po elektroforéze byl použit kit Clean-up (A&A Biotechnology, Polsko). Postupováno bylo podle přiloženého protokolu. Před elucí čisté DNA (11. krok protokolu) byly vzorky zahřívány po dobu 3 – 5 min při teplotě 50 °C, aby se uvolnil přebytečný ethanol.

#### **4.6 Sekvenování DNA**

Pro sekvenační reakci byl namíchán 1 µl primeru (2,5 pmol) (Tab.2) a 6 µl (150 ng) přečištěného PCR produktu tak, aby celkový objem činil 7 µl. Sekvenační reakce proběhla na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3130×1 (Life Technologies, USA) s použitím BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 (Life Technologies, USA). Vlastní sekvenování bylo provedeno v laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin, na Biologickém centru Akademie věd České republiky.

#### **4.7 Multilokusová sekvenční analýza**

Sekvence DNA byly pro každý gen zvlášť zarovnány (alignment) pomocí softwaru Clustal W verze 2.1 (Larkin et al., 2007) a zkráceny na sekvence dlouhé: *atpD* – 778 bází, *efP* – 380 bází, *glnA* – 957 bází, *gyrB* – 862 bází a *rpoD* – 738 bází. Tyto sekvence byly pospojovány do výsledných „zřetězených“ (concatenated) sekvencí obsahujících 3715 bází.

Pro určení fylogenetických vztahů byl pomocí programu MEGA verze 5.1 (Tamura a kol., 2011) nejdříve zvolen nejvhodnější model evoluce sekvencí DNA (Model of DNA evolution). Byl vybrán model TN93 (Tamura a Nei, 1993) s gamma korekcí, který má nejnižší hodnotu BIC (Bayesian Information Criterion) = 7254,227. Hodnota lnL (Maximum Likelihood value) byla -3402,882. Výsledek byl upřesněn pomocí bootstrappingu s 1000 opakováními.

## 5 Výsledky a diskuse

Fylogenetická příbuznost bakteriálních kmenů byla stanovena použitím metody Maximum Likelihood na základě modelu Tamura-Nei. Fylogenetické stromy byly konstruovány na základě Neighbor-Joining (NJ). Výsledný NJ dendrogram vytvořený na základě zřetěžených sekvencí byl zobrazen s nejvyšším log likelihood -3439,7139. Dendrogram byl získán NJ metodou hledání matic párových vzdáleností za použití Maximum Composite Likelihood (MCL) s gama korekcí pro toto rozdělení.

NJ dendrogramy u sekvencí jednotlivých genů (*atpD*, *rpoD*, *gyrB*, *glnA*) vytvářely prakticky stejné dendrogramy jako u NJ dendrogramu vytvořeného ze všech zřetěžených sekvencí (Obr.5). Výjimku tvořil gen *efP*, kde NJ dendrogram (Obr.6) tvořil jeden klastr a dvě samostatné větve. Do klastru jsou řazeny všechny vybrané izoláty, pouze izoláty BCCM/LMG 925 a BCCM/LMG 927 tvoří samostatné větve.

Výsledný NJ dendrogram zřetěžených sekvencí rozděluje soubor dvaceti izolátů na dva oddělené klastry a jednu samostatnou větev. První klastr obsahuje izoláty CCM 2101, BCCM/LMG 667, BCCM/LMG 922, CFBP 1604, CFBP 3274, BCCM/LMG 918, BCCM/LMG 921, BCCM/LMG 928, BCCM/LMG 909, BCCM/LMG 931, BCCM/LMG 933, BCCM/LMG 668. Maximální počet substitucí na pozici v rámci tohoto klastru je 0,003, což dokazuje, že jde o *X. euvesicatoria* (skupina A) dříve označované jako *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* syn. *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Druhý klastr obsahuje izoláty CCM 2102, CFBP 2537, BCCM/LMG 916, BCCM/LMG 919, BCCM/LMG 920, BCCM/LMG 925. Jejich maximální počet substitucí na pozici dosahuje 0,016, což dokazuje, že se jedná o *Xanthomonas vesicatoria* (skupina B). Tyto výsledky se shodují s předchozí vědeckou prací, která se zabývala genotypizací pomocí metody MLSA (Young a kol., 2008). Z toho můžeme soudit, že metoda MLSA je spolehlivou genotypizační metodou.

Vauterin a kol. (1990) a Stall a kol. (1994) byli první, kteří geneticky i fenotypově odlišili tyto dvě skupiny. Bouzar a kol. (1994) potvrdil toto tvrzení, protože kmeny ze skupiny B prokazovaly silně amylolytickou a pektinolytickou aktivitu, zatímco kmeny ze skupiny A tyto aktivity neměly. Výjimkou je izolát BCCM/LMG 934, který je v našem klastru přiřazen k patogenu *Xanthomonas vesicatoria*. V databázi sbírky

Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms je však uveden jako *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Samostatnou větev tvoří izolát BCCM/LMG 927, který je pravděpodobně ve sbírce Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms chybně zařazen a pojmenován. Sekvence DNA pěti genů této bakterie byly porovnány se sekvencemi z databáze GenBank, kde nejvyšší shodu vykazovala *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (1939). Tento patogen způsobuje černou žilkovitost u brukvovitých rostlin (Fargier a Manceau, 2007).

Výsledkem této práce je určení genetické příbuznosti mezi xanthomonádami patogenními pro rajče a papriku. Dle získaných výsledků, na jejichž základě byly sbírkové izoláty xanthomonád zařazeny do samostatných skupin, bude možné přiřazovat další analyzované izoláty k jednotlivým druhům – skupinám.

## 6 Závěr

1. Pomocí metody MLSA byla určena genetická příbuznost mezi kmeny. Izoláty byly rozděleny do dvou klastřů. První klastř zahrnoval izoláty druhu *Xanthomonas euvesicatoria* spadající do skupiny A. Do druhého klastřu byly zařazeny izoláty druhu *Xanthomonas vesicatoria* skupiny B.
2. Vztahy mezi zřetěženými sekvencemi pěti genů vykazovaly genetickou příbuznost v rámci dvou hlavních klastřů a jedné samostatné větve. Podobnou genetickou příbuznost vykazovaly čtyři samostatné geny (*atpD*, *glnA*, *gyrB* a *rpoD*). Výjimku tvořil gen *efP*, který se jeví jako méně vhodný k určení genetické příbuznosti u námi zkoumaných izolátů.
3. U všech testovaných sbírkových kmenů byly získány sekvence DNA všech zkoumaných genů.

## 7 Seznam použité literatury

**Adams, M. D., Fields, Ch. a Venter, J. C.** (1994) Automated DNA sequencing and analysis. Vydání 1. 344 s. ISBN 0-12-717010-3.

**Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P. A., Brisse, S., Nesme, X., Chiroleu, F., Bui Thi Ngoc, L., Jouen, E., Lefeuvre, P., Verniere, C. a Pruvost, O.** (2009) Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the *Anacardiaceae* and their relatedness to species of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 306-318.

**Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morri, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E L., Lacy, G.H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C. a Vinatzer, B. A.** (2010) PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology* **100**, 208–215.

**Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P. a Jackson, L. E.** (2003) Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant. Dis.* **87**, 949-954.

**Bashan, Y., Diab, S. a Okon, Y.** (1982a) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant Soil* **68**, 161-170.

**Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y.** (1982b) Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology* **72**, 1143-1144.

**Bouzar, H., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Stall, R. E. a Scott, J. W.** (1994) Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* **84**, 39–44.

**Butler, J.** (2005) Forensic DNA typing. Vydání 2. 660 s. ISBN 0-12-147952-8.

**Ciancio, A. a Mukerji, K. G.** (2008) Integrated Management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria. Vydání 1. 419 s. ISBN 978-1-4020-8570-3.

- Clark, D. P. a Pazdernik, N. J.** (2013) Molecular biology. Vydání 2. 907 s. ISBN 978-0-12-378594-7.
- Doidge, E. M.** (1920) A tomato canker. *Ann. Appl. Biol.* **7**, 407-430.
- Dougherty, D.** (1979) Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays. *P. Fl. St. Hort. Soc.* **91**, 291-293.
- Dowson, W. J.** (1939) On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zentbl. Bakteriolog. P.* **100**, 177-193.
- Enright, M. C. a Spratt, B. G.** (1999) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7**, 482-487.
- EPPO/CABI** (1997) Quarantine Pests for Europe. Vydání 2. Publikováno Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R., Holderness, M. *CABI International*. Wallingford, UK
- Erlich, H. A.** (1989) PCR Technology: Principles and applications for DNA amplifications. Vydání 1. 246 s. ISBN 0-93585-956-X.
- Fargier, E. a Manceau, C.** (2007) Pathogenicity assays restrict the *Xanthomonas campestris* species (Vauterin et al. 1995) into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* **56**, 805-818.
- Fargier, E., Fischer-Le Saux, M. a Manceau, C.** (2011) A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 156-65.
- Flaherty, J. E., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., Somodi, G. C. a Jackson, L. E.** (2000) Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. *Hort. Science* **35**, 882-884.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L. a Swings, J.** (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 733-739.
- Hayward, A. C. a Waterston, J. M.** (1964) *Xanthomonas vesicatoria*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *CABI International*, Wallingford, UK
- Hutchison, C. A.** (2007) DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* **35**, 6227-6237.

- Innis, M. A. a Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J.** (1990) PCR protocols: A guide to methods and applications. Vydání 1. 482 s. ISBN-13 978-0123721815 1.
- Ipser, J.** (2005) Základy genetiky. Vydání 1. 196 s. ISBN 8070447079.
- Jones, J. B., Pohronezny, K. L., Stall, R. E. a Jones J. P.** (1986) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology* **76**, 430-434.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Minsavage, G. V., Stall, R. E. a Schaad, N. W.** (2005) Bacterial Spot - worldwide distribution, importance and review, *Acta Hortic.* **695**, 27-34.
- Jones, J.B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. a Schaad, N. W.** (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 755-762.
- Jones, T.** (1991) Ethical decision making by individuals in organizations: An issue-contingent model. *Acad. Manage Rev.* **16**(2), 231-248.
- Kůdela, V., Novacky, A. a Fucikovsky, L.** (2002) Rostlinolékařská bakteriologie. Vydání 1. 347 s. ISBN 80-200-0899-3.
- Larkin, M. A, Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A, McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G.** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lo, Y. M. D., Chiu, R. W. K. a Chan, K. C. A.** (2006) Clinical applications of PCR. Vydání 2. 200 s. ISBN 1-58829-348-3.
- Ma, H., Shieh, K., Chen, G., Qiao, X. T. a Chuang, M.** (2006) Application of realtime polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Am. Sci.* **2**(3), 1-5.
- Maiden, M. C. J.** (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **60**, 561-588.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. a Spratt, B. G.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the



identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3140–3145.

**Nei, M. a Kumar, S.** (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Vydání 1. 339 s. ISBN 0-19-513585-7.

**Nelson, K. E. a Williams, C. M.** (2007) Infectious disease epidemiology. Vydání 2. 1189 s. ISBN 13-978-0-7637-2879-9.

**OEPP/EPPO** (1988) Data sheets on quarantine organisms No. 157, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **18**, 521-526.

**Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. a Stead, D.** (2009) Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **59**, 264–274.

**Pohronezny, K., Moss, M., Dankers, W. a Schenk, J.** (1990) Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. *Plant. Dis.* **74**, 800-805.

**Pusterla, N., Madigan, J. E. a Leutenegger, C. M.** (2006) Real-time polymerase chain reaction: A novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases. *J. Vet. Intern. Med.* **20**, 3–12.

**Sahin, F. a Miller, S. A.** (1996) Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of Bacterial Spot of Pepper. *Plant. Dis.* **80**, 773-778.

**Stall, R. E., Beaulieu, C., Egel, D., Hodge, N. C., Leite, R. P., Minsavage, G. V., Bouzar, H., Jones, J. B., Alvarez, A. M. a Benedict, A. A.** (1994) Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 47-53.

**Staňková, H. a Kizek, R.** Jak se čte genom? *Český rozhlas* [online]. 2007 [cit. 2013-02-02]. Dostupný z WWW: <[http://www.rozhlas.cz/leonardo/priroda/\\_zprava/343164](http://www.rozhlas.cz/leonardo/priroda/_zprava/343164)>.

**Sutic, D.** (1957) Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). In *Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd*, vol. 6, pp.1-65 (special edition). Beograd: Institute of Plant Protein. (English summary: *Rev. Appl. Mycol.* **36**, 734-735).

**Swings, J. G. a Civerolo, E. L.** (1993) *Xanthomonas*. Vydání 1. 399 s. ISBN 0-412-43420-2.

**Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. a Koptíková, J.** (2005) *Metody molekulární biologie*. Vydání 1. 192 s. ISBN 978-80-210-3841-7.

**Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. a Kumar, S.** (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, Evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731-2739.

**Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D., Niesbach-Klöggen, U., Patschkowski, T., Rückert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S., Vorhölter, F., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D. a Kaiser, O.** (2005) Insights into genome plasticity and 37 pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* **187**, 7254-7266.

**Urwin, R. a Maiden, M. C.** (2003) Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11**, 479–487.

**Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. a Swings, J.** (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 472-489.

**Vauterin, L., Swings, J., Kersters, K., Gillis, M., Mew, T. W., Schroth, M. N., Palleroni, N. J., Hildebrand, D. C., Stead, D. E., Civerolo, E. L., Hayward, A. C., Maraite, H., Stall, R. E. a Bradbury, J. F.** (1990) Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 312–316.

**Vorhölter, E. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Rückert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V., Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K. a Pühler, A.** (2007) The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J. Biotechnol.* **134**, 33 - 45.

**White, B. H.** (1993) PCR Protocols: Current methods and applications. Vydání 15. 392 s. ISBN 0-89603-244-2.

**Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. a Fargier, E.** (2008) A multilocus suquence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**, 366-377.

## 8 Tabulky

Tab.1: Seznam použitých bakteriálních kmenů *Xanthomonas* z papriky a rajčete

Sbírkové číslo	Současný název	Hostitel	Geografický původ
CCM 2101	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum frutescens</i> , paprika křovitá (chilli)	Maďarsko
CCM 2102	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Lycopersium aesculentum</i> , rajče	Maďarsko
BCCM/LMG 667	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Lycopersium aesculentum</i> , rajče	Nový Zéland
BCCM/LMG 922	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum frutescens</i> , paprika křovitá (chilli)	USA - Florida
BCCM/LMG 934	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Lycopersium aesculentum</i> , rajče	Brazílie
CFBP 1604	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum annuum</i> , paprika roční	Francie - Guadelope
CFBP 3274	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Lycopersium aesculentum</i> , rajče	Francie - Guadelope
CFBP 2537	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Lycopersium aesculentum</i> , rajče	Nový Zéland
BCCM/LMG 916	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , rajče	Nový Zéland
BCCM/LMG 918	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum frutescens</i> , paprika křovitá (chilli)	Indie
BCCM/LMG 919	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , rajče	Zimbabwe
BCCM/LMG 920	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , rajče	Itálie
BCCM/LMG 921	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum frutescens</i> , paprika křovitá (chilli)	USA - Long Island
BCCM/LMG 925	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , rajče	Maďarsko
BCCM/LMG 927	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , rajče	Zambie
BCCM/LMG 928	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum frutescens</i> , paprika křovitá (chilli)	USA
BCCM/LMG 909	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum</i> sp., paprika	Pobřeží slonoviny
BCCM/LMG 931	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , rajče	USA
BCCM/LMG 933	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum frutescens</i> , paprika křovitá (chilli)	Brazílie
BCCM/LMG 668	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Capsicum annuum</i> , paprika roční	Cookovy ostrovy

BCCM/LMG = Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, CFBP = Collection Francaise de Bactéries Phytopathogènes, CCM =

Česká sbírka mikroorganismů v Brně

Tab.2: Primery použité při PCR a sekvenování

Zkratka genu	PCR Primer			Sekvenační Primer	
	Název	Ta <sup>c</sup> (°C)	Sekvence (5'-3')	Název	Sekvence (5'-3')
<i>atpD</i>	P-X-ATPD-F <sup>b</sup> P-X-ATPD-R <sup>a</sup>	60	GGGCAAGATCGTTCAGAT GCTCTTGGTCGAGGTGAT	emiATPD1F	TTCAGATCATCGGCGCGGT
<i>gyrB</i>	emigyrB1F <sup>b</sup> emigyrB4R <sup>a</sup>	60	TGCGCGGCAAGATCCTCAAC GCGTTGTCTCGATGAAGTC	emigyrB2F	CGCTACCACCGCATCATCCT
<i>efp</i>	P-X-EFP-F <sup>b</sup> P-X-EFP-R <sup>a</sup>	62	TCATCACCGAGACCGAATA TCCTGGTTGACGMCAGC	emiefp1F	TCACCGAGACCGAATACG
<i>glnA</i>	P-X-GLNA-F <sup>b</sup> P-X-GLNA-R <sup>a</sup>	62	ATCMGGACAACAAGGTCTG GCGGTGMGGTCAGGTAG	emiglnA1F	GCTGATCAAGGACAACAAGG
<i>rpoD</i>	emirpo11F <sup>b</sup> emirpo13R <sup>a</sup>	62	ATGGCCAACGAACGTCCTGC AACTTGTAACCGCGACGGTATTCG	emirpo27F	GAAATCGCCATCGCCAAGC

<sup>a</sup> = R, reverse primer, <sup>b</sup> = F, forward primer, <sup>c</sup> = Ta, teplota annealingu pro PCR

## 9 Obrázky

Obr.1: Symptomy bakteriální skvrnitosti na plodu rajčete způsobené bakteriemi rodu *Xanthomonas*



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

Obr.2: Symptomy bakteriální skvrnitosti na listu rajčete infikovaného bakteriemi rodu *Xanthomonas*



<http://utahpests.usu.edu/admin/images/uploads/UtahPests/small-fruit-advisory/2010/06-16/bacterial-spot-tomato.jpg>

Obr.3: Symptomy bakteriální skvrnitosti na plodu papriky vyvolané bakteriemi rodu *Xanthomonas*



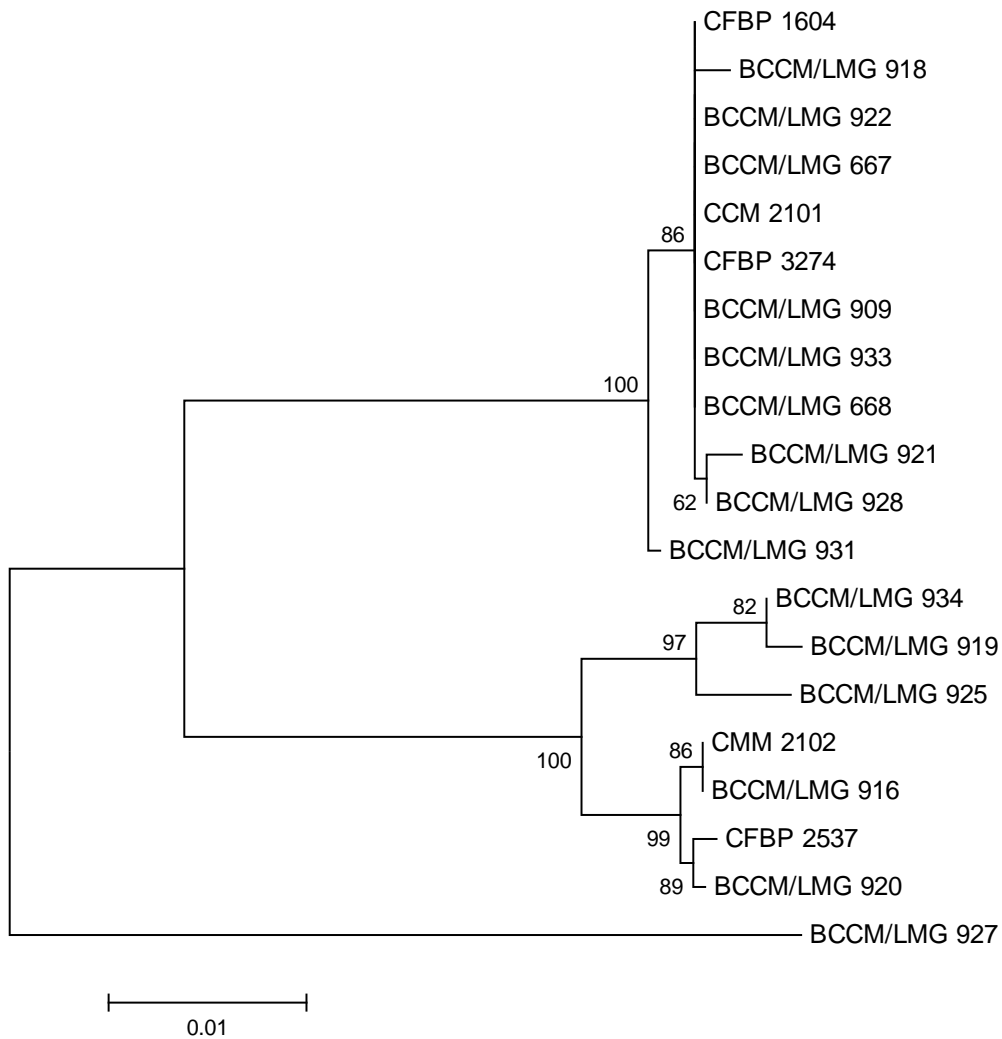
[http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/images/peppers/diseases/bacterial\\_spot/peppers\\_bacterial\\_spot2\\_zoom.jpg?rand=689900193](http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/images/peppers/diseases/bacterial_spot/peppers_bacterial_spot2_zoom.jpg?rand=689900193)

Obr.4: Symptomy bakteriální skvrnitosti na listech papriky infikovaných bakteriemi rodu *Xanthomonas*



<http://blogs.cce.cornell.edu/community-horticulture/files/2008/01/bacterial-spot-on-pepper.JPG>

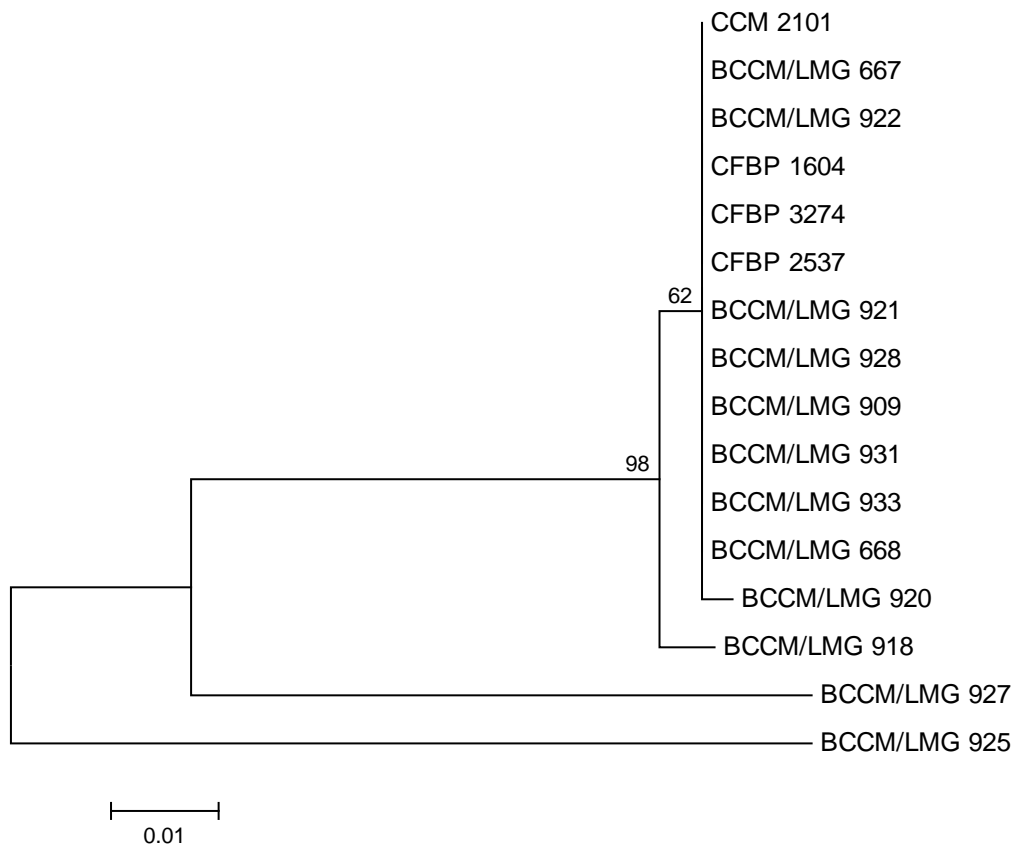
Obr.5: Výsledný NJ Dendrogram zřetěžených genů *atpD*, *rpoD*, *gyrB*, *glnA* a *efP*



Výsledný NJ dendrogram zobrazuje 20 zkoumaných sbírkových kmenů xanthomonád způsobujících bakteriální skvrnitost rajčete a papriky, které se dělí do dvou klastrů a jedné samostatné větve. Dendrogram je sestrojen na základě modelu TN93 (Tamura a Nei, 1993).



Obrázek 6: NJ Dendrogram genu *efP*



NJ dendrogram pro gen *efP* zobrazuje zkoumané sbírkové kmeny xanthomonád způsobujících bakteriální skvrnitost rajčete a papriky, které se dělí do dvou samostatných větví a jednoho velkého klastru. Dendrogram je sestaven na základě modelu TN93 (Tamura a Nei, 1993).