

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Manca PIRC

**RAZISKAVE BAKTERIJ, POVZROČITELJIC OŽIGA, NA  
RASTLINAH IZ DRUŽINE *Rosaceae***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**RESEARCH OF BACTERIA CAUSING BLIGHT ON PLANTS FROM  
FAMILY *Rosaceae***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2010

Doktorska disertacija predstavlja zaključek Univerzitetnega podiplomskega študija Biomedicine. Delo je bilo opravljeno v Ljubljani, na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 4.7.2007 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Univerzitetni podiplomski študij Biomedicine ter opravljanje doktorata znanosti s področja mikrobiologije. Za mentorja je bil imenovana prof. dr. Maja Ravnikar; za somentorico prof. dr. Maja Rupnik

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Gorazd Avguštin  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Članica: prof. dr. Maja Rupnik  
Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo in imunologijo
- Članica: prof. dr. Maja Ravnikar  
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo
- Članica: prof. dr. Marina Dermastia  
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 10.5.2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Doktorandka  
Manca Pirc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd  
 DK 581.2:579.64:582.734(043.3)=163.6  
 KG boleznih rastlin / rožnice / hrušev ožig / ožig / *Erwinia amylovora* / rod *Pseudomonas* / diagnostične metode / molekularne tehnike / PCR v realnem času / biološka raznovrstnost  
 AV PIRC, Manca, univ. dipl. biol.  
 SA RAVNIKAR, Maja (mentorica) / RUPNIK, Maja (somentorica)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij Biomedicine, področje mikrobiologije  
 LI 2010  
 IN RAZISKAVE BAKTERIJ, POVZROČITELJIC OŽIGA, NA RASTLINAH IZ DRUŽINE *Rosaceae*  
 TD Doktorska disertacija  
 OP XVI, 124 str., 31 pregl., 35 sl., 11 pril., 173 vir.  
 IJ sl  
 JI sl / en  
 AI Ožig na rastlinah iz družine rožnic lahko povzročajo bakterije *Erwinia amylovora* in tudi patogene bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Bolezenska znamenja, ki jih te bakterije povzročajo so lahko zelo podobna. Zaradi pomembnosti odkrivanja bakterije *Erwinia amylovora*, predvsem v rastlinah brez bolezenskih znamenj, v katerih se lahko bakterija širi na nova neokužena področja, smo v prvem delu razvili specifično in občutljivo verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR v realnem času), s tarčo na kromosomski DNA (gen *amsC* in regija ITS). Na ta način smo povečali zanesljivost ugotavljanja te bakterije v primerjavi z že obstoječimi molekularnimi metodami. Novo metodo smo uporabili tudi za ugotavljanje učinkovitosti pri odstranjevanju inhibitorjev s tremi različnimi ekstrakcijskimi metodami DNA. Občutljivost metode v vzorcih z izraženimi znamenji bolezni v kombinaciji z različnimi ekstrakcijskimi metodami je vsaj  $10^3$  celic/mL ( $\approx 4$  celice na reakcijo). Pri testiranju vzorcev na prikrito okužbo omogoča PCR v realnem času kvantifikacijo bakterije pred in po obogatitvi v splošnem in selektivnem gojišču s čimer ugotavljamo živost *Erwinia amylovora*, tudi kadar bakterij po obogatitvi na gojišču ne moremo izolirati v čisti kulturi. V drugem delu raziskave smo preučili raznolikost bakterij iz rodu *Pseudomonas*. Po pričakovanju smo izolirali največ bakterij iz vrste *Pseudomonas syringae*. Poleg nekaterih sevov iz drugih patovarjev smo večino uvrstili v patovar *syringae*. Sevi se med seboj razlikujejo po sposobnosti sinteze toksina siringomicina ali siringopeptina, patogenosti na različnih gostiteljih, restrikciji produkta pomnoževanja 16S rDNA z encimom *MnII* ter prstnem odtisu DNA z začetnimi oligonukleotidi BOX. Ugotovili smo, da je patogenost na preizkušanih gostiteljih odvisna od sinteze toksinov. Največjo raznolikost med sevi smo določili z analizo prstnih odtisov DNA pridobljenih z BOX-PCR, na podlagi katere smo lahko tudi seve s pozitivno in negativno preobčutljivostno reakcijo na tobaku razvrstili v različne skupine BOX.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
 DC 581.2:579.64:582.734(043.3)=163.6  
 CX plant diseases / rosaceous plants / fire blight / blight / *Erwinia amylovora* / genus *Pseudomonas* / diagnostic methods / molecular techniques / real – time PCR / biological diversity  
 AU PIRC, Manca  
 AA RAVNIKAR, Maja (supervisor) / RUPNIK, Maja (co-supervisor)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, University Postgraduate Study Programme in Biomedicine, Field: Microbiology  
 PY 2010  
 TI RESEARCH OF BACTERIA CAUSING BLIGHT ON PLANTS FROM FAMILY *Rosaceae*  
 DT Doctoral Dissertation  
 NO XVI, 124 p., 31 tab., 35 fig., 11 ann., 173 ref.  
 LA sl  
 AL sl / en  
 AB Blight on rosaceous plants can be caused by bacterial species *Erwinia amylovora* and phytopathogenic bacteria from genus *Pseudomonas*. Symptoms are often very similar. Since detection of *E. amylovora* is very important, particularly in symptomless plants where bacteria can spread to new pathogen-free areas, we developed a specific and sensitive TaqMan real-time PCR assays targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora* (*amsC* gene and ITS region) in the first part of this work. These assays increase the reliability of detection of *E. amylovora* strains in comparison to the already developed molecular methods. The assays were used for testing the efficiency of three different DNA extraction methods to remove plant-based PCR inhibitors. The real-time PCR assays reliably detected at least 10<sup>3</sup> cells/mL ( $\approx$  4 cells per reaction) of the pathogen from blighted woody plant material combined with various extraction methods. In testing symptomless samples, absolute quantification of *E. amylovora* before and after the enrichment in liquid media proved the viability of *E. amylovora* and its ability to multiply, also in cases when subsequent isolation in pure culture was unsuccessful. In the second part of this work the diversity of bacteria from genus *Pseudomonas* was studied. As expected, the majority of isolated strains were identified as *Pseudomonas syringae* most of which were identified as *syringae* pathovar. Strains differ in the production of syringomicin and syringopeptin, pathogenicity on different hosts, *restriction analysis* of the amplified *16S* rDNA with *MnII* enzyme and BOX fingerprinting. The pathogenicity on tested hosts in general correlated with toxin production. The greatest diversity of the strains was observed with BOX analysis where strains with positive and negative hypersensitive response on tobacco were clustered in different BOX groups.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 <b>Opredelitev problema</b>	1
1.2 <b>Cilji raziskave</b>	1
1.3 <b>Delovne hipoteze</b>	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 <b>Bakterije na rastlinah iz družine <i>Rosaceae</i></b>	3
2.2 <b>Bakterija <i>Erwinia amylovora</i> – povzročiteljica hruševega ožiga</b>	3
2.2.1 Opis vrste	3
2.2.2 Tipski sev	4
2.2.3 Homogenost vrste in sorodni sevi	4
2.2.4 Zgradba genoma	5
2.2.5 Zgradba regije ams in značilnosti regije ITS	6
2.3 <b>Bolezen hrušev ožig</b>	7
2.3.1 Bolezenska znamenja	7
2.3.2 Gostiteljske rastline	8
2.3.3 Latentne ali prikrite okužbe	8
2.3.4 Razvojni krog bakterije <i>E. amylovora</i>	9
2.3.5 Geografska razširjenost in povzročena škoda	10
2.3.6 Pojavljanje v Sloveniji	11
2.3.7 Možnosti nadzora	12
2.4 <b>Metode za ugotavljanje prisotnosti bakterije <i>E. amylovora</i></b>	12
2.4.1 Vzorčenje in ekstrakcija bakterij	13
2.4.2 Izolacija na gojiščih	13
2.4.3 Obogatitvena gojišča	13
2.4.4 Serološke metode (aglutinacija, IF, ELISA)	13

<b>2.4.5</b>	<b>Molekularno – biološke metode</b>	14
2.4.5.1	Osnove PCR v realnem času	14
2.4.5.2	Obstoječe metode PCR in PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti <i>E. amylovora</i>	16
2.4.6	Identifikacijski testi	16
2.4.7	Potrjevanje patogenosti	17
<b>2.5</b>	<b>Potek testiranja</b>	17
<b>2.6</b>	<b>Bakterije iz rodu <i>Pseudomonas</i></b>	18
2.6.1	Taksonomija	18
2.6.2	Patogenost <i>Pseudomonas syringae</i>	20
2.6.2.1	Rastlinski toksini	21
2.6.2.2	Ekstracelularni polisaharidi	22
2.6.2.3	Tvorba avksinov	22
2.6.2.4	Sinteza pektinolitičnih encimov	22
2.6.2.5	Tvorba kristalov	22
<b>2.7</b>	<b>Bolezni, ki jih povzročajo bakterije iz rodu <i>Pseudomonas</i></b>	23
2.7.1	Znamenja bolezni	23
2.7.2	Gostiteljske rastline	23
2.7.3	Geografska razširjenost, povzročena škoda ter pojavljanje v Sloveniji	23
2.7.4	Možnosti nadzora	23
<b>2.8</b>	<b>Identifikacija in ugotavljanje raznovrstnosti vrste <i>Pseudomonas syringae</i></b>	24
2.8.1	Sinteza toksinov	26
2.8.1.1	Test za sintezo siringomicina in siringopeptina	26
2.8.2	Testi patogenosti	26
2.8.3	Molekularno – biološke metode	27
2.8.3.1	Osnova analize z repetitivnim PCR (rep-PCR)	27
2.8.3.2	Uporaba metode rep-PCR in drugih repetitivnih PCR za ugotavljanje genetske raznolikosti <i>P. syringae</i>	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b> .....	30
<b>3.1</b>	<b>Razvoj diagnostične metode PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti bakterije <i>E. amylovora</i></b>	30
3.1.1	Material	30
3.1.1.1	Bakterije	30
3.1.1.2	Rastlinski material	30
3.1.1.3	Suspenzija bakterije <i>E. amylovora</i> v vodi	31
3.1.2	Oblikovanje začetnih oligonukleotidov in sond za PCR v realnem času	32
3.1.3	Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času in program pomnoževanja	32
3.1.4	Specifičnost metode PCR v realnem času	33
3.1.5	Določanje meje občutljivosti, učinkovitosti pomnoževanja in dinamičnega območja amplikonov	33

3.1.6	Vpliv gostiteljske rastline na pomnoževanje DNA <i>E. amylovora</i>	34
3.1.7	Primerjava različnih metod izolacije DNA na rastlinskih ekstraktih	34
3.1.8	Primerjava metode PCR v realnem času z metodo vgnezdene PCR	35
<b>3.2</b>	<b>Spremljanje koncentracije bakterije <i>E. amylovora</i> v obogatitvenih gojiščih</b>	<b>35</b>
3.2.1	Izolacija bakterije <i>E. amylovora</i> iz obogatenih vzorcev	36
3.2.2	Ugotavljanje vpliva zamrzovanja CCT obogatitev	36
<b>3.3</b>	<b>Raziskave raznovrstnosti bakterij iz rodu <i>Pseudomonas</i></b>	<b>37</b>
3.3.1	Rastlinski material	37
3.3.1.1	Lokacija vzorčenja rastlinskega materiala	38
3.3.2	Kontrolni sevi	39
3.3.3	Priprava rastlinskega ekstrakta in izolacija bakterij na gojiščih	40
3.3.4	Identifikacijski testi	41
3.3.4.1	Biokemijski testi	41
3.3.4.2	Analiza profila maščobnih kislin	42
3.3.5	Inhibicija rasti bakterije <i>E. amylovora</i>	42
3.3.6	Odpornost na baker	42
3.3.7	Test sinteze toksinov z indikatorsko glivo <i>Rhodotorula pilimanae</i>	42
3.3.8	Testi patogenosti	43
3.3.8.1	Test patogenosti na stročjem fižolu	43
3.3.8.2	Test patogenosti na plodovih hruške sorte Conference	45
3.3.8.3	Test patogenosti na listih hruške sorte Conference	46
3.3.9	Molekularne metode	48
3.3.9.1	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA (16S rDNA RFLP) z encimoma <i>RsaI</i> in <i>MnII</i>	48
3.3.9.2	Repetitivni PCR z BOX1A oligonukleotidnim začetnikom (BOX-PCR)	48
3.3.10	Obdelava podatkov	49
3.3.10.1	Uporaba Simpsonovega indeksa diverzitete za izračun diskriminatorne sposobnosti uporabljenih metod	50
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti bakterije <i>E. amylovora</i></b>	<b>51</b>
4.1.1	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond za PCR v realnem času	51
4.1.2	Specifičnost metode PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti <i>E. amylovora</i>	53
4.1.3	Določanje meje občutljivosti (LOD), učinkovitosti in dinamičnega območja amplikonov	56
4.1.4	Vpliv gostiteljske rastline na pomnoževanje DNA <i>E. amylovora</i>	57
4.1.5	Primerjava različnih metod izolacije DNA na rastlinskih ekstraktih	58
4.1.6	Primerjava metode PCR v realnem času z metodo vgnezdene PCR	60
4.1.7	Uporaba metode PCR v realnem času pri naravnih rastlinskih vzorcih	62
4.1.8	Uporabe metode PCR v realnem času kot identifikacijski test	63

<b>4.2</b>	<b>Uporaba metode PCR v realnem času za spremljanje koncentracije celic <i>E. amylovora</i> v obogatitvenih gojiščih</b>	63
4.2.1	Izolacija bakterije <i>E. amylovora</i> iz obogatenih vzorcev	64
4.2.2	Ugotavljanje vpliva zamrzovanja obogatitev CCT pri -20 °C	65
<b>4.3</b>	<b>Raziskave raznovrstnosti bakterij iz rodu <i>Pseudomonas</i></b>	66
4.3.1	Biokemijski testi in identifikacija bakterij	66
4.3.2	Analiza profila maščobnih kislin	68
4.3.3	Inhibicija rasti bakterije <i>E. amylovora</i>	69
4.3.4	Odpornost na baker	70
4.3.5	Test sinteze toksinov z indikatorsko glivo <i>Rhodotorula pilimanae</i>	71
4.3.6	Test patogenosti na stročjem fižolu	73
4.3.7	Test patogenosti na plodovih hruške sorte Conference	74
4.3.8	Test patogenosti na listih hruške sorte Conference	76
4.3.9	Molekularne metode	78
4.3.9.1	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA (16S rDNA RFLP) z encimoma <i>RsaI</i> in <i>MnII</i>	78
4.3.9.2	Repetitivni PCR z BOX1A oligonukleotidnim začetnikom (BOX-PCR)	80
4.3.9.3	Preverjanje povezav med testi	83
4.3.9.4	Uporaba Simpsonovega indeksa diverzitete za izračun diskriminatorne sposobnosti uporabljenih metod	89
4.3.9.5	Raznolikost sevov iz različnih gostiteljskih rastlin	89
4.3.9.6	Raznolikost sevov iz jablan	90
4.3.9.7	Raznolikost sevov v posameznih vzorcih	92
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEP .....</b>	<b>93</b>
<b>5.1</b>	<b>Razvoj metode PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti <i>E. amylovora</i></b>	<b>93</b>
<b>5.2</b>	<b>Uporaba metode PCR v realnem času za spremljanje koncentracije <i>E. amylovora</i> v obogatitvenih gojiščih</b>	<b>95</b>
<b>5.3</b>	<b>Raziskave bakterij iz rodu <i>Pseudomonas</i></b>	<b>97</b>
<b>5.4</b>	<b>Sklepi</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	<b>104</b>
<b>6.1</b>	<b>Povzetek</b>	<b>104</b>
<b>6.2</b>	<b>Summary</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>111</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Bakterijske vrste iz rodu <i>Pseudomonas</i> patogene na rastlinah in gobah (Höfte in de Vos, 2006) .....	19
Preglednica 2: Genomske vrste med patovarji <i>P. syringae</i> in sorodnimi vrstami (Gardan in sod., 1999) .....	20
Preglednica 3: Fitotoksini, ki jih tvorijo patovarji <i>P. syringae</i> .....	21
Preglednica 4: Značilnosti LOPAT pri fluorescentnih bakterij iz rodu <i>Pseudomonas</i> .....	25
Preglednica 5: Koncentracije suspenzij bakterije <i>E. amylovora</i> , ki smo jih uporabljali v uvedbi PCR v realnem času in pri spremljanju koncentracije bakterije v obogatitvah .....	32
Preglednica 6: Prikaz število in delež izolatov glede na gostiteljske rastline .....	37
Preglednica 7: Seznam kontrolnih bakterij, uporabljenih v študiji, leto izolacije, država izvora, gostiteljska rastlina ali drug izvor .....	40
Preglednica 8: Biokemijski testi in testi toksinov za razlikovanje <i>P. viridiflava</i> , <i>P. cichorii</i> in določenih patovarjev <i>P. syringae</i> .....	41
Preglednica 9: Legenda tabele v prilogi 10 .....	49
Preglednica 10: Začetni oligonukleotidi in sonda amplikona Ams in ITS .....	52
Preglednica 11: Rezultati PCR v realnem času z uporabo kemije TaqMan pri različnih sevih <i>E. amylovora</i> .....	54
Preglednica 12: Rezultati PCR v realnem času z uporabo TaqMan kemije pri različnih bakterijskih sevih in izolirani .....	55
Preglednica 13: Glavni parametri, ki opisujejo značilnosti pomnoževanja Ams, ITS in plazmidnega amplikona v treh reakcijah PCR v realnem času .....	56
Preglednica 14: Primerjava učinkovitosti pomnoževanja različnih amplikonov pri vzorcih z koncentracijo $10^5$ celic/mL in desetkratno redčitvijo pri različnih načinih izolacije .....	58
Preglednica 15: Primerjava rezultatov pomnoževanja treh amplikonov s PCR v realnem času in vgnezdene PCR pri določanju bakterije <i>E. amylovora</i> v ekstraktih različnih gostiteljskih rastlin z dodano bakterijo v koncentraciji $1,8 \times 10^4$ – $1,8 \times 10^2$ celic/mL .....	61
Preglednica 16: Izračunana povprečna vrednost Ct, standardna deviacija, koeficient variance med reakcijami PCR v realnem času med vsemi gostiteljskimi rastlinami .....	62
Preglednica 17: Razporeditev izbranih izolatov v skupine LOPAT .....	67

Preglednica 18: Rezultati testa tvorbe toksinov pri testiranih izolatih glede na skupine LOPAT .....	72
Preglednica 19: Rezultati testa patogenosti na fižolu glede na skupine LOPAT .....	74
Preglednica 20: Število pozitivnih, negativnih in sumljivih izolatov na TP na nezrelih plodovih hrušk Conference glede na skupino LOPAT.....	75
Preglednica 21: Število pozitivnih, negativnih in dvomljivih izolatov na TP na listih hruške Conference glede na skupino LOPAT .....	77
Preglednica 22: Dolžine restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA dobljenih z encimom <i>MnII</i> .....	78
Preglednica 23: Razporeditev izolatov v restrikcijske profile na podlagi restrikcijskih encimov <i>RsaI</i> in <i>MnII</i> glede na skupine LOPAT.....	79
Preglednica 24: Razporeditev izolatov v skupine BOX glede na skupine LOPAT .....	81
Preglednica 25: Primerjava rezultatov testa toksinov in testov patogenosti na plodovih hrušk, listih hrušk in stročjem fižolu .....	85
Preglednica 26: Rezultati testov patogenosti na plodovih hruške, listih hruške, stročjem fižolu in rezultati toksinov glede na restrikcijski tip .....	87
Preglednica 27: Primerjava razporeditve sevov z različnimi restrikcijskimi profili v skupine BOX .....	87
Preglednica 28: Primerjava rezultatov analize BOX s skupinami LOPAT, testom toksinov, testi patogenosti in analizo 16S rDNA RFLP.....	88
Preglednica 29: Diskriminatorni indeksi za uporabljene metode in za različne kombinacije metod.....	89
Preglednica 30: Primerjava rezultatov razvrstitve sevov v skupine LOPAT in BOX, testa toksinov, testov patogenosti, analize 16S rDNA RFLP pri sevih iz različnih gostiteljskih rastlin.....	90
Preglednica 31: Primerjava rezultatov analize BOX s skupinami LOPAT, testom toksinov, testi patogenosti in analizo 16S rDNA RFLP pri izolatih iz jablan.....	91

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Bakterija <i>Erwinia amylovora</i> posneta s elektronskim mikroskopom (avtor: R.N. Goodman, Univerza v Missouriju).....	4
Slika 2: Bolezenska znamenja hruševega ožiga. A) bolezenska znamenja na poganjkih hruške; B) bakterijski izcedek na poganjku jablane; C) bolezenska znamenja na panešplji; D) mumificiran plod .....	7
Slika 3: Razvojni krog bakterije <i>E. amylovora</i> (povzeto po: Norelli J., 2003) .....	9
Slika 4: Geografska razširjenost hruševega ožiga v svetu (European Plant Protection Organization, 2006).....	10
Slika 5: Razširjenost hruševega ožiga v Sloveniji (Knapič M., Fitosanitarna uprava RS, 2010).....	11
Slika 6: Princip delovanja SYBR Green in TaqMan kemije pri metodi PCR v realnem času (Walker, 2002; Introduction to..., 2004). .....	15
Slika 7: Shema testiranja za ugotavljanje prisotnosti in identifikacijo bakterije <i>E. amylovora</i> pri rastlinah z izraženimi bolezenskimi znamenji (European Plant Protection Organization, 2004) .....	17
Slika 8: Shema testiranja za ugotavljanje prisotnosti in identifikacijo bakterije <i>E. amylovora</i> pri rastlinah brez izraženimi bolezenskimi znamenji (European Plant Protection Organization, 2004) .....	18
Slika 9: Primerjava analize prstnih odtisov rep-PCR dveh sevov na podlagi denzitometričnih krivulj ali primerjave lis. S puščico so označene pozicije kjer je analiza na osnovi lis drugačna in zato je predlagana analiza takih profilov z analizo celotnih denzitometričnih krivulj (Rademaker in Bruijn, 1997).....	28
Slika 10: Izvedba poskusa za spremljanje koncentracije bakterije <i>E. amylovora</i> v obogatitvenih gojiščih CCT in King B ter izolacijo bakterije po obogatitvi.....	35
Slika 11: Izvedba poskusa za ugotavljanje vpliva zamrzovanja pri -20 °C obogatenih ekstraktov v gojišču CCT na uspešnost izolacije na ploščah CCT .....	36
Slika 12: Prikaz lokacij izoliranih izolatov iz vzorcev jablan, hrušk in kutin (zeleno=jablana, roza=hruška, vijolična=kutina) .....	38
Slika 13: Prikaz lokacij izoliranih izolatov iz ostalih gostiteljskih rastlin iz družine rožnic (rjava=panešplja, temno rjava=vrtnica, temno vijolična=japonska kutina, zelena=jerebika, svetlo zelena=glog, roza=ognjeni trn, oker=breskev, rdeča=sliva, vijolična=marelica) .....	39
Slika 14 : Izvedba testa patogenosti na stročjem fižolu.....	44

Slika 15: Test patogenosti na plodovih hruške Conference. A) Nekroza ob mestu vboda, B) Nekroza ob mestu vboda s klorotičnim prstanom, C) Brez bolezenskih znamenj na mestu vboda .....	45
Slika 16: Shematski prikaz amplikona Ams s poravnanimi nukleotidnimi zaporedji regije ams bakterije <i>E. amylovora</i> (okrajšava Ea) in regije cps bakterije <i>E. pyrifoliae</i> (okrajšava Ep) .....	52
Slika 17: Shematski prikaz amplikona ITS s poravnanimi nukleotidnimi zaporedji regije 16S – 23S rRNA ITS, ki vsebuje 139 bp dolgo dodatno zaporedje znotraj operona 16S - 23S rRNA ITS <i>E. amylovora</i> .....	52
Slika 18: Vpliv različnih ekstraktov na inhibicijo pomnoževanja v PCR v realnem času pri različnih gostiteljskih rastlinah in amplikonih (rdeča=ITS amplikon; modra=Ams amplikon; zelena=plazmid amplikon) .....	57
Slika 19: Vpliv koncentracije bakterije <i>E. amylovora</i> in načina izolacije na vrednosti Ct v reakciji PCR v realnem času pri analizi z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) in plazmidnim (črni stolpci) amplikonom. Intervali napake prikazujejo standardno deviacijo.....	59
Slika 20: Vpliv koncentracije bakterije <i>E. amylovora</i> in načina izolacije na verjetnost določanja v reakciji PCR v realnem času pri analizi z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) in plazmidnim (črni stolpci) amplikonom.....	60
Slika 21: Primerjava verjetnosti določanja bakterije <i>E. amylovora</i> s tremi amplikoni PCR v realnem času in vgnezdno PCR v ekstraktih različnih gostiteljskih rastlin z dodano bakterijo v koncentraciji $1,8 \times 10^4$ – $1,8 \times 10^2$ celic/mL .....	62
Slika 22: Koncentracija <i>E. amylovora</i> po obogatitvi pri latentnih vzorcih z dodano bakterijo <i>E. amylovora</i> ocenjeno z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) ter plazmidnim (črni stolpci) amplikonom. (a) v gojišču King B, (b) v gojišču CCT. Rezultati izolacije na CCT gojišču so napisani nad stolpci za posamezno tekoče gojišče. Oznaka vzorca označuje gostiteljske rastline iz katerih je bil vzorec sestavljen (J=jablana, H=hruška, C=panešplja, K=kutina, H=glog, N=nešplja) in pozitivna kontrola (PK, <i>E. amylovora</i> v PBS pufru) .....	64
Slika 23: Vpliv zamrzovanja (pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) obogatene suspenzije <i>E. amylovora</i> v gojišču CCT na število zrastle kolonij <i>E. amylovora</i> na ploščah CCT (od leve proti desni; 3 kratna – 7 kratna redčitev). a) pred zamrzovanjem, b) po zamrzovanju .....	65
Slika 24: Koncentracija <i>E. amylovora</i> po obogatitvi pri latentnih vzorcih z dodano bakterijo <i>E. amylovora</i> ocenjeno z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) ter plazmidnim (črni stolpci) amplikonom. Nad grafom je prikaz uspešnost izolacije bakterije <i>E. amylovora</i> pred zamrzovanjem obogatitev CCT pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter po njem. ....	66
Slika 25: Dendrogram 27 izolatov pri katerih smo izvedli analizo profila maščobnih kislin. Dendrogram je narejen s programskim paketom Bionumerics; za izdelavo matrike podobnosti je bila uporabljena evklidijska razdalja .....	69

Slika 26: Cona inhibicije rasti bakterije <i>E. amylovora</i> okrog seva NIB Z 539 nacepljenega v ravni črti.....	70
Slika 27: Odpornost sevov iz rodu <i>Pseudomonas</i> na baker (N = 90).....	71
Slika 28: Inhibicije rasti glive <i>R. pilimanae</i> (roza barva) kot posledica sinteze toksina pri testiranem sevu NIB Z 1281 nacepljenem v ravni črti.....	72
Slika 29 : Bolezenska znamenja na strokih fižola po 13 dneh inkubacije. A) NIB Z 554 (M399/03-2-1); B) D399/09 B2; C) D461/03 C9; D) NIB Z 689 (NCPPB 2684 iz <i>Phaseolus vulgaris</i> ) .....	73
Slika 30 : Graf ANOVA izračunane patogenosti (vrednosti nad grafom) pozitivnih sevov pri TP na plodovih hruške Conference glede na gostiteljske rastline. V oklepaju: število pozitivnih sevov / število analiziranih sevov .....	76
Slika 31 : Graf ANOVA izračunane patogenosti (vrednosti nad grafom) pozitivnih sevov pri TP na listih hruške Conference glede na gostiteljske rastline .....	77
Slika 32: Dendrogram primerjave prstnih odtisov DNA kontrolnih bakterij dobljenih z BOX-PCR. Dendrogram je narejen s programskim paketom Bionumerics; za izdelavo matrike podobnosti je bila uporabljena Pearsonova korelacija .....	82
Slika 33: Geografska razpršenost izolatov, ki so bili razvrščeni v 6 največjih skupin BOX. Barva legenda: skupina BOX 3 = rumena, skupina BOX 4 = temno zelena, skupina BOX 6 = rdeča, skupina BOX 8 = roza, skupina BOX 10 = svetlo modra, skupina BOX 19 = temno modra.....	83
Slika 34 : Levo) 2-D razsevni grafikon primerjave izračunane patogenosti pri izolatih na testu patogenosti na plodovih in listih hruške. Barve prikazujejo rezultate testa toksinov; Desno) Kontingenčna tabela rezultatov testa patogenosti na plodovih in listih hrušk (0 – negativni, 1 – pozitivni, 2 – sumljivi) .....	84
Slika 35 : 3-D razsevni grafikon; X=Test toksinov; Y= TP plodovi hruške in Y= TP listi hruške. Legenda obarvanosti; Toksin pozitivni (rdeče), toksin negativni (zeleno), toksin inhibirajoči (violično).....	86

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA 1 : Sestava gojišč uporabljenih v raziskavi
- PRILOGA 2 : Priprava reakcijskih mešanic za polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA ter pogoji pomnoževanja v reakciji PCR
- PRILOGA 3: Dendrogram primerjave prstnih odtisov DNA patogenih bakterij rodi *Pseudomonas* in kontrolnih bakterij, dobljenih z BOX-PCR. Dendrogram je narejen s programskim paketom Bionumerics; za izdelavo matrike podobnosti je bila uporabljena Pearsonova korelacija
- PRILOGA 4: Program KingFisher mL sistema za izolacijo nukleinskih kislin
- PRILOGA 5: Rezultati PCR v realnem času pri pomnoževanju suspenzije *E. amylovora* v vodi v treh ločenih reakcijah
- PRILOGA 6: Rezultati reakcij PCR v realnem času pri pomnoževanju ekstraktov z dodano suspenzije *E. amylovora* v koncentraciji od  $1,8 \times 10^5$  –  $1,8 \times 10^2$  celic/mL pri različnih načinih izolacije DNA
- PRILOGA 7: Rezultati reakcij PCR v realnem času pri pomnoževanju ekstraktov iz različnih gostiteljskih rastlin, z dodano suspenzijo *E. amylovora* v koncentraciji  $1,8 \times 10^4$  –  $1,8 \times 10^2$  celic/mL. Vključeni so tudi rezultati pomnoževanja ekstraktov brez dodane bakterije *E. amylovora*.
- PRILOGA 8: Povprečne vrednosti Ct vzorcev pred obogatitvijo v gojišču King B in CCT pri amplikonu Ams, ITS in plazmidnem amplikonu
- PRILOGA 9: Koncentracija bakterije *E. amylovora* po obogatitvi v CCT in King B gojišču, kvantificirana pa podlagi rezultatov PCR v realnem času. Prikazana je tudi uspešnost izolacije bakterije *E. amylovora* iz obogatitev na ploščah CCT
- PRILOGA 10: Rezultati analiz izoliranih in kontrolnih bakterij uporabljeni v študiji diverzitete bakterij rodu *Pseudomonas*
- PRILOGA 11: *In silico* analiza restrikcije pomnožene 16S rDNA z encimoma *RsaI* in *MnII* pri različnih bakterijah rodu *Pseudomonas*

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. Amplified fragment length polymorphism)
ANOVA	analiza variance
BBS	rjava bakterijska pegavost (angl. bacterial brown spot)
BCCM/LMG	Zbirka mikroorganizmov: Belgian Co-Ordinated Collections Of Micro-Organisms, Belgija
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOX	154 bp ponavljajoče sekvence razporejene na različnih lokacijah v genomu bakterije
bp	bazni par
BSBP	bakterijski ožig poganjkov pri hruškah (angl. bacterial shoot blight of pear)
CFBP	Zbirka mikroorganizmov: Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes, Francija
cfu	Enota, ki tvori kolonijo (angl. colony forming unit)
Ct	cikel reakcije PCR v realnem času, kjer fluorescenca preseže nastavljeni prag (treshold cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
ELISA	encimski imunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EPPO	Evropska organizacija za varstvo rastlin (angl. European and Mediterranean Plant Protection Organization)
ERIC	124 - 127 bp ponavljajoče sekvence razporejene na različnih lokacijah v genomu bakterije (angl. enterobacterial repetitive intergenic consensus)
EtBr	etidijev bromid, interkalirajoče barvilo, uporabljeno za vizuolizacijo dvoverižnih nukleinskih kislin pod UV svetlobo
FAM	6-karboksi-fluorescein
FURS	Fitosanitarna uprava Republike Slovenije
GSPB	Zbirka mikroorganizmov: Göttinger Collection of Phytopathogenic Bacteria, Nemčija
HR	Hipersenzitivna reakcija na tobaku
ICMP	Zbirka mikroorganizmov: International Collection of Microorganisms from Plants, Nova Zelandija
IF	test imunofluorescence
ITS	angl. internal transcribed spacer
IVIA	Zbirka mikroorganizmov: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Španija

LOD	Meja občutljivosti metode (angl. limit of detection)
LOPAT	skupina testov za identifikacijo fluorescentnih bakterij rodu <i>Pseudomonas</i>
MLVA	hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tendemskih ponovitev (Multiple Locus variable number tandem repeat analysis)
NCPPB	Zbirka mikroorganizmov: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Velika Britanija
OD	Optična gostota (angl. Optical density)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. Pulsed field gel electrophoresis)
rDNA	gen za ribosomsko RNA
REP	35-40 bp ponavljajoče sekvence razporejene na različnih lokacijah v genomu bakterije (angl. repetitive extragenic palindromic)
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism)
qPCR	PCR v realnem času (real-time PCR)
SybrGreen	Barvilo, ki fluorescira ob vezavi na dvoverižno verigo DNA
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin
T <sub>m</sub>	Temperatura tališča dvoverižne DNA
TP	test patogenosti
UPGMA	Metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. Unweighted pair group method with arithmetic mean)
VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (ang. a variable number tandem repeats)
VBNC	žive celice, nezmožne rasti na gojišču (angl. viable but non-culturable)



## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Bakterijski ožig na rastlinah iz družine rožnic lahko povzroča bakterija *Erwinia amylovora* (*E. amylovora*) ali patogene bakterije iz rodu *Pseudomonas*. *E. amylovora* je bakterija, ki povzroča bolezen hrušev ožig s hudimi okoljskimi, ekonomskimi in sociološkimi posledicami. Po prvem odkritju v letu 2001, je v letu 2003 prišlo do izbruha te bolezni v Sloveniji. Zaradi obsežne gospodarske škode, ki jo bakterija povzroča je uvrščena na seznam II.A.II. To pomeni, da moramo po Evropski zakonodaji hrušev ožig nadzorovati. Nadzor vključuje vizualni pregled in opazovanje rastlin, odvzem vzorcev s sumljivimi znamenji bolezni in vzorcev v matičnih nasadih in drevesnicah za testiranje prikrite (latentne) okužbe v laboratoriju. Testiranje prikrite okužbe je zelo pomembno, saj lahko na ta način preprečimo prenos iz okuženega področja na neokuženo ter preventivno pregledujemo nasade. Ker pa je v teh vzorcih koncentracija bakterij zelo nizka je tudi diagnostika zelo zahtevna, zato je potreben razvoj občutljivih metod, s katerimi lahko bakterijo odkrijemo.

Znamenja bolezni, ki jih povzroča bakterija *Erwinia amylovora* so zelo podobna tistim, ki jih povzročajo patogene bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Najpomembnejša vrsta iz tega rodu, ki povzroča bolezen pri rastlinah je *Pseudomonas syringae*. Vrsta je na podlagi okuževanja različnih gostiteljskih rastlin razdeljena v več kot 50 patovarjev, ki pa jih je s standardnimi bakterijskimi taksonomskimi testi težko razlikovati. Kateri patovarji te vrste in tudi katere druge vrste bakterij iz rodu *Pseudomonas* so v Sloveniji prisotne je še slabo raziskano. Poleg tega je malo znanega tudi o biološki raznolikosti bakterij iz tega rodu, ki so prisotne na sadnem drevju.

### 1.2 CILJI RAZISKAVE

Za določanje bakterije *E. amylovora* so bile že v uporabi molekularne metode verižne reakcije s polimerazo (PCR) s tarčo na kromosomski DNA in na plazmidu pEA29. Razvite metode s tarčo na kromosomski DNA so bile premalo specifične ali občutljive. Metode s tarčo na plazmidu pEA29 pa z odkritjem virulentnih sevov brez tega plazmida lahko dajo lažno negativen rezultat. Zato smo želeli z razvojem metode PCR v realnem času na kromosomski DNA bakterije *E. amylovora* razviti specifično metodo, s katero bi ugotovili prisotnost vseh sevov *E. amylovora* ne glede na plazmidni profil in ki bi bila hitra in dovolj občutljiva za odkrivanje nizkega števila bakterij. To je pomembno pri ugotavljanju bakterij v rastlinskem materialu z nizko koncentracijo bakterij.

V seriji poskusov smo želeli preveriti občutljivost razvitega testa PCR v realnem času na bakterijskih suspenzijah in v kombinaciji z različnimi postopki izolacije nukleinskih kislin ter primerjati novo razvito metodo z uveljavljeno metodo vgnedene PCR. Preverili smo specifičnost metode s testiranjem velikega števila izolatov bakterije *E. amylovora* z različnimi lastnostmi in iz različnih geografskih območjih ter z nekaterimi ostalimi sorodnimi bakterijami oziroma bakterijami, ki se pojavljajo na istih gostiteljskih rastlinah.

Metodo smo uporabili tudi za kvantitativno sledenje števila bakterij med rastjo v obogatitvenih gojiščih z namenom ugotavljanja njene živosti in primerjali rezultate z izolacijo na gojiščih.

V zadnjem času poročajo o povečani prisotnosti in škodi, ki jo povzročajo patogene bakterije iz rodu *Pseudomonas* na sadnem drevju v Sloveniji pa tudi v Avstriji, Italiji in na Balkanu. Želeli smo ugotoviti kakšno je stanje teh bakterij pri nas: katere patogene bakterije iz rodu *Pseudomonas* so prisotne na rastlinah iz družine *Rosaceae* in kakšna je njihova biološka raznolikost. Želeli smo tudi ugotoviti katere metode bi bile primerne za iskanje razlik med izoliranimi sevi iz rodu *Pseudomonas*.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

#### **Hipoteza 1**

Z razvojem PCR v realnem času bomo lahko določili vse znane izolate bakterije *E. amylovora* ne glede na plazmidni profil, metoda bo učinkovita pri testiranju latentnih okužb, zato bomo skrajšali in poenostavili diagnostiko teh vzorcev. Možnost kvantitativne analize s PCR v realnem času pa bo dala dodatne informacije o razmnoževanju te bakterije v obogatitvenih gojiščih.

#### **Hipoteza 2**

Predvidevamo, da bomo z uporabljenimi metodami ugotovili, da je raznolikost patogenih bakterij iz rodu *Pseudomonas* pri rastlinah iz družine *Rosaceae* v Sloveniji velika.

#### **Hipoteza 3**

Z dovolj velikim številom različnih metod za razlikovanje bomo uspeli razlikovati izolate iz rodu *Pseudomonas* in ugotoviti katere metode so najprimernejše za karakterizacijo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BAKTERIJE NA RASTLINAH IZ DRUŽINE *ROSACEAE*

Najpomembnejša patogena bakterija, ki okužuje gostiteljske rastline iz družine *Rosaceae*, predvsem iz poddružine *Maloideae*, je bakterija *Erwinia amylovora*. Bolezen, ki jo povzroča, hrušev ožig, je poznana že več kot 200 let, medtem ko so bakterijo povzročiteljico identificirali pred več kot 100 let. Kljub velikem napredku v poznavanju epidemiologije, genetike in fiziologije, bakterija še vedno povzroča veliko ekonomsko škodo po vsem svetu. Za kontrolo širjenja je bakterija uvrščena na seznam karantenskih organizmov II.A.II.

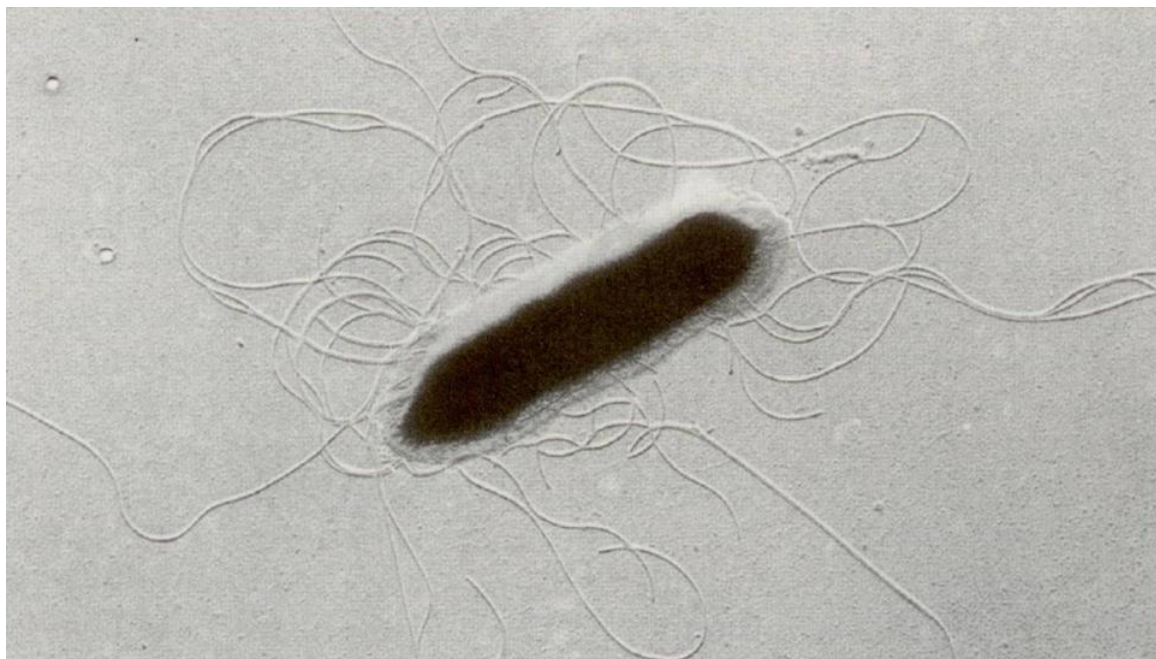
Patogene bakterije rodu *Pseudomonas* niso na karantenskih listah, ker so izredno razširjene in je njihovo izkoreninjanje praktično nemogoče. Izjema je le bakterija *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* na rastlinah *Prunus persica* in *Prunus persica* var. *nectarina* za saditev. Bakterije rodu *Pseudomonas* lahko povzročajo manjšo škodo, ker zmanjšajo kvaliteto plodov, lahko pa v povezavi z zmrzaljo povzročijo tudi odpadanje cvetov in s tem občutno zmanjšanje pridelka ali oslabijo drevesa, s povzročanjem razjed na vejah in deblih. Najpomembnejša patogena bakterija na rastlinah iz tega rodu je vrsta *Pseudomonas syringae*. Patovar *syringae* lahko med vsemi patovarji okužuje največji spekter gostiteljskih rastlin in ga najdemo na pečkarih, koščičarjih, okrasnih rastlinah, fižolu, travah, žitu itd. Na jablanah je lahko prisoten tudi patovar *papulans*, na koščičarjih pa še patovar *morsprunorum* ter na breskvah patovar *persicae*.

### 2.2 BAKTERIJA *Erwinia amylovora* – POVZROČITELJICA HRUŠEVEGA OŽIGA

#### 2.2.1 Opis vrste

Bakterijo *Erwinia amylovora* uvrščamo v družino *Enterobacteriaceae*. Je gram negativna bakterija velikosti 0,3 – 1-3  $\mu\text{m}$  in jo obdajajo peritrihni bički (slika 1).

Prva bolezenska znamenja so opazili že leta 1780 v državi New York, vendar pa je uspelo Thomas J. Burrillu bakterijo izolirati šele leta 1882. Poimenoval jo je *Micrococcus amylovorus*. Od takrat je bila bakterija uvrščena v različne rodove; Trevisan (1889) jo je uvrstil v rod *Bacillus*, Chester (1901) v rod *Bacterium*, zadnje določitev je leta 1920 napravil Winslow in bakterijo uvrstil v rod *Erwinia* in jo poimenoval *Erwinia amylovora* (Martinec in Kocur, 1964).



Slika 1: Bakterija *Erwinia amylovora* posneta s elektronskim mikroskopom (avtor: R.N. Goodman, Univerza v Missouriju)

Figure 1: Bacteria *Erwinia amylovora* scanned with the electron microscope (author: R.N. Goodman, University of Missouri)

### 2.2.2 Tipski sev

Tipski sev je S59/5. Izoliral ga je R.A. Lelliott leta 1959 iz hruške v Veliki Britaniji. Shranjen je v različnih zbirkah mikroorganizmov pod številkami NCPPB 683, ATCC 15580, CCM 1114, ICMP 1540, CFBP 1232, LMG 2024, NIB Z 3.

### 2.2.3 Homogenost vrste in sorodni sevi

Bakterija *E. amylovora* velja za homogeno vrsto, predvsem v primerjavi z vrsto *Pseudomonas syringae* ali *Xanthomonas campestris*. Obstajata pa dve podskupini, ki sta vezani na gostiteljske rastline, ki jih okužujeta. V eno skupino sodijo sevi, ki okužujejo gostiteljske rastline iz poddružine *Maloideae* (skupina *Maloidea*) ter skupina, ki okužujejo gostiteljske rastline iz poddružine *Rosoideae* (skupina *Rubus*). Seve lahko ločimo na podlagi analize maščobnih kislin (van der Zwet in Wells, 1993), z repetitivnimi PCR (McManus in Jones, 1995), z analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) *hrp* genov (Laby in Beer, 1992) ter nekaterimi drugimi metodami. Z napredkom molekularnih tehnik so razvili metode, s katerimi je mogoče razlikovali različne skupine tudi znotraj zelo podobnih sevov skupine *Maloideae*. Mnogokrat uporabljena metoda za ugotavljanje iz katere geografske lokacije so se širili novi izbruhi okužbe je metoda gelske elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) (Zhang in sod., 1996). Na podlagi

te metode so nastale tudi hipoteze o tem, kako se je od leta 1982 bakterija širila v vzhodnem Mediteranu in Balkanu (Bazzi in sod., 1999). V zadnjem času se za razlikovanje med sevi uvaja metoda VNTR (angl. variable number of tandem repeat) oziroma MLVA (angl. multiple-locus VNTR analysis).

Posebni status imajo sevi iz rodu *Erwinia* iz Japonskega otoka Hokkaido. Seve, ki so povzročali ožig poganjkov na japonskih hruškah (*Pyrus ussuriensis* Maxim) so opazili že pred letom 1970 (Tanii in sod., 1981). Glede na njihove bakteriološke značilnosti in ker sevi niso povzročali bolezenskih znamenj na drugih gostiteljskih rastlinah razen na hruškah so predlagali ime bakterije *E. amylovora* pv. *pyri* (Tanii in sod., 1983) in kot ime bolezni predlagali bakterijski ožig poganjkov na hruškah (angl. bacterial shoot blight of pear – BSBP), vendar je bilo ime v Names of Plant Pathogenic Bacteria 1864-1995 (Young in sod., 1996) zavrženo. Tudi Beer in sod. (1996) in Kim in sod. (1996) so zaključili, da na podlagi tradicionalnih bakterioloških testov, analize s sistemom BIOLOG™ in hibridizacijo genomske DNA regije *hrp* ni dovolj argumentov, da bi sevi sodili v novo vrsto. Mizuno in sod. (2000) so predlagali, da se na podlagi 9 fizioloških in biokemijskih značilnosti vrsto *E. amylovora* razdeli v 4 biovarje, kjer v biovar 1 sodi sev NCBPP 311 izoliran iz hruške v Kanadi, v biovar 2 vsi ostali sevi *E. amylovora* iz skupine *Maloidea*, v biovar 3 sevi iz rastlin iz rodu *Rubus* in v biovar 4 sevi BSBP. DNA-DNA hibridizacija med sevi BSBP in *E. amylovora* je pokazala 55%-81% homologijo (Mizuno sod., 2000). Z odkritjem bakterije, ki povzroča nekroze na azijskih hruškah (*Pyrus pyrifolia* cvs Shingo and Mansamgil) v Koreji ter njeno klasifikacijo v novo vrsto *E. pyrifoliae* (Kim in sod., 1999; Rhim in sod., 1999), so se ponudile nove priložnosti za primerjavo s sevi BSBP. Tako so Kim in sod. (2001) ugotovili, da so na podlagi nukleotidnega zaporedja sintaznega gena za eksopolisaharid ter tudi ostalih molekularnih značilnosti ti sevi bolj podobni sevom *E. pyrifoliae* kot *E. amylovora*. Do enakih zaključkov so prišli tudi Maxson – Stein in sod. (2003), Jock in Geider (2004) ter Matsuura in sod. (2007) in tako taksonomska razvrstitev sevov BSBP še do danes ni razrešena.

V Španiji so v letih od 1999 – 2001 izolirali bakterije, ki povzročajo nekrozo cvetov na hruškah (Roselló in sod., 2002). Predlagano ime za te seve je *E. pyrifolinigrans*. Pri pomnoževanju z različnimi reakcijami PCR so ugotovili, da dobijo specifičen produkt s PCR, ki pomnožuje del na 23S rRNA (Maes in sod., 1996), nespecifičen produkt z reakcijo PCR s tarčo na plazmidu pEA29 (Bereswill in sod., 1992), med tem ko pri uporabi vgnezdene reakcije PCR (Llop in sod., 2000) s tarčo na plazmidu pEA29 in PCR (Guilford in sod., 1996) s tarčo na kromosomu niso dobili nobenega produkta (Roselló 2002).

#### 2.2.4 Zgradba genoma

Nukleotidno zaporedje celotnega genoma bakterije *E. amylovora* je na voljo pri sevu Ea273 (ATCC 49946; Sebahia in sod., 2010), ki je bil izoliran iz jablane leta 1971 v New

Yorku ter pri sevu CFPB 1430 (Smits in sod., 2010) izoliranem iz gloga leta 1972 v Franciji. Pri primerjavi nukleotidnega zaporedja celotnega genoma obeh sevov so ugotovili, da sta skoraj identična (>99,99%; Smits in sod., 2010). Velikost genoma je približno 3,8 Mb in je v primerjavi z ostalimi genomi enterobakterij, katerih velikost je 4,5 Mb – 5,5 Mb, razmeroma majhen. Poleg kromosomske DNA pa ima bakterija tudi plazmidno DNA. Pri večini sevov bakterije *E. amylovora* je prisoten plazmid pEA29. Na podlagi nukleotidnega zaporedja so ugotovili, da ta plazmid ne vsebuje genov za prenos in mobilizacijo. Poleg tega je znano, da je plazmid tudi zelo stabilen in so tako do nedavnega mislili, da je prisoten v vseh v naravi prisotnih virulentnih sevih bakterije *E. amylovora*. Domnevna vloga plazmida je, da ima vlogo pri virulenci in fitnessu bakterije, saj so bili sevi, ki so izgubili plazmid, manj virulentni (zakasnela in manj izrazita bolezenska znamenja). Llop in sod. (2006) pa so v Španiji izolirali seve bakterije *E. amylovora*, ki so bile brez plazmida pEA29, vendar so bili prav tako virulentni kakor sevi s plazmidom. Poleg tega so pri sevih *E. amylovora* lahko prisotni tudi drugi plazmidi, ki so si po velikosti različni.

### 2.2.5 Zgradba regije ams in značilnosti regije ITS

Sinteza kapsularnega polisaharida amilovorana je edinstvena za bakterijo *E. amylovora*. Zaradi zapletene zgradbe sladkorjev regulira sintezo tega polisaharida veliko število genov. Večina strukturnih genov je locirana na približno 17 kb dolgi regiji ams (Bugert in Geider, 1995). Amilovorana je glavna komponenta bakterijskega izcedka in se tvori med okužbo v rastlini. Potreben je za razmnoževanje bakterije in za virulenco (Steinberger in Beer, 1988; Bellemann in Geider, 1992; Menggad in Laurent, 1998), kar potrjujejo tudi analize, da so mutante brez amilovorana nepatogene (Bugert and Geider, 1995). Podoben ekstracelularni polisaharid sintetizira tudi bakterija *Erwinia pyrifoliae* in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*.

Ribosomska intergenska regija 16S-23S (ITS) je zaradi svoje variabilnosti v dolžini in sekvenci tudi znotraj zelo sorodnih bakterij (Gurtler & Stanisich, 1996) pogosto tarča za razvoj molekularnih metod za specifično ugotavljanje prisotnosti bakterij (Li in DeBoer, 1995; Botha in sod., 2001; Pastrik in sod., 2002). Na podlagi rezultatov študije McGhee in sod. (2002) naj bi imela bakterija *E. amylovora* rRNA gene organizirane v 7 operonih. Dolžina regije ITS variira od 367 bp – 722 bp in pri primerjavi vseh sekvenciranih regij ITS se je pokazalo, da imajo zelo podobno strukturo. Sestavljena je iz treh ohranjenih regij (C1, C2, C3), regije, ki kodira gene tRNA (tRNA) in variabilne regije (V). Nekateri operoni imajo tudi dodatno regijo dolgo 139 bp (O). Shema regije ITS je prikazana na sliki 17. Dodatna regija dolga 139 bp je prisotna samo pri sevih *E. amylovora* iz *Maloideae* skupine, ne pa tudi pri *E. amylovora* iz skupine, ki okužujejo *Rubus* ali pa *E. pyrifoliae* (McGhee in sod., 2002).

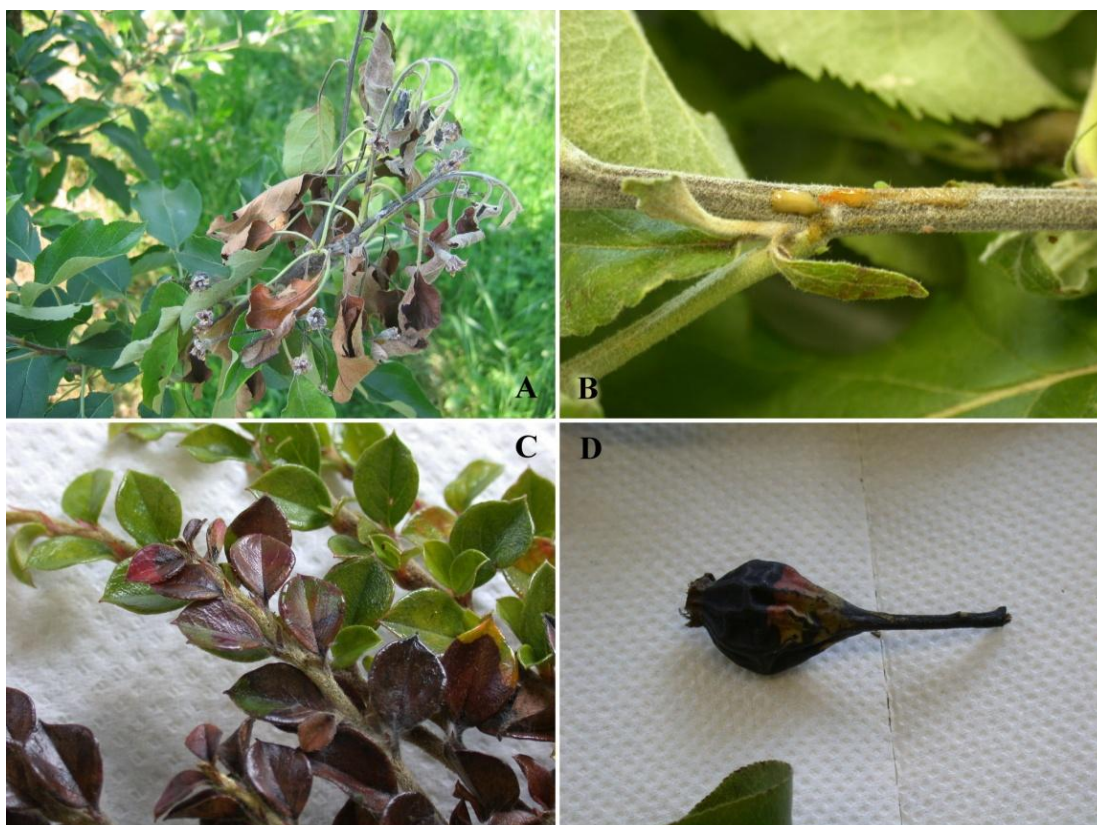


## 2.3 BOLEZEN HRUŠEV OŽIG

### 2.3.1 Bolezenska znamenja

Bakterija povzroča bolezenska znamenja na vseh organih drevesa: cvetovih, listih, poganjkih, vejah ter plodovih. Glede na prizadet organ lahko tudi govorimo o t.i ožigu cvetov, poganjkov, listov, plodov, debla ali vej.

Kakor je opisal Janse (2005) je ožig cvetov posledica primarne cvetne okužbe in se pokaže kot venenje in propad cvetnih šopov, ki postanejo črni in ne odpadejo z drevesa. Pri ožigu poganjkov le ti ovenijo in odmrejo. Na koncu se velikokrat upognejo v obliki značilne t.i. pastirske palice (slika 2-A). Na poganjku včasih opazimo bež ali oranžen lepljivi izcedek (slika 2-B). Pri listih se bolezenska znamenja v obliki nekroz pokažejo najprej na robu listov ali pa na spodnjem delu lista ob glavni listni žili. Pri plodovih se lahko pojavijo temni steklasti madeži, lahko počrnijo celotni plodovi in se tudi nagubajo ter ostanejo na vejah (mumificirani plodovi; slika 2-D). Na vejah ali na deblu se pod površino lahko pojavijo rjava ali oranžna področja. Razjede na lubju, kjer bakterije navadno prezimijo imajo rahlo voden videz in so nekoliko temnejše barve kot okoliško zdravo tkivo.



Slika 2 : Bolezenska znamenja hruševega ožiga. A) bolezenska znamenja na poganjkih hruške; B) bakterijski izcedek na poganjku jablane; C) bolezenska znamenja na panešplji; D) mumificiran plod

Figure 2 : Symptoms of fireblight. A) symptoms on pear shoot; B) bacterial exudat on apple shoot; C) symptoms on cotoneaster; D) mummy outlook of fruit

Pri panešplji, glogu, ognjenemu trnu, jrebiki ter drugih okrasnih rastlinah pogosto ni značilnih znamenj ožiga, opazimo le nekrozo ali odpadanje cvetov in neznačilno rjavenje listov. Bakterija se lahko v prikriti (latentni) obliki pojavlja tudi pri ostalih gostiteljskih rastlinah.

### 2.3.2 Gostiteljske rastline

Bakterija lahko povzroča bolezenska znamenja na preko 200 rastlinskih vrstah iz 40 rodov. Rastline iz družine *Rosaceae* so razdeljene na 4 poddružine; *Maloideae*, *Rosoideae*, *Prunoideae*, *Spiraeoideae*. Največjo škodo bakterija povzroča pri gostiteljskih rastlinah iz poddružine *Maloideae*, kamor uvrščamo jabolane, hruške, kutine nešplja in japonska nešplja. Od okrasnih rastlin jo najpogosteje najdemo na japonski kutini, glogu, ognjenemu trnu, panešplji, fotiniji in od gozdnih rastlin predvsem na jrebiki in skoršu. Bakterija prizadene tudi rastline iz poddružine *Rosoideae* in jo tako najdemo na malinah in robidah. Bakterijo naj bi izolirali tudi iz japonskega šipka (Vanneste in sod., 2001). V Združenih državah Amerike pa so imeli intenzivnejši izbruh bolezni na nasadu japonskih sliv (*Prunus salicina*) iz poddružine *Prunoideae* (Mohan in Thomson, 1996).

Na splošno velja trditev, da sevi *E. amylovora* niso specifični za posameznega gostitelja. To pomeni, da so sevi iz jablan prav tako patogeni na hruškah ali ostalih rastlinah iz poddružine *Maloideae* ali *Prunoideae* (Mohan in Thomson, 1996). Edina izjema so sevi, ki okužujejo rastline iz poddružine *Rosoideae*, ki niso patogeni na hruškah in jablanah (Heimann in Worf, 1985).

### 2.3.3 Latentne ali prikrite okužbe

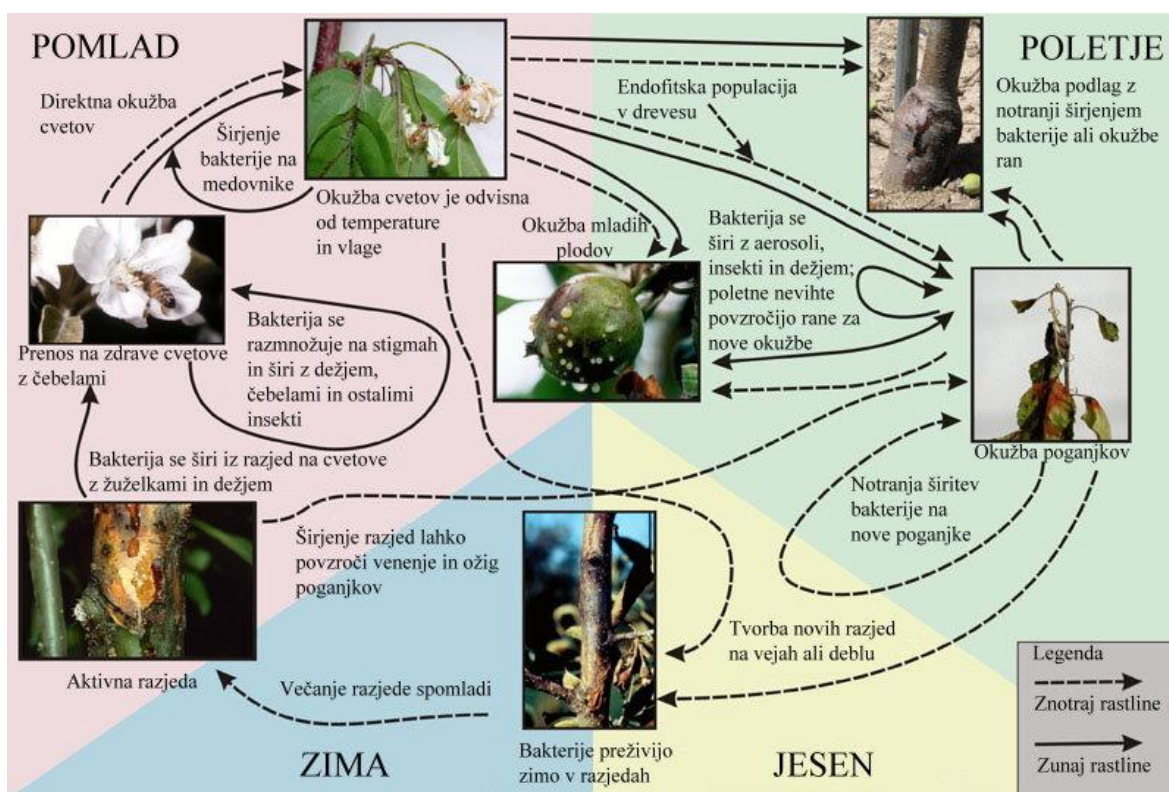
Že leta 1963 sta Baldwin in Goodman (1963) poročala, da je bakterija lahko kot endofit v 40% zdravih brstov. Zaradi načina ugotavljanja prisotnosti bakterije z bakteriofagi, ki lahko okužijo tudi druge vrste in ne samo *E. amylovora* domnevajo, da je bila ta številka precenjena. (Thomson, 2000). Tudi kasnejše študije so pokazale, da lahko bakterijo odkrijemo v zdravih brstih dreves na okuženih območjih (Keil in van der Zwet, 1972; Bonn, 1979). Prisotnost bakterije so lahko ugotovili tudi v ksilemu tkiva brez bolezenskih znamenj. Po ksilemu v večini leta poteka pretok vode in soli iz korenin v zgornje dele in tako ni dovolj hranil, da bi se bakterija razmnožila in povzročila bolezenska znamenja. Preživetje bakterije v takem tkivu je časovno omejeno (Gowda in Goodman, 1970; Ge in van der Zwet, 1996; Momol in sod., 1998). Verjetno pa nekaj bakterij lahko preživi in se preseli v druge dele (Momol in sod., 1998). Možno je, da fiziološke spremembe v gostitelju zaradi prekinitve dormance in povišane okoljske temperature povzročijo, da se bakterija lahko namnoži v ksilemu in se preko poškodovanega ali oslavljenega tkiva (robovi dormantnih razjed) razširi v preostale dele (Vanneste in Eden-Green, 2000). Tudi McManus in Jones (1995) so ugotovili prisotnost bakterije *E. amylovora* iz na videz



zdravih dreves v nasadu, kjer tisto leto ni bilo opaženih bolezenskih znamenj in tudi v preteklih letih je bilo pojavljanje bolezenskih znamenj redko. V kolikšni meri je endofitska prisotnost bakterije v navidezno zdravem tkivu kriva za množične izbruhe bolezni ni pojasnjeno. Pomembno pa je dejstvo, da je lahko bakterija v mladih sadikah brez bolezenskih znamenj in se na tak način lahko širi iz okuženega na neokuženo območje na daljše razdalje (Bonn in van der Zwet, 2000). Tako so po podatkih Calzolari in sod., (1982) bakterijo *E. amylovora* izolirali iz vegetativnih brstov jablan sorte Jonagold, ki so jih pripeljali iz Nizozemskega nasada v Italijo.

### 2.3.4 Razvojni krog bakterije *E. amylovora*

Ob cvetenju se v ugodnih klimatskih razmerah bakterije prenašajo iz razjed stebel na cvetove, kjer okužijo pestiče. V pestičih se lahko bakterije v kratkem času lahko namnožijo do visokih koncentracij. Iz pestičev potujejo bakterije preko nektarske žleze v pecelj cveta in nato v poganjek. Iz poganjkov lahko bakterije potujejo po celi rastlini in povzročijo odmrtje rastline. Ob ugodnih vremenskih razmerah se pojavi na okuženih poganjkih in plodovih bakterijski izcedek, ki predstavlja skoraj čisto bakterijsko kulturo in se z vetrom, žuželkami, dežjem na lahek način širi na neokužene rastline. Bakterija preživi zimo v razjedah. Razvojni krog bakterije je predstavljen na sliki 3.



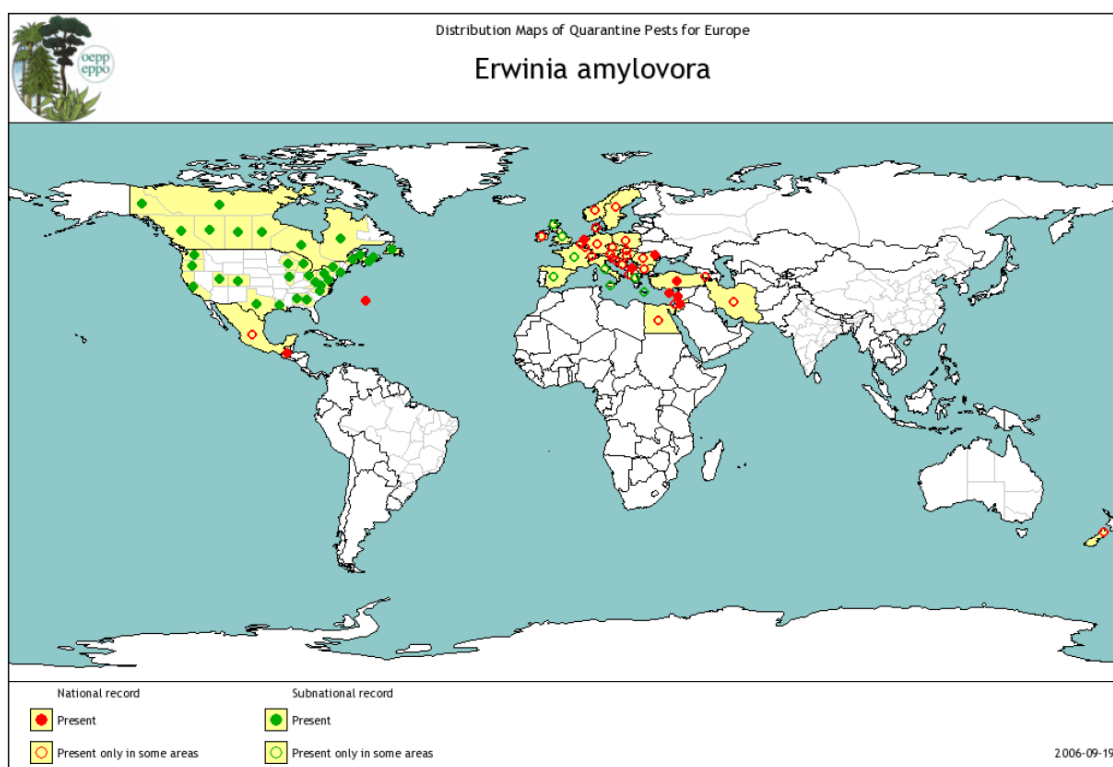
Slika 3 : Razvojni krog bakterije *E. amylovora* (povzeto po: Norelli J., 2003)

Figure 3 : Disease cycle of *E. amylovora* (adapted from Norelli J., 2003)

### 2.3.5 Geografska razširjenost in povzročena škoda

Po prvem odkritju v dolini Hudson v ameriški zvezni državi New York leta 1780 se je bolezen hitro razširila tudi na zvezne države Mississippi, Ohio, Indiana in Illinois. Širjenja boleznih niso preprečile niti visoke gore Rocky mountains in neskončne širjave prerij, saj se je po 100 letih odkritja razširila tudi v pacifiške države (Kalifornija, Oregon in Washington). Do leta 1915, 135 let po prvem odkritju, je bila bolezen razširjena na celotnem območju ZDA. Kasneje se je bolezen razširila na Novo Zelandijo in so jo leta 1957 prvič opazili tudi v Evropi. Danes je bakterija razširjena v 30 evropskih državah, v Egiptu kot edini afriški državi, od azijskih v Iranu, Libanonu, Izraelu in Jordaniji, po celotni Severni Ameriki, v Gvatemali in na Novi Zelandiji (slika 4).

Leta 1997 so poročali o najdbi tudi v Avstraliji (Rodoni in sod., 1999) vendar so bakterijo uspešno zatrli, saj ni več poročil o novih odkritjih.



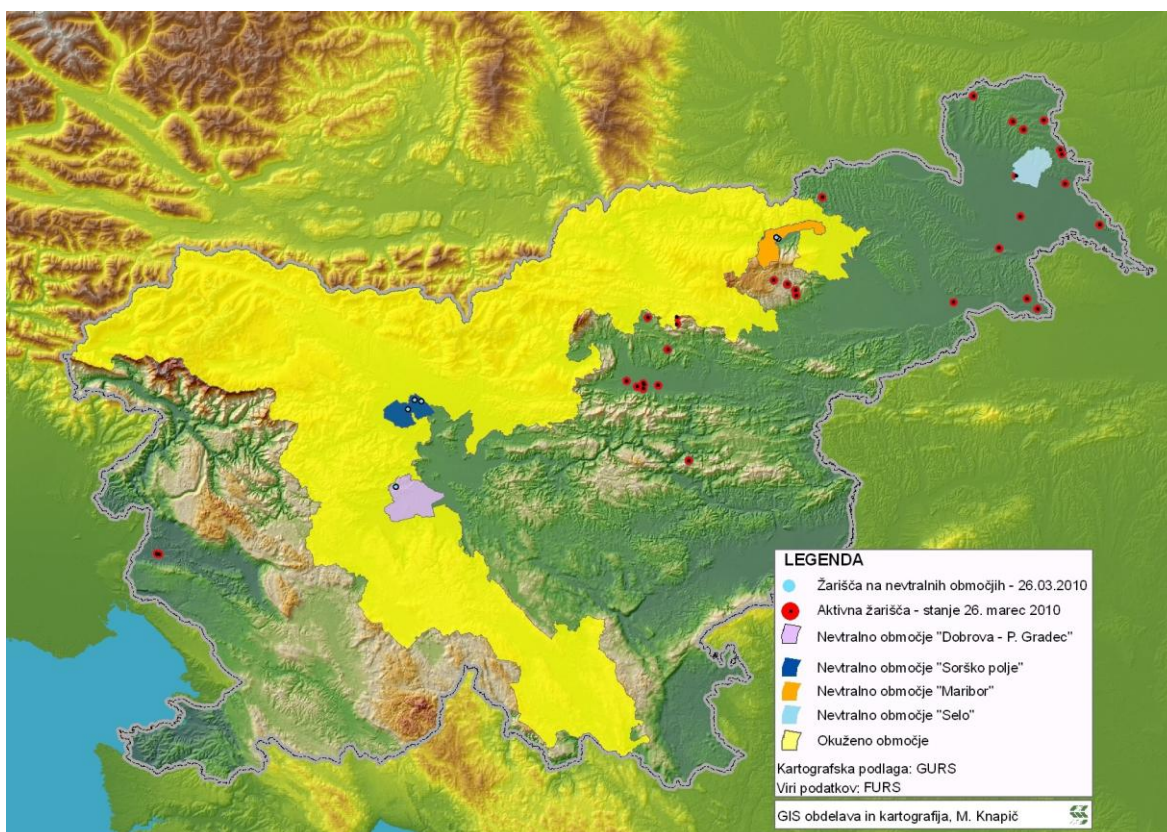
Slika 4 : Geografska razširjenost hruševega ožiga v svetu (European Plant Protection Organization, 2006)

Figure 4 : World distribution map of fireblight (European Plant Protection Organization, 2006)

Ob izbruhu lahko bolezen povzroči ogromno gospodarsko škodo. Samo v Sloveniji je bilo ob prvem izbruhu leta 2003 uničenih več kot 135 000 rastlin jablan, hrušk in kutin. Ugotovljena škoda zaradi tega uničenja je bila več kot 466.000 EUR (Pajk in Knapič, 2004).

### 2.3.6 Pojavljanje v Sloveniji

Prvo odkritje bakterije *E. amylovora* na območju Slovenije je bila leta 2001 na Gorenjskem. Prvi večji izbruh pa je bil leta 2003, ko se je hrušev ožig pojavil po celotni Gorenjski in v okolici Maribora. Kljub hudim naporom ter uničevanju okuženih rastlin se širjenje bakterije ni uspelo zaustaviti. Pri drugem izbruhu leta 2007 so bakterijo dodatno odkrili na jugu in vzhodu države, in se je tako hrušev ožig ustalil na Gorenjskem, Koroškem, na območju Maribora in na Notranjskem (slika 5). Sedaj štejemo med območja z nizko stopnjo pojavljanja hruševega ožiga še večino sadjarskih območij na Dolenjskem, Štajerskem in v Pomurju ter v zahodnem delu Slovenije (Lešnik in sod., 2008). V skladu z zakonodajo EU Fitosanitarna uprava RS koordinira posebni nadzor hruševega ožiga. Gre za zdravstvene preglede gostiteljskih rastlin v skladu s Pravilnikom o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranja hruševega ožiga (Uradni list RS, št. 19/09). Na spletni strani [http://www.furs.si/svn/zvr/hr\\_ozig.asp](http://www.furs.si/svn/zvr/hr_ozig.asp) so na voljo najnovejše informacije kje so aktivna žarišča, nevtralna območja in okužena področja.



Slika 5 : Razširjenost hruševega ožiga v Sloveniji (Knapič M., Fitosanitarna uprava RS, 2010)

Figure 5 : Distribution of fireblight in Slovenia (Knapič M., Phytosanitary Administration of RS, 2010)



### 2.3.7 Možnosti nadzora

Za učinkovit nadzor hruševega ožiga je potrebno izvajanje integriranih ukrepov in sicer a) s kmetijsko prakso zmanjšati dovzetnost rastlin in širjenje bolezni, b) zmanjšati količine bakterije v nasadu in c) časovno usklajeno uporabo baktericidnih sredstev, ki ščitijo pred okužbo pod posebnimi pogoji (Wilcox, 2009).

- a) Najbolj učinkovita kmetijska praksa za zmanjšanje izbruhov hruševega ožiga je izogibanje uporabe zelo dovzetnih sort in podlag. Egger in sod. (2007) navajajo kot zelo občutljive sorte naslednje sorte jablan: Braeburn, Koksova oranžna reneta, Elstar, Fuji, Gala, Gloster, Grafenštajnc, Idared, Jonagold, Jonatan itd. Kot zelo občutljive sorte hrušk navajajo sorte Konferans, Concorde, Trevuška, Avranška, Boskova steklenka itd. Kot manj občutljive sorte jablan pa navajajo naslednje: Boskop, Empire, Enterprise, Florina, in druge ter pri hruškah Harrow sweet itd. Večina danes tržno zanimivih sort jablan in hrušk je na splošno zelo občutljiva na hrušev ožig. Manj občutljive sorte se v pridelavi v Sloveniji doslej niso uveljavile (Lešnik in sod., 2008). Od podlag, se v Sloveniji v intenzivnih nasadih jablan najbolj pogosta podlaga M9, ki je občutljiva na okužbo s hruševim ožigom. Med občutljive Malling in Malling-Merton podlage spadajo tudi M26 M27, MM106, manj občutljiva pa je M7 (Lešnik in sod., 2008).

Za omejevanja širjenja bolezni pa je tudi zelo pomembno, da se izrezujejo oboleli poganjki in sicer takoj, ko se pojavijo. Odstraniti jih je potrebno vsaj 20 – 30 cm pod vidnimi bolezenskimi znamenji. Pri tem je tudi zelo pomembno sprotno razkuževanje orodja.

- b) Izvor primarnega inokuluma naj bi se zmanjšal z izrezovanjem razjed na vejah v času dormantnosti. Tudi z aplikacijo različnih bakrovih baktericidov takoj po ozelenitvi naj bi zmanjšali število novih bakterij, ki so prezimovale v razjedah. Zelo pomembno je, da novo okužene poganjke odstranijo v prvih tednih po cvetenju.
- c) Najbolj resne epidemije hruševega ožiga se začnejo z okužbo v času cvetenja. Najbolj učinkovito se proti cvetni okužbi lahko borimo z antibiotičnimi pripravki, ki pa so v številnih državah prepovedani. Problem je razvoj sevov, ki so na antibiotike odporni.

## 2.4 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJE

### *E. amylovora*

Detekcijske in identifikacijske metode ter potek testiranja bakterije *E. amylovora* v vzorcih z in vzorcih brez bolezenskih znamenj (latentnih) so priporočene v EPPO standardih Evropske organizacije za varstvo rastlin (EPPO, 1992, 2004). EPPO standard PM 7/20 (2004) je nastal kot posledica EU projekta DIAGPRO (SMT 4-CT98-2252), kjer je sodelovalo več različnih laboratorijev iz Evropskih držav.

#### **2.4.1 Vzorčenje in ekstrakcija bakterij**

Pri simptomatičnih vzorcih so najprimernejša mesta vzorčenja področja z izcedkom, okuženi cvetovi, poganjki, listi in plodovi in mesta, kjer pride do spremembe barve pod lubjem. Vzorec od vzorčenja do ekstrakcije hranimo na hladnem. Ekstrakcija poteka tako, da koščke simptomatičnega tkiva inkubiramo v ekstrakcijskem pufri, kamor se sprostijo bakterije.

Vzorčenje latentnih vzorcev poteka po EPPO standardu iz leta 1992.

#### **2.4.2 Izolacija na gojiščih**

Pri vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji, kjer je bakterija navadno prisotna v večjem številu, je izolacija na gojišču navadno enostavna. Priporočljiva je uporaba gojišč SNA, CCT ali King's B. V primeru, da so bolezenska znamenja zelo napredovala, ali pa kadar zaradi neugodnih razmer ni prišlo do izrazitih bolezenskih znamenj ali le teh ni, je število bakterij nizko in je priporočena predhodna obogatitev v tekočih gojiščih (EPPO, 2004).

#### **2.4.3 Obogatitvena gojišča**

V vzorcih z nizkim številom bakterije *E. amylovora* je priporočena obogatitev bakterije v tekočem gojišču CCT in King's B. Obogatitev je tudi pomembna za aktivacijo živih celic, ki ne rastejo na gojišču oz. VBNC celic (angl. viable but non-culturable; Ordax in sod., 2006). Prvi je obogatitev izvedel Gorris in sod. (1996), kjer je z obogatitvijo občutno zvišal občutljivost metode ELISA. Obogatitev je bila testirana tudi v okviru projekta SMT, kjer je povečala občutljivost pri izvedenih testih (Lopez in sod., 2006).

#### **2.4.4 Serološke metode (aglutinacija, IF, ELISA)**

Agglutinacijo s specifičnimi protitelesi izvajamo na morfološko ustreznih kolonijah za identifikacijo bakterije. Test imunofluorescence je uporaben tako za ugotavljanje prisotnosti bakterije v ekstraktu vzorcev z ali brez izraženih bolezenskih znamenj ali pa za identifikacijo čiste kulture. Za testiranje vzorcev z ali brez izraženih bolezenskih znamenj je ustrezna tudi obogatitvena DAS-ELISA, ki je dostopna tudi kot komercialni kit (Gorris in sod., 1996).

## 2.4.5 Molekularno – biološke metode

### 2.4.5.1 Osnove PCR v realnem času

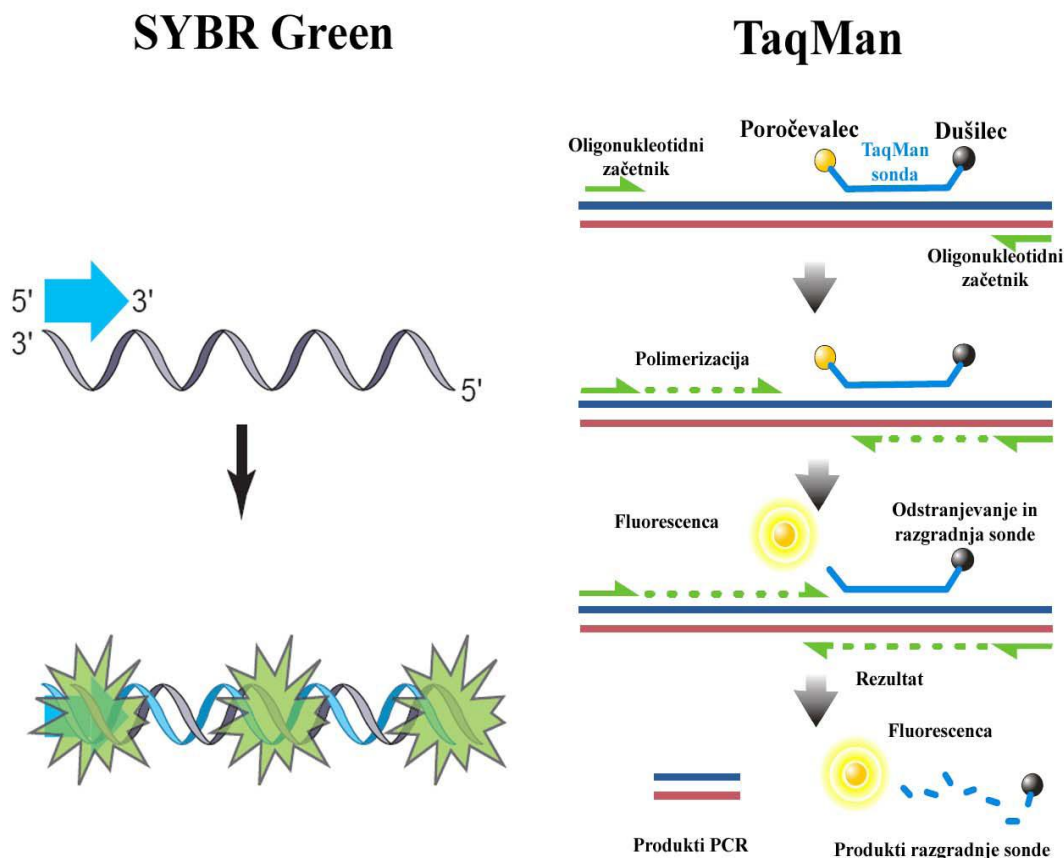
PCR v realnem času (qPCR) predstavlja nadgradnjo verižne reakcije s polimerazo (PCR), saj omogoča zaznavanje produktov PCR med potekom pomnoževanja. Zaznavanje poteka na osnovi merjenja sproščanja fluorescence, ki se med reakcijo povečuje ali zmanjšuje, odvisno od kemije reakcije. Trenutno obstaja več kemijskih metod PCR v realnem času in tudi več različnih inštrumentov z različnimi viri svetlobe in detektorji. Ne glede na izbrano kemijo, oz. inštrument, je osnovni princip zaznavanja količine nastalega produkta PCR skupen: zaradi fluorescentnega označevanja nastajajočih produktov PCR, je količina produkta PCR sorazmerna izmerjeni fluorescenci. In ker fluorescenco merimo ves čas poteka reakcije, torej v realnem času, lahko izrišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence od števila ciklov. Končni rezultat je podan kot časovna točka, oz. število ciklov, pri katerem zaznamo porast fluorescence v eksponentni fazi reakcije PCR (Ct, cycle threshold; Ginzinger, 2002; Wilhelm in Pingoud, 2003; Bustin, 2005; Kubista in sod., 2006).

Tak pristop omogoča natančno kvantitativno analizo nukleinskih kislin. Poleg tega so prednosti PCR v realnem času še široko dinamično območje zaznavanja in kvantifikacije ter povečana občutljivost in natančnost. Ker produkte PCR zaznavamo neposredno med samo reakcijo na osnovi fluorescence, analiza produktov PCR z agaroznim gelom ni potrebna, kar zmanjša možnost kontaminacije med vzorci. Zaradi fluorescentnega zaznavanja je mogoče pomnoževanje kratkih odsekov DNA (od 70-150 baznih parov), kar zagotavlja večjo učinkovitost in zaradi uporabe sonde tudi večjo specifičnost PCR reakcije (Ginzinger, 2002; Wiseman, 2002; Wilhelm in Pingoud, 2003).

Zelo pogosto se uporabljata dva principa reakcije PCR v realnem času (slika 6):

1. V reakciji PCR v realnem času uporabljamo fluorescentna barvila, ki se vgrajujejo v dvoverižno DNA neodvisno od njenega zaporedja. Specifičnost reakcije je podobno kot pri reakciji PCR, odvisna od specifičnosti začetnih oligonukleotidov. Danes se večinoma uporabljata barvili SYBR Green I in BEBO. Fluorescenca teh dveh barvil je v raztopini nezaznavna, ob vezavi na mali jarek DNA pa se močno poveča (Kubista in sod., 2006). Prisotnost nespecifičnih produktov PCR in dimerov začetnih oligonukleotidov moramo po končani reakciji preveriti z disociacijsko krivuljo. To je dodatna stopnja reakcije PCR, pri kateri merimo fluorescenčni signal v odvisnosti od temperature taljenja ( $T_m$ , melting temperature). Med dvigovanjem temperature od 60 °C do 95 °C pride pri temperaturi taljenja produkta PCR do sproščanja vezanega barvila in posledično do upada fluorescence. Če je v mešanici PCR prisotnih več produktov PCR, ki imajo različne  $T_m$ , jih zaznamo na grafu disociacijske krivulje.

2. Pri drugem principu pa se pri metodi PCR v realnem času uporabljajo bodisi začetni oligonukleotidi bodisi sonde, označene s fluorescentnimi barvili. Najpogosteje se uporablja kemija TaqMan®, kjer gre za uporabo sonde, ki je na 5' in 3' terminalnem koncu označena s fluorescentnimi barvili. Barvilo na 5' koncu imenujemo poročevalec (reporter), barvilo na 3' koncu pa dušilec (quencher). V reakcijski mešanici sta, poleg specifične sonde, še dva specifična začetna oligonukleotida. Vse te tri elemente skupaj imenujemo amplikon. Med reakcijo PCR se najprej vsi trije oligonukleotidi (dva začetna oligonukleotida in sonda) vežejo na homologna mesta na tarčni DNA, nato začne DNA-polimeraza sintetizirati homologno verigo na odseku med obema začetnima oligonukleotidoma. Ko naleti na sondo, ki leži med njima, jo zaradi svoje 5'-eksonukleazne aktivnosti začne razgrajevati. Tako se reporter in dušilec prostorsko ločita, reporter začne ob ekscitaciji fluorescirati kar zaznamo z detektorjem v aparaturi za PCR v realnem času.



Slika 6 : Princip delovanja SYBR Green in TaqMan kemije pri metodi PCR v realnem času (Walker, 2002; Introduction to..., 2004).

Figure 6 : Mechanism of SYBR Green and TaqMan chemistries in real-time PCR (Walker, 2002; Introduction to ..., 2004)

#### 2.4.5.2 Obstoječe metode PCR in PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti *E. amylovora*

Zaradi velike pomembnosti bakterije in ugotavljanja njene prisotnosti, so se po odkritju klasične PCR reakcije hitro pričele vrstiti objave za odkrivanje prisotnosti bakterije *E. amylovora* (Bereswill in sod., 1992; Bereswill in sod., 1995; McManus & Jones, 1995; Guilford in sod., 1996; Maes in sod., 1996; Llop in sod., 2000; Obradovic in sod., 2007). Kot tarčno nukleotidno zaporedje za razvoj metode so nekateri uporabili plazmid pEA29 (Bereswill in sod., 1992, McManus & Jones, 1995, Llop in sod., 2000), drugi pa kromosomsko DNA (Bereswill in sod., 1995; Guilford in sod., 1996; Maes in sod., 1996; Obradovic in sod., 2007). Prednost razvoja na plazmidu je v tem, da je le ta prisoten v nekaj kopijah v celici, zato so te metode teoretično bolj občutljive od tistih na kromosomskem delu (Llop in sod., 2000). Poleg tega je kar nekaj poročil o opaženih nespecifičnih produktih pri PCR s tarčo na kromosomski DNA (Bereswill in sod., 1995; Maes in sod., 1996; Llop in sod., 2000; Rosello in sod., 2002, Powney in sod., 2008). Tako je bila najbolj uporabljena metoda za ugotavljanje prisotnosti *E. amylovora* in predlagana tudi v EPPO standardu PM 7/20 (2004) metoda vgnezdene PCR reakcije, ki so jo razvili Llop in sod. (2000) s tarčo na plazmidu pEA29. Šele nedavno (Llop in sod., 2006) pa so odkrili, da plazmid pEA29 v naravi ni prisoten pri vseh virulentnih sevih. Čeprav so ti sevi v manjšini je z njihovim odkritjem tudi na drugih geografskih območjih (Llop in sod., 2008) postalo pomembno katero metodo izberemo za ugotavljanje prisotnosti *E. amylovora*.

Zaradi prednosti reakcije PCR v realnem času pred klasično PCR reakcijo so za ugotavljanje prisotnosti *E. amylovora* razvili dva sistema (Salm & Geider, 2004; De Bellis in sod., 2007), ki sta se razlikovala v kemiji, vendar imata oba sistema tarčo na plazmidu pEA29, kar je za uporabo v detekcijske namene enako problematično kot pri navadni PCR reakciji s tarčo na tem plazmidu. Sočasno z razvojem amplikonov (Ams in ITS), opisanih v tem delu, na kromosomski DNA je bil objavljen še en sistem PCR v realnem času s tarčo na kromosomskem genu *lsc* (»levansucrase« gen), ki je pomemben pri sintezi levana (Lehman, 2008). Razvili so dvojno reakcijo, s katero je mogoče sočasno zaznati tako bakterijo *E. amylovora* kot tudi *E. pyrifoliae*. Nekoliko kasneje so Mohammadi in sod. (2009) razvili PCR v realnem času na genu *amsK*, ki je prav tako del regije *ams*.

#### 2.4.6 Identifikacijski testi

Za identifikacijo bakterije *E. amylovora* je na voljo veliko število testov. Po EPPO standardu 2004 je priporočljivo izvesti: aglutinacijo s specifičnimi protitelesi, test imunofluorescence, metodo ELISA, biokemijsko karakterizacijo z API sistemom (BioMérieux, Francija), profil maščobnih kislin in različne molekularne teste. Za zanesljivo potrditev bakterije *E. amylovora* se navadno izvede vsaj dva od naštetih testov.



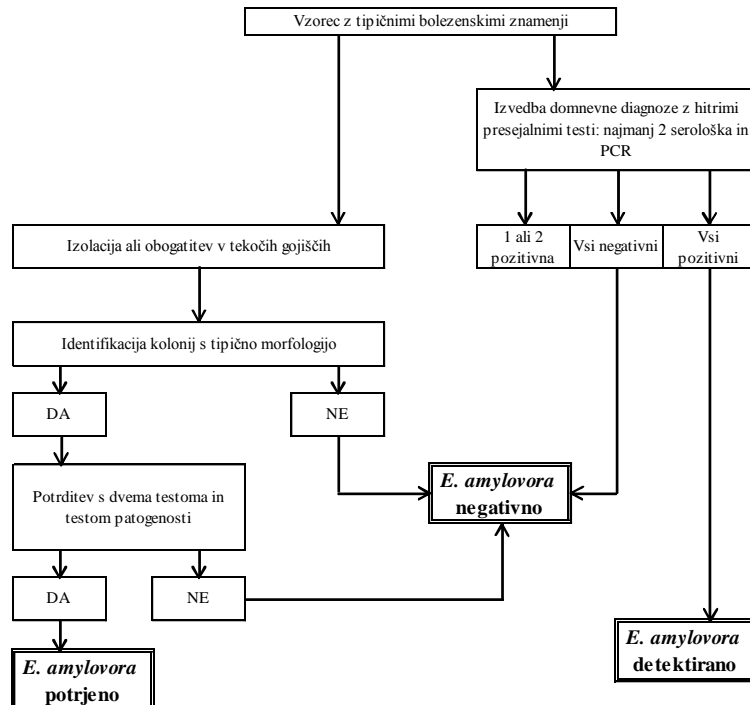
Pri identifikacijskih testih navadno uporabljamo čisto kulturo bakterije v visoki koncentraciji ( $\approx 10^8$  celic/mL) in tako so vse našteje metode tudi dovolj občutljive za ugotavljanje prisotnosti bakterije. Razlikujejo pa se v specifičnosti, hitrosti in ceni izvedbe.

#### 2.4.7 Potrjevanje patogenosti

Za potrjevanje patogenosti se največkrat izvede test patogenosti na nezrelih plodovih hrušk. Lahko pa se test izvede tudi na celih rastlinah ali na posameznih poganjkih občutljivih sort hrušk ter jablan. Možna je izvedba tudi na japonski nešplji ter občutljivih vrstah iz rodu *Crateagus*, *Cotoneaster* ali *Pyracantha*. (EPPO, 2004). V primeru, da ni primernih plodov ali rastlin se velikokrat izvaja tudi test preobčutljivostne reakcije na tobaku.

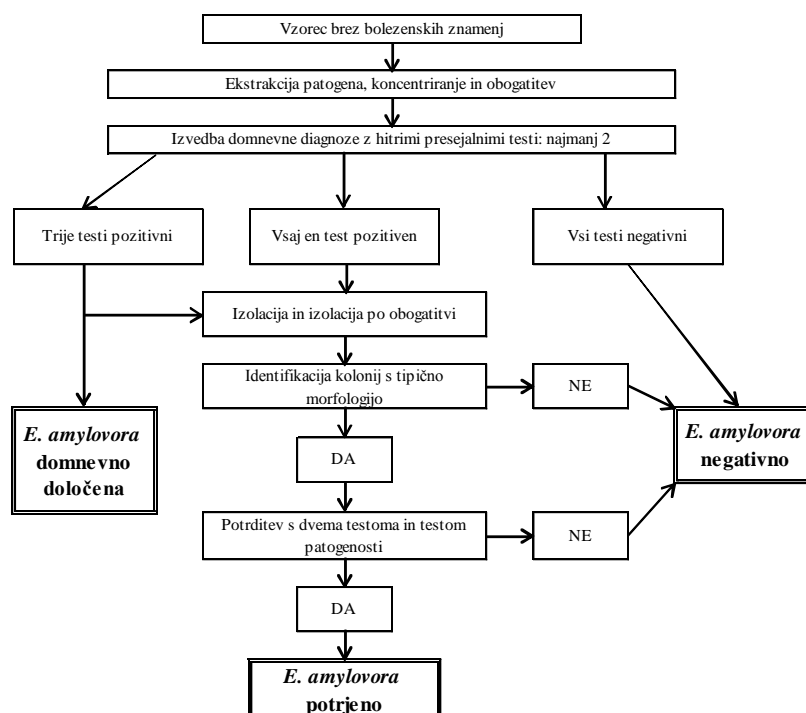
### 2.5 POTEK TESTIRANJA

Shema testiranja za ugotavljanje prisotnosti bakterije *E. amylovora* je predlagana s strani organizacije EPPO (EPPO standard PM 7/20) in je različna za testiranje rastlin z izraženimi bolezenskimi znamenji (slika 7) ali rastlin brez njih (latentno testiranje, slika 8)



Slika 7: Shema testiranja za ugotavljanje prisotnosti in identifikacijo bakterije *E. amylovora* pri rastlinah z izraženimi bolezenskimi znamenji (European Plant Protection Organization, 2004)

Figure 7: Detection scheme for the detection and identification of *E. amylovora* in host plants with symptoms (European Plant Protection Organization, 2004)



Slika 8: Shema testiranja za ugotavljanje prisotnosti in identifikacijo bakterije *E. amylovora* pri rastlinah brez izraženimi bolezenskimi znamenji (European Plant Protection Organization, 2004)

Figure 8: Detection scheme for the detection and identification of *E. amylovora* in asymptomatic samples (European Plant Protection Organization, 2004)

## 2.6 BAKTERIJE IZ RODU *PSEUDOMONAS*

### 2.6.1 Taksonomija

Taksonomija bakterij iz rodu *Pseudomonas* se je v zadnjih desetletjih zelo spreminjala. V rod *Pseudomonas* so sedaj uvrščene vrste, ki so sorodne tipski vrsti *Pseudomonas aeruginosa*, avtentični pseudomonadi rRNA skupine I (Palleroni in sod., 1973), ki sodi v  $\gamma$  podrazred *Proteobacteria* (Kerstens in sod., 1996). Med drugimi bakterijskimi vrstami je sedaj v rod uvrščenih tudi 18 takih, ki so patogene za rastline in 3 vrste, ki so patogene na gobah (Höfte in de Vos, 2006; preglednica 1).

Med patogenimi bakterijami iz tega rodu je ekonomsko najpomembnejša vrsta *P. syringae*. Razdeljena je na več kot 50 patovarjev. Patovar ni taksonomska enota ampak je bila uvedena z namenom, da se lahko loči bakterije znotraj vrste glede na gostiteljske rastline, na katerih povzroča bolezenska znamenja (Dye in sod., 1980). Pomembna vrsta je tudi *P. savastanoi*, ki povzroča tumorje in šiške na olivah, jesenu in oleandrih. Tudi ta vrsta je razdeljena na patovarje. Leta 1992 so Gardan in sod., na podlagi DNA-DNA hibridizacije preklasificirali patovarja *phaseolicola* in *glicinea* iz vrste *P. syringae* v vrsto *P. savastanoi*

s čemer se pa Schaad in sod. (2000) ne strinjajo in so predlagali, da bi ta dva patovarja ostala znotraj vrste *P. syringae*.

Preglednica 1 : Bakterijske vrste iz rodu *Pseudomonas* patogene na rastlinah in gobah (Höfte in de Vos, 2006)

Table 1 : Bacteria species from genus *Pseudomonas* pathogenic to plants and mushrooms (Höfte in de Vos, 2006)

	<b>Bakterijska vrsta</b>	<b>Gostiteljska rastlina</b>
Oksidaza pozitivne bakterije rodu <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas agarici</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
	<i>Pseudomonas asplenii</i>	<i>Asplenium nidus</i>
	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Širok krog gostiteljev
	<i>Pseudomonas constantinii</i>	<i>Agaricus bisporus</i>
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Paradižnik
	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	<i>Oryzae sativa</i>
	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>alfalfae</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	Širok krog gostiteljev
	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>pastinacea</i>	<i>Pastinaca sativa</i>
	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	<i>Oryzae sativa</i>
	<i>Pseudomonas salomonii</i>	<i>Allium sativum</i>
	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<i>Agaricus</i> spp.
Oksidaza negativne bakterije rodu <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas amygdali</i>	<i>Prunus amygdalus</i>
	<i>Pseudomonas avellanae</i>	<i>Corylus avellana</i>
	<i>Pseudomonas cannabina</i>	<i>Cannabis sativa</i>
	<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	<i>Carica papaya</i>
	<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	<i>Ficus erectae</i>
	<i>Pseudomonas meliae</i>	<i>Melia azadarach</i>
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> (različni patovarji)	Različni gostitelji
	<i>Pseudomonas syringae</i> (različni patovarji)	Različni gostitelji
	<i>Pseudomonas tremae</i>	<i>Trema orientalis</i>
	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Širok krog gostiteljev

48 patovarjev *P. syringae* in 8 sorodnih vrst bakterij so Gardan in sod. (1999) z DNA-DNA hibridizacijo razvrstili v 9 genomskih vrst (preglednica 2). Vsaka genomski vrsta bi bila lahko tudi nova vrsta, ki vsebuje seve, ki imajo vsaj 70% DNA-DNA homologije s tipskim sevom znotraj skupine. Z namenom poenostavitve analize, da bi lahko neznane seve uvrstili znotraj genomskih vrst so uvedli tudi ribotipizacijo z encimoma *SmaI* in *HincII*, vendar lahko s to metodo ločimo le 7 od 9 genomskih vrst.

Preglednica 2 : Genomske vrste med patovarji *P. syringae* in sorodnimi vrstami (Gardan in sod., 1999)

Table 2 : Genomespecies in *P. syringae* pathovars and related species (Gardan et. al., 1999)

Genomske vrste	Takson
Genomska vrsta 1	<i>P. syringae</i> , <i>P.s. pv. aptata</i> , <i>P.s. pv. lapsa</i> , <i>P.s. pv. papulans</i> , <i>P.s. pv. pisi</i> , <i>P.s. pv. atrofaciens</i> , <i>P.s. pv. aceris</i> , <i>P.s. pv. panici</i> , <i>P.s. pv. dysoxyli</i> , <i>P.s. pv. japonica</i>
Genomska vrsta 2	<i>P. savastanoi</i> , <i>P. ficuserectae</i> , <i>P. meliae</i> , <i>P. amygdali</i> , <i>P.s.pv. phaseolicola</i> , <i>P. s. pv. ulmi</i> , <i>P.s. pv. mori</i> , <i>P. s. pv. lachrymans</i> , <i>P.s. pv. sesami</i> , <i>P.s. pv. tabaci</i> , <i>P.s. pv. morsprunorum</i> , <i>P.s. pv. glycinea</i> , <i>P.s. pv. ciccaronei</i> , <i>P. s. pv. eriobotryae</i> , <i>P.s. pv. mellea</i> , <i>P.s. pv. aesculi</i> , <i>P.s. pv. hibisci</i> , <i>P.s. pv. myricae</i> , <i>P.s. pv. photinae</i> , <i>P.s. pv. dendropanacis</i>
Genomska vrsta 3	<i>P. s. pv. tomato</i> , <i>P.s. pv. persicae</i> , <i>P.s. pv. antirrhini</i> , <i>P.s.pv. maculicola</i> , <i>P.s. pv. viburni</i> , <i>P.s. pv. berberidi</i> , <i>P.s. pv. apii</i> , <i>P.s. pv. delphinii</i> , <i>P.s. pv. passiflorae</i> , <i>P.s. pv. philadelphi</i> , <i>P.s. pv. ribicola</i> , <i>P.s. pv. primulae</i>
Genomska vrsta 4	<i>P. coronafaciens</i> , <i>P.s. pv. porri</i> , <i>P.s. pv. garcae</i> , <i>P.s. pv. striafaciens</i> , <i>P.s. pv. atropurpurea</i> , <i>P. s. pv. oryzae</i> , <i>P. s. pv. zizaniae</i>
Genomska vrsta 5	<i>P. tremae</i>
Genomska vrsta 6	<i>P. viridiflava</i>
Genomska vrsta 7	<i>P. s. pv. tagetis</i> , <i>P.s. pv. helianthi</i>
Genomska vrsta 8	<i>P.s. pv. theae</i> , <i>P. avellanae</i> , <i>P. s. pv. actinidiae</i>
Genomska vrsta 9	<i>P. cannabina</i>

## 2.6.2 Patogenost *Pseudomonas syringae*

Znano je, da patovarji bakterije *P. syringae* povzročajo različna bolezenska znamenja na rastlinah, kar vključuje ožig (hitri propad tkiva) na cvetovih, poganjkih, listih in plodovih, točkaste nekroze na listih in razjede. Ko bakterija vstopi v rastlinsko tkivo, se lahko zgodita dva tipa reakcij. Pri prvi gre za kompatibilno reakcijo v dovzetnem gostitelju, kjer se patogena bakterija razmnožuje in nastanejo napredujoča bolezenska znamenja. Pri drugi reakciji pa se v odpornih gostiteljskih celicah pojavi preobčutljivostna reakcija v 12 – 24 urah po inokulaciji. Genomska regija *hrp*, ki je ohranjena pri rastlinskih patogenih bakterijah, omogoča, da povzročijo preobčutljivostno reakcijo pri negostiteljskih rastlinah, bolezenska znamenja pri gostiteljskih rastlinah ter zmožnost rasti znotraj rastlin ali na njeni površini (Gopalan in He, 1996). Znano je tudi, da geni *hrp* kodirajo gene za regulacijo in biosintezo sekrecijskega sistema tipa III, ki je podoben pri rastlinskih in živalskih patogenih (Roine in sod., 1997). Poleg genov *hrp* so pri patogenih bakterijah iz rodu

*Pseudomonas* pomembni tudi geni, katerih produkti povečujejo patogenost, kot so polisaharidi, rastlinski toksini, encimi, ki razgrajujejo celično steno, ter rastlinski hormoni.

### 2.6.2.1 Rastlinski toksini

Toksini, ki jih sintetizirajo bakterije *P. syringae* (preglednica 3), lahko povzročajo kloroze (koronatin, fazeolotoksin in tabtoksin), nekroze (siringomicin in siringopeptin), lahko pa delujejo tudi na metabolne procese v gostitelju in njihovo škodljivost lahko ugotovimo le na biokemijskem nivoju (Bender in sod., 1999). Sami fitotoksini niso nujno potrebni za patogenost bakterije, se pa ob njihovem delovanju poveča virulenca organizma. Tako lahko prispevajo k sistemskemu razširjanju bakterije v rastlini (Patil in sod., 1974), vplivajo na velikost lezij (Bender in sod., 1987; Xu in Gross, 1988) ali na razmnoževanje patogene bakterije v gostitelju (Bender in sod., 1987; Mittal in sod., 1995). V preglednici 3 so zbrani toksini, ki jih sintetizirajo različni patovarji znotraj vrste *P. syringae*.

Preglednica 3 : Fitotoksini, ki jih tvorijo patovarji *P. syringae*

Table 3 : Phytotoxins produced by *P. syringae* pathogens

Toksin	Producirajoči organizem	Kemični razred toksina
Koronatin	<i>P. syringae</i> pv. <i>atropurpurea</i> , <i>glycinea</i> , <i>maculicola</i> , <i>morsprunorum</i> , <i>tomato</i>	Poliketid
Persikomicin	<i>P. syringae</i> pv. <i>persicae</i>	Maščobna kislina
Fazeolotoksin	<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> , <i>phaseolicola</i>	Sulfodiaminofosfinil peptid
Siringomicini	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>aptata</i> , <i>atrofaciens</i> , <i>P. fuscovaginate</i>	Lipodepsinonapeptid
Siringopeptini	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Lipodepsipeptid
Tabtoksin	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>coronafaciens</i> , <i>garcae</i>	$\beta$ – laktam
Tagetitoksin	<i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	Neznano

Sevi, ki so uvrščeni v patovar *syringae*, lahko sintetizirajo dva razreda toksinov in sicer siringomicine in siringopeptine. Siringomicini se potem še nadalje delijo na siringomicin, siringostatin, siringotoksin in pseudomicin (Bender in sod 1999). Toksini iz obeh razredov se lahko vgradijo v plazmalemo rastlinske celice in povzročijo pore, ki so prosto pretočne za katione. Tako toksini povzročijo povečan pretok  $K^+$ ,  $H^+$  in  $Ca^{2+}$  ionov, kar povzroči celično smrt (Bender in sod 1999). Enak tip toksinov so opazili tudi pri patovarjih *aptata*, *atrofaciens*, in *P. fuscovaginate* (Bultreys in sod., 1999).

Fazeolotoksin lahko sintetizirata patovarja *phaseolicola* in *actinidiae*, ki povzročata bakterijsko pegavost fižola in bakterijski rak na kiviju. Toksin deluje na biokemijske poti v

ciklu uree in posledično v rastlinskih celicah pride do pomanjkanja arginina, kar pripelje do kloroz (Höfte in de Vos, 2006).

Koronatin lahko sintetizirajo patovarji *atropurpurea*, *glicinea*, *maculicola*, *morsprunorum* in *tomato* (Bender in sod., 1999). Strukturno je zelo podoben metil jasmonatu in njegovo delovanje je vpleteno v signalne poti, ki so pomembne pri obrambi rastline.

#### 2.6.2.2 Ekstracelularni polisaharidi

Ekstracelularne polisaharide, ki jih izločajo rastlinski patogeni mikroorganizmi povezujejo z določenimi bolezenskimi znamenji. Povzročajo venenje zaradi prisotnosti mikroorganizmov v žilnem sistemu in vodne madeže pri listnih patogenih (Denny in sod., 1995). Patovarji *P. syringae* navadno sintetizirajo dva ekstracelularna polisaharida in sicer levan in alginat (Gross in Rudolph, 1987). Z različnimi študijami na mutantah, ki niso bile sposobne sinteze alginata, so pokazali da le ta vpliva na epifitsko sposobnost in na samo virulenco bakterij (Yu in sod., 1999).

#### 2.6.2.3 Tvorba avksinov

Glickmann in sod., (1998) so dokazali tvorbo IAA (angl. indol – 3 – acetic acid) pri različnih patovarjih. Vlogo IAA v patogenezi so dokazali pri *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, saj sinteza hormonov, kot so citokinini in IAA, omogoča tvorbo značilnih tumorjev na olivah in oleandru. Pri patovarju *syringae* pa so ugotovili, da IAA vpliva na epifitsko preživetje bakterije in kakor so pokazali tudi na produkcijo toksinov pri sevih iz fižola (Höfte in de Vos, 2006).

#### 2.6.2.4 Sinteza pektinolitičnih encimov

Bakterija *P. fluorescens (marginalis)*, ki povzroča mehke gnilobe na različnih rastlinah sintetizira encime, ki razgrajujejo pektinske komponente v celični steni rastlinske celice. Poleg nje te encime sintetizira tudi *P. viridiflava* in dokazali so jih tudi pri nekaterih patovarjih *P. syringae*, kot so *lachrymans*, *phaseolicola*, *tabaci* in *glicinea* (Höfte in de Vos, 2006).

#### 2.6.2.5 Tvorba kristalov

Nekateri patovarji *P. syringae*, *P. fluorescens* in *P. viridiflava* na površini rastlin ali v medceličnih prostorih delujejo kot jedra za razvoj ledenih kristalov zato lahko do poškodb zaradi zmrzali pride pri višjih temperaturah kot je to običajno (med -5°C in 0°C). Poškodbe, ki nastanejo zaradi tega, omogočijo širjenje bakterij po rastlini.

## 2.7 BOLEZNI, KI JIH POVZROČAJO BAKTERIJE IZ RODU *PSEUDOMONAS*

### 2.7.1 Znamenja bolezni

Bolezenska znamenja, ki jih povzročajo patovarji *P. syringae*, so odvisni od patovarja, od vrste gostiteljske rastline, od dela rastline, ki jo prizadene, od posameznega seva in tudi od pogojev v okolju. Lahko pride do nekroze cvetov ali popkov, do propada dormantnih popkov, kar je značilno pri češnjah in marelicah, nekrotičnih peg na listih, lahko pride do razbarvanja ali počrnitve listnih žil in listnih pecljev, povzročajo lahko tudi madeže na plodovih (angl. blister spot), nekroze na vrhovih poganjkov, ki se širijo navzdol. Povzročajo tudi razjede na steblih ali vejah.

### 2.7.2 Gostiteljske rastline

Določeni patovarji *Pseudomonas syringae* imajo zelo ozek spekter gostiteljskih rastlin. To pa ne velja za patovar *syringae*, ki lahko okužuje preko 180 rastlinskih vrst. Najdemo ga lahko na pečkarjih in koščičarjih, različnih drevesnih vrstah, zelenjadnicah, in različnih travah. Na jablanah se poleg patovarja *syringae* pojavlja tudi patovar *papulans*, ki je opisan kot povzročitelj madežev na plodovih (angl. »blister spot«), predvsem pri sorti jablane Mutsu in naj bi povzročal propadanje brstov in poškodbe vršičkov (Burr, 1982; Burr in Katz, 1984). Na koščičastem sadju najdemo tudi patovar *morsprunorum* in na breskvah patovar *persicae*.

### 2.7.3 Geografska razširjenost, povzročena škoda ter pojavljanje v Sloveniji

Bakterija *Pseudomonas syringae* je splošno razširjena po svetu. Večji del časa lahko bakterije preživijo na površini rastlin v tako imenovani epifitski fazi, v kateri ne povzročajo bolezni. V tej fazi so prisotne v zelo visokih koncentracijah in si pri tem delijo življenjski prostor z drugimi bakterijami, ki niso sposobne povzročati bolezni (Hirano in Upper, 2000). S površin se lahko širijo z aerosoli in so tudi ene izmed redkih bakterij za katere je dokazano, da se lahko širijo tudi v oblake (Jayaweera in Flanagan, 1982; Sands in sod., 1982). Ekonomska škoda, ki jo povzročajo, je navadno manjša kakor pri bakteriji *E. amylovora*. Kljub temu lahko povzročijo tudi propad dreves, plodov je manj in so slabše kvalitete.

### 2.7.4 Možnosti nadzora

Uporaba antibiotikov v kmetijstvu je v primerjavi z uporabo v veterini ali humani medicini neprimerno manjša. Zaradi njihove cene se primarno uporabljajo samo pri sadju, ki prinaša večji dobiček, zelenjadarstvu in pri okrasnih rastlinah. Najpogostejši antibiotik, ki se

uporablja je streptomycin. V Evropskih državah je njegova uporaba prepovedana ali pa je pod zelo strogim nadzorom, se pa bolj uporablja v Združenih državah Amerike. Seve, ki so odporni proti streptomycinu, so našli znotraj vrst *P. cichorii*, *P. syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *papulans* in *P. syringae* pv. *syringae* (McManus in sod., 2002).

Kjer so antibiotiki prepovedani, se najpogosteje za zatiranje bakterijskih bolezni uporabljajo baktericidi ali pesticidi na osnovi bakra. Slabosti uporabe teh pripravkov so toksičnost za rastline in razvoj odpornosti pri bakterijah. Na področjih s populacijami bakterij, ki so odporne na baker, se lahko uporabljajo tudi rastlinski aktivatorji, ki inducirajo sistemsko odpornost pri rastlinah (Sticher in sod., 1997; Vallad in Goodman 2004) in se navadno uporabljajo za zatiranje listnih patogenov.

Veliko patovarjev vrste *P. syringae* se prenaša s semeni. *P. syringae* pv. *coronafaciens* se prenaša s semeni žitaric, patovar *glycinea* s semeni soje, patovar *lachrymans* buč, patovar *maculicola* križnic, patovar *phaseolicola* fižola, patovar *lisi* graha, patovar *porri* pora, patovar *tabaci* tobaka in patovar *tomato* s semeni paradižnika (Smith in sod., 1988). Pri teh rastlinah je kontrola širjenja bakterije usmerjena tudi v zagotavljanje zdravega semena. To se lahko doseže na več načinov in sicer s proizvodnjo semen v aridnih področjih, certifikacijo semen s serološkimi in molekularnimi tehnikami, kemično obdelavo z antibiotiki ali pripravki na osnovi bakra ter vročinsko obdelavo semen (Kritzman 1993; Bashan in de Bachan, 2002).

Možen je tudi biološki nadzor z različnimi saprofitskimi bakterijami (*P. fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus* spp,..) ali uporaba odpornih sort (Höfte in de Vos, 2006). Pomembna pa je tudi sama praksa pri pridelavi rastlin, kot so kontroliranje vlage in temperature v rastlinjakih, razkuževanje orodja, kolobarjenje, pravilno uničenje okuženih rastlin. Večinoma je za učinkovito preprečevanje širjenja bakterije potrebna kombinacija različnih pristopov.

## 2.8 IDENTIFIKACIJA IN UGOTAVLJANJE RAZNOVRSTNOSTI VRSTE *Pseudomonas syringae*

Za natančno identifikacijo patogenih bakterij iz rodu *Pseudomonas* moramo uporabiti kombinacijo različnih biokemijskih in hranilnih testov, testov patogenosti in različne genetske teste. Za preliminarno identifikacijo lahko zadostujejo že semi-selektivna gojišča v kombinaciji z bolezenskimi znamenji in gostiteljsko rastlino. Za izolacijo bakterij iz rodu *Pseudomonas* običajno uporabljamo semi-selektivno gojišče King B na katerem bakterije rodu *Pseudomonas* tvorijo karakteristični fluorescentni rumeno – zeleni pigment pioverdin. Patovarji *P. syringae* navadno tvorijo manj pigmenta kakor saprofitske vrste iz rodu *Pseudomonas*.



Za identifikacijo fluorescentnih bakterij iz rodu *Pseudomonas* v vrste so še vedno zelo uporabne značilnosti LOPAT (Leliott in sod., 1966). Vključujejo produkcijo Levana na gojišču s saharozo, Oksidazno reakcijo, Pektinolično aktivnost na rezinah krompirja ali ustreznem gojišču, Arginin dihidrolazno aktivnost in preobčutljivostno reakcijo na Tobaku. V preglednici 4 je prikazana razvrstitev fluorescentnih bakterij rodu *Pseudomonas* na podlagi značilnosti LOPAT.

Preglednica 4 : Značilnosti LOPAT pri fluorescentnih bakterij iz rodu *Pseudomonas*

Table 4 : LOPAT characteristics in fluorescent pseudomonads

skupina	Fluore- scenta <sup>1</sup>	levan (SNA)	oksidaza	pektinoli tičnost	arginin dihidrola za	HR <sup>2</sup> na tobaku	Vrste
Ia	poz (neg)	poz	neg	neg	neg	poz	patovarji <i>P. syringae</i> ( <i>syringae</i> , <i>morsprunorum</i> , <i>persicae</i> )
Ib	poz	neg	neg	neg	neg	poz	patovarji <i>P. syringae</i> ( <i>savastanoi</i> , <i>papulans</i> )
II	poz	neg	neg	poz	neg	poz	<i>P. viridiflava</i>
III	poz	neg	poz	neg	neg	poz	<i>P. cichorii</i> , <i>P. agarici</i>
IVa	poz	poz	poz	poz	poz	neg	<i>P. marginalis</i> (pektinolični <i>P.</i> <i>fluorescens</i> )
IVb	poz	neg	poz	poz	poz	neg	<i>P. fluorescens</i>
Va	poz	neg	poz	neg	poz	neg	<i>P. tolaasii</i> , <i>P. gingeri</i>
Vb	poz	poz	poz	neg	poz	neg	<i>P. fluorescens</i> in nekatere druge <i>Pseudomonade</i>

<sup>1</sup> nefluorescentni so *Ps.syr. pv persicae* in *Ps. corrugata*

<sup>2</sup> HR – preobčutljivostna reakcija

+ = 80 % ali več sevov pozitivnih, - = 80 % ali več sevov negativnih

Za identifikacijo teh bakterij se lahko uporablja tudi sistema BIOLOG in Biotype – 100 (Grimond in sod., 1996), vendar nista primerna za identifikacijo na nivoju patovarjev. Informacije na nivoju vrste in ne patovarjev dobimo tudi z ugotavljanjem profila maščobnih kislin in SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo celotnih celičnih proteinov

Identifikacija različnih patovarjev je navadno bolj zapletena. Braun – Kiewnick in Sands (2001) so napisali seznam testov, ki se lahko uporabljajo za dokaj zanesljivo razlikovanje najpomembnejših patovarjev znotraj vrste *P. syringae*. Identifikacija naj bi bila vedno potrjena tudi s testom patogenosti. Lahko se uporabljajo tudi različni testi, s katerimi ugotavljamo različne toksine, ki jih izdelujejo nekateri sevi. V pomoč pri identifikaciji so lahko tudi serološki testi z uporabo specifičnih protiteles. Na voljo so tržno dostopni določevalni kompleti za različne patovarje kot so *glycinea*, *lachrymans*, *phaseolicola*, *tomato*, *pisi* in *syringae*.

Pri identifikaciji bakterij iz rodu *Pseudomonas* molekularne tehnike izrinjajo serološke, encimatske in metabolne teste. Za taksonomske študije in ugotavljanje prisotnosti velikokrat uporabljajo ohranjene ribosomske gene (Widmer in sod., 1998), tarče pa so lahko usmerjene tudi na nekodirajoče regije, kakor so ribosomski vmesniki, kratke ponavljajoče se sekvence in insercijske sekvence (Höfte in de Vos, 2006). Z uporabo repetitivnih PCR (rep-PCR) se da ločiti več vrst bakterij iz rodu *Pseudomonas* in tudi patovarjev (Louws in sod., 1994; Manceau in Horvais, 1997; Weingart in Volksch, 1997). Lahko je tarča za identifikacijo tudi na plazmidu (Takahashi in sod., 1996). Nekaj PCR metod je usmerjenih tudi na gene, ki so pomembni za patogenost. Tako so na genu *hrp* razvili tarčo za ugotavljanje *P. syringae* pv. *tomato* (Zaccardelli in sod., 2005), *P. syringae* pv. *papulans* (Kerkoud in sod., 2002) in *P. avellanae* (Loreti in Gallelli, 2002). Tudi metode PCR, ki pomnožujejo gene pomembne za tvorbo toksinov pri različnih patovarjih so pogosto uporabljene. Za ugotavljanje koronatina (Ullrich in sod., 1993; Bereswill in sod., 1994, Zhao in sod., 2002), lipodepsinopeptidov (siringomicina in siringopeptina) (Sorensen in sod., 1998; Bultreys in Gheysen, 1999), fazeolotoksina (Prosen in sod., 1993; Schaad in sod., 1995), tabtoksina (Lydon in Patterson, 2001) in tagetitoksina (Kong in sod., 2004). Pri uporabi metode PCR za ugotavljanje genov za toksine je potrebna pazljivost pri interpretaciji, saj znotraj določenih patovarjev obstajajo tudi sevi, ki ne izdelujejo toksina, pa vendar še vedno povzročajo bolezenska znamenja na rastlinah (Rico in sod., 2003).

## 2.8.1 Sinteza toksinov

### 2.8.1.1 Test za sintezo siringomicina in siringopeptina

Glivi *Rhodotorula pilimanae* in *Geotrichum candidum* se najpogosteje uporabljata za testiranje ali so sevi sposobni sintetizirati siringomicine ali siringopeptine. Pri tem je gliva *Geotrichum candidum* občutljiva samo na siringomicine, gliva *Rhodotorula pilimanae* pa je občutljiva na oba razreda toksinov, ki jih patovarji *syringae* in še nekateri drugi patovarji lahko tvorijo (Iacobellis in sod., 1992; Lavermicocca in sod., 1997). Možne so tudi izvedbe različnih PCR analiz. Bultreys in sod. (1999) je kot tarčen gen izbral *syrD*, ki naj bi bil odgovoren za izločanje obeh toksinov (Bender in sod., 1999). Sorensen in sod. (1999) pa so razvili PCR s tarčo na genih *syrD* in *syrB*.

## 2.8.2 Testi patogenosti

Glede na to, da ima patovar *P. syringae* pv. *syringae* zelo širok spekter gostiteljskih rastlin, se za izvedbo testa uporabljajo tudi različni gostitelji. Najbolj splošna metoda za testiranje patogenosti je na plodovih nezrelih hrušk (Billing in sod., 1960; Lelliott in sod., 1966; Yessad in sod., 1992). Ker pa so le te na voljo le kratko obdobje v letu, so razvili in preizkusili tudi test patogenosti na mladih listih hruške ali na rastlinicah v agarju (Yessad in sod., 1992). Po njihovem mnenju različne sorte hrušk nimajo vpliva na razvoj

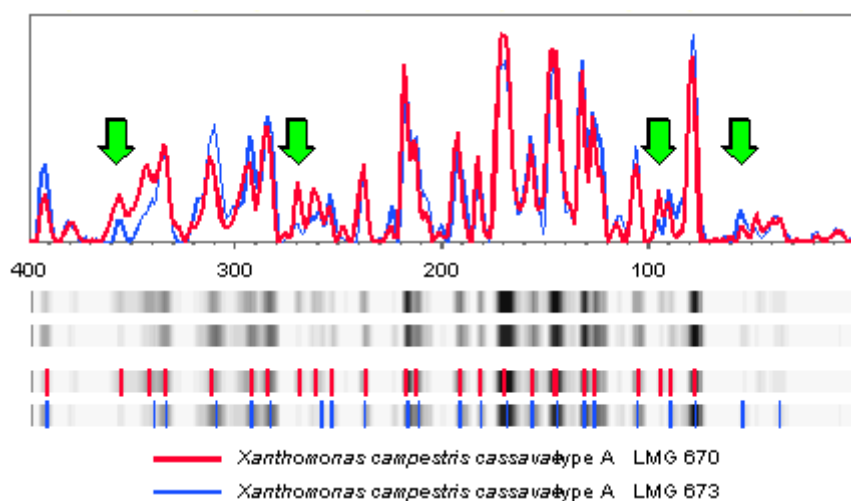
bolezenskih znamenj, vendar so testirali le 4 sorte. Ravno nasprotno pa so Moragrega in sod. (2003) ugotovili, da lahko sorte hrušk značilno vplivajo na izražena bolezenska znamenja pri testiranem sevu *P. syringae* pv. *Syringae*, tako na listih kakor tudi na plodovih. Med 5 najobčutljivejših sort za test na plodovih hrušk sodijo General Leclerc, Beurre Hardy, Conference, Super Comice, Rogue Red (22 testiranih sort) ter na listih Penguistar, Conference, Super Comice, Morettini in Bonne Louise (33 testiranih sort). Možna je tudi izvedba testa patogenosti na tkivnih kulturah (Scheck in sod., 1997) ali poganjkih (Yessad in sod., 1994) španskega bezga, na stročjem fižolu (Yessad in sod., 1992) ter na plodovih limon in bučk (Scortichini in sod., 2003).

Nedavno so Gilbert in sod. (2009) objavili študijo primerjave patogenosti sevov *P. syringae* pv *syringae* izoliranih iz hrušk, višenj, češenj in sliv na naslednjih gostiteljskih rastlinah: hruškah, češnjah, slivi, španskem bezgu, sladkorni pesi in pšenici pri tem, da so pri določenih gostiteljih testirali tudi različne rastlinske organe (liste, plodove, poganjke). Izpostavili so, da je za ugotavljanje patogenosti potrebno upoštevati iz katerega gostitelja je bil sev izoliran in da se test izvede na večih gostiteljskih rastlinah.

### **2.8.3 Molekularno – biološke metode**

#### **2.8.3.1 Osnova analize z repetitivnim PCR (rep-PCR)**

V bakterijskem genomu večine po Gramu negativnih in nekaterih po Gramu pozitivnih bakterij obstajajo zelo ohranjena ponavljajoča zaporedja, ki so prisotna tudi v večjem številu (Lupski in Weinstock, 1992). Poznamo tri razrede takih ponavljajočih se zaporedij in sicer zaporedja REP (angl. repetitive extragenic palindromic), ki so dolga 35 – 40 bp; zaporedja ERIC (angl. enterobacterial repetitive intergenic consensus) dolžine 124 – 127 bp ter elementi BOX (Versalovic in sod., 1994), ki so dolgi 154 bp. Ponavljajoča zaporedja so razporejena na različnih mestih v genomu bakterije. Na ta zaporedja nalegajo začetni oligonukleotidi in pomnožujejo regije med njimi. Glede na to, katera ponavljajoča zaporedja pomnožujemo, govorimo o REP-PCR, ERIC-PCR in BOX-PCR. Skupno ime pa je rep-PCR (Versalovic in sod., 1994). Ker so ponavljajoča zaporedja različno oddaljena med seboj, dobimo produkte različnih dolžin. Te nato z agarozno elektroforezo ločimo in dobimo prstni odtis DNA. Nato sledi analiza slik agaroznih gelov. Kadar je potrebno analizirati in primerjati večje število različnih prstnih odtisov DNA, je v zelo veliko pomoč računalniška obdelava. Na voljo je kar nekaj računalniških programov, ki omogočajo analizo prstnih odtisov DNA. Prstne odtise DNA lahko analiziramo na dva načina in sicer na podlagi analize lis ali denzitometričnih krivulj (slika 9).



Slika 9: Primerjava analize prstnih odtisov rep-PCR dveh sevov na podlagi denzitometričnih krivulj ali primerjave lis. S puščico so označene pozicije kjer je analiza na osnovi lis drugačna in zato je predlagana analiza takih profilov z analizo celotnih denzitometričnih krivulj (Rademaker in Bruijn, 1997)

Figure 9 : Comparison of analysis by densitometric curves or scored bands of rep-PCR genomic fingerprint pattern of two strains. Arrows indicate positions of differentially scored bands. This illustrates why the characterization of the fingerprint patterns by whole densitometric curve analysis is preferred (Rademaker and Bruijn, 1997)

Analizo na podlagi lis navadno uporabljamo v zelo dobro definiranih prstnih odtisih DNA, ki niso preveč zapleteni (Rademaker in Bruijn, 1997). Kot rezultat dobimo matriko binarnih vrednosti: prisotnost ali odsotnost lis. Analiza lahko poteka tako ročno, kakor računalniško, vendar je določevanje lis velikokrat subjektivno. Kadar pa analiziramo bolj zapletene prstne odtise DNA, kjer ni pomemben samo položaj lise, ampak tudi sama višina in širina, potem določevanje na podlagi prisotnosti ali odsotnosti lis ni dovolj. Takšne zapletene prstne odtise DNA dobimo z rep-PCR in jih je priporočljivo analizirati na podlagi denzitometričnih krivulj (Rademaker in Bruijn, 1997).

Pri računanju koeficienta podobnosti prstnih odtisov DNA, lahko uporabljamo različne koeficiente. Če smo analizirali podatke na podlagi lis, potem se najpogosteje uporabljata koeficienta Jaccard in Dice. Kadar pa primerjamo prstne odtise DNA na podlagi denzitometričnih krivulj pa se uporablja Pearsonov korelacijski koeficient. Ta koeficient je bolj robusten in objektivni, saj primerja celotne krivulje med seboj in ni potrebno določevanje lis. Prednost je tudi, da je metoda neobčutljiva na relativne razlike v intenziteti in ozadju, vendar pa je zelo občutljiva na lokalne razlike v ozadju (Rademaker in Bruijn, 1997).

### 2.8.3.2 Uporaba metode rep-PCR in drugih repetitivnih PCR za ugotavljanje genetske raznolikosti *P. syringae*

Metoda je bila uporabljena že v različnih študijah, kjer so ugotavljali diverziteto različnih patovarjev *P. syringae* in sorodnih bakterij na različnih gostiteljskih rastlinah. Z metodama REP-PCR in s PCR insercijskih zaporedij (IS50) so Sundin in sod. (1994) primerjali različne seve *P. syringae* pv. *syringae* iz okrasnih hrušk in nekaterih drugih gostiteljev. Nekoliko kasneje so Little in sod. (1998) z ERIC-PCR primerjali seve *P. syringae* pv. *syringae* na koščičarjih. Oboji so prišli do zaključka, da so si prstni odtisi DNA sevov *P. syringae* pv. *syringae* iz iste gostiteljske rastline bolj podobni, kakor odtisi iz drugih gostiteljskih rastlin. Njihova ugotovitev pa se ne ujema s študijo Scortichini in sod. (2003), kjer so z BOX-PCR primerjali seve *P. syringae* pv. *syringae* iz 33 različnih gostiteljskih rastlin. Njihova ugotovitev je bila, da imajo lahko sevi iz iste gostiteljske rastline več različnih prstnih odtisov DNA, medtem ko so imeli nekateri sevi iz različnih gostiteljskih rastlin in tudi lokacij enak prstni odtis DNA. Stead in sod. (2003) so z metodo REP-PCR primerjali 500 sevov bakterij iz rodu *Pseudomonas*, ki so opisane kot rastlinski patogeni. Znotraj vrst so ugotovili, da so prstni odtisi DNA heterogeni med vrstami *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. syringae*, *P. marginalis* in *P. caricapapayae* ter homogeni pri *P. avellanae*, *P. amygdali*, *P. talaasii*, *P. fuscusectae*, *P. corrugata* itd. Pri primerjavi patovarjev znotraj *P. syringae* pa so ugotovili, da so heterogeni patovarji: *actinidiae*, *atrofaciens*, *berberidis*, *lachrymans*, *passiflorae*, *phaseolicola*, *pisi*, *ribicola*, *sesami*, *syringae* in *viburni*. Ugotovili so, da je metoda zelo uporabna za klasifikacijo in identifikacijo, vendar je ponovljivost nekoliko slabša. Najlažja je identifikacija, če neznani sev primerjamo z določenimi referenčnimi sevi na istem agaroznem gelu. Kasneje so Marques in sod. (2008) pri vseh patovarjih *P. syringae* in pri bakteriji *P. viridiflava* primerjali 99 hranilnih testov s sistemom Biotype 100 in 20 tradicionalnimi biokemijskimi testi z rezultati prstnih odtisov DNA pridobljenih z metodo BOX – PCR. Njihov namen je bil ugotoviti ali lahko med seboj na podlagi teh rezultatov ločijo genomske vrste, določene po Gardan in sod. (1999). Ugotovili so, da na podlagi hranilnih in biokemičnih testov ne morejo ločiti med 9 genomskimi vrstami, lahko pa ločijo posamezne genomske vrste na podlagi prstnih odtisov DNA pridobljenih z BOX – PCR. Pri najnovejši študiji pa so Gilbert in sod. (2009) izvedli primerjalno analizo prstnih odtisov DNA pridobljenih z REP, ERIC, BOX-PCR in PCR-IS50 pri belgijskih sevih iz hrušk, češenj, višenj in sliv ter pri nekaterih kontrolnih bakterijah.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 RAZVOJ DIAGNOSTIČNE METODE PCR V REALNEM ČASU ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJE *E. amylovora*

##### 3.1.1 Material

###### 3.1.1.1 Bakterije

Bakterijske seve iz preglednic 9 in 10 smo gojili na gojišču King B (priloga 1) pri 25 °C. Bakterijske suspenzije iz gojišča smo pripravili v sterilni vodi Milipore Milli Q-UF.

###### 3.1.1.2 Rastlinski material

Rastlinski material je bil nabran s v okviru posebnega nadzora hruševega ožiga, ki ga koordinira FURS. Simptomatični vzorci so bili nabrani od maja do septembra v letih od 2003 – 2009. Vzorci brez bolezenskih znamenj so bili nabrani v septembru in oktobru v letih od 2006 – 2009.

###### 3.1.1.2.1 Priprava simptomatičnega rastlinskega materiala

Ekstrakt smo pripravili v skladu z EPPO protokolom (EPPO, 1992, 2004). Rastlinski material smo površinsko sterilizirali s 70% etanolom ter ga posušili. Vzorčili smo tkivo pecljev, cvetov, plodov, listkov ter poganjkov. Pravilni izbor je tkivo na meji med zdravim in bolnim tkivom. Koščke tkiva smo dali v 1-2 mL 10 mM fosfatnega pufra z NaCl (PBS), dobro premešali ter inkubirali pri sobni temperaturi največ 20 minut. Po inkubaciji smo odvzeli ekstrakt potreben za nadaljnja testiranja.

###### 3.1.1.2.2 Priprava rastlinskega materiala brez bolezenskih znamenj

Ekstrakt smo pripravili v skladu z EPPO protokolom (EPPO, 1992, 2004). Iz vzorca smo naključno izbrali 30 poganjkov. Če je bilo v vzorcu več različnih rodov smo izbrali vejice iz vseh rodov. Iz vsake vejice smo izrezali štiri približno 1 cm dolge koščke in jih prelili z zadostno količino 10 mM fosfatnega pufra z NaCl in 0,1% Tweenom 20 (PBS Tween; pH=7,2) in inkubirali na stresalniku 90 minut pri sobni temperaturi. Po 10 min centrifugiranju pri 1500 g smo supernatant prenesli v novo centrifugirko in centrifugirali 20 min pri 7000 g. Supernatant smo odlili in usedlino resuspendirali v 2 ml 10mM fosfatnega pufra z NaCl. Vzorec je bil tako pripravljen za nadaljnjo analizo.

### 3.1.1.2.3 Testiranje simptomatičnega rastlinskega materiala

Prva presejalna metoda za analizo vzorcev je bila izolacija bakterije na gojiščih SNA (priloga 1) in King B. Morfološko sumljive bakterijske kolonije smo testirali s testom aglutinacije. Pri pozitivnem testu aglutinacije smo bakterije identificirali tudi z molekularno metodo (PCR ali vgnezdni PCR) ter potrjevali patogenost s testom na mladih plodovih hrušk ali preobčutljivostno reakcijo na tobaku. Če so imeli vzorci zelo izrazita bolezenska znamenja, pri tem pa bakterije na gojiščih nismo uspeli izolirati, smo izvedli dodaten test posredne imunofluorescence (IF) z uporabo protiteles Eam-C, proizvajalca Plant Research International (EPPO, 2004).

### 3.1.1.2.4 Testiranje rastlinskega materiala brez bolezenskih znamenj

Ekstrakte smo testirali s presejalno metodo IF na ekstraktih pred obogatitvijo v tekočem gojišču CCT (priloga 1) in King B ter z reakcijo PCR v realnem času (Salm & Geider, 2004). Pri sumljivem rezultatu vsaj enega od izvedenih presejalnih testov, smo bakterijo *E. amylovora* poskušali, po obogatitvi v tekočem gojišču CCT in King B, izolirati na ploščah CCT.

### 3.1.1.3 Suspenzija bakterije *E. amylovora* v vodi

Pripravili smo suspenzijo bakterije *E. amylovora* v sterilni vodi Milipore Mili Q-UF in s pomočjo lestvice Mcfarland in z merjenjem OD na spektrofotometru (Tecan) umerili na koncentracijo  $\approx 10^8$  celic/mL. Dejansko koncentracijo bakterije smo ocenili z štetjem celic na stekelcih IF po izvedenem testu IF in pri treh suspenzijah število preverjali tudi s določanjem CFU (enote, ki tvorijo kolonije) na gojišču King B. V izvedenih poizkusih smo uporabljali 4 suspenzije, katerih koncentracija je navedena v preglednici 5. Koncentracijo z dne 28.11.2006 smo uporabljali pri določanju meje določanja (LOD), učinkovitosti in dinamičnega območja amplikonov (točka 3.1.5), pri primerjavi različnih metod izolacije DNA (točka 3.1.7) ter pri primerjavi metode PCR v realnem času z metodo vgnezdene reakcije PCR (točka 3.1.8). Druge suspenzije smo uporabljali pri spremljanju koncentracije bakterije *E. amylovora* pri obogatitvah v gojišču CCT in King B (točka 3.2.).

Preglednica 5 : Koncentracije suspenzij bakterije *E. amylovora*, ki smo jih uporabljali v uvedbi PCR v realnem času in pri spremljanju koncentracije bakterije v obogatitvah

Table 5 : Concentrations of *Erwinia amylovora* suspensions used in developing real time PCR and following concentrations of bacteria in enrichments

Datum suspenzije	Koncentracija suspenzije določene z IF testom (celice/mL)	Koncentracija suspenzije določena z rastjo na gojišču (cfu/mL)
28.11.2006	$1,76 \times 10^n$	$1,5 \times 10^n$
15.12.2006	$1,79 \times 10^n$	$8,7 \times 10^{n-1}$
9.1.2007	$2,00 \times 10^n$	$4,1 \times 10^{n-1}$
5.6.2007	$3,58 \times 10^n$	NA

### 3.1.2 Oblikovanje začetnih oligonukleotidov in sond za PCR v realnem času

Nukleotidna zaporedja regij ams in 16S-23S ITS, pridobljena iz baze GenBank in skupine za sekvenciranje na Sanger Inštitutu, ki so dostopna na spletni strani <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/era/>, smo najprej poravnali v programu Vector NTI 9.0 (Invitrogen). Izbrali smo najbolj primerne regije, na katerih smo v programu Primer Express 2.0 načrtovali začetne oligonukleotide in sonde. Specifičnost začetnih oligonukleotidov, sonde ter celotnega amplikona smo preverili *in-silico* s primerjavo z znanimi zaporedji v bazi National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) s pomočjo programa Basic Local Alignment Tool (BLAST, konkretno smo uporabili algoritem BLASTN) (Altschul in sod., 1990).

### 3.1.3 Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času in program pomnoževanja

Za vse amplikone smo izvedli reakcije PCR v realnem času v prostornini 10  $\mu$ L: 2  $\mu$ L tarčne DNA (izolirana DNA, bakterijska suspenzija ali pa obogateni vzorci) in 8  $\mu$ L reakcijske mešanice. V primeru, da smo uporabili kemijo TaqMan je bila sestava reakcijske mešanice: 900 nM vsakega začetnega oligonukleotida, 200 nM sonde in 1 x Taqman<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), ki vključuje fluorescentno barvilo ROX<sup>™</sup> kot pasivno referenco. V primeru da smo uporabili kemijo SYBR Green je bila sestava reakcijske mešanice: 900 nM vsakega oligonukleotidnega začetnika in 1 x Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Vse reakcije smo izvedli na inštrumentu ABI PRISM 9700 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) v optičnih ploščicah formata 384, ki smo jih prekrili z optičnimi adhezivnimi folijami (Applied Biosystems). Reakcijo smo izvedli pri t.i. univerzalnih pogojih pomnoževanja (angl. universal cycling conditions): 2 minuti pri 50 °C in 10 minut pri 95 °C (aktivacija polimeraze) in nato 45 ciklov pri pogojih: 10 sekund pri 95 °C, 1 minuta pri 60 °C. V primeru SYBR Green kemije smo dodali še disociacijski protokol (95 °C 15s, 60 °C, 95 °C 15s). PCR v realnem času smo analizirali z računalniškim programom SDS 2.2.2. (Applied Biosystems).



### 3.1.4 Specifičnost metode PCR v realnem času

Specifičnost amplicona Ams, ITS in tudi amplicona na plazmidu (Salm in Geider, 2004) smo preverjali s pomnoževanjem :

- 235 sevov *E. amylovora* iz različnih geografskih območij in različnimi značilnostmi (brez plazmida pEA29, levan negativni sevi,...)
- 27 sevov drugih bakterij, ki so patogene za rastline iz družine *Rosaceae* in tudi druge izbrane patogene bakterije
- DNA 7 sevov *Pantoea agglomerans*, ki se uporabljajo za biološki nadzor
- 24 neidentificiranih bakterij, ki smo jih izolirali iz rastlinskih ekstraktov jablan, hruške in kutine
- Rastlinsko DNA iz različnih gostiteljev izolirano iz 14 vzorcev, ki so bili negativni na prisotnost bakterije *E. amylovora* s standardnimi diagnostičnimi metodami

Podroben seznam vzorcev s katerimi smo preverjali specifičnost metode PCR v realnem času z rezultati so v preglednici 9 in 10.

### 3.1.5 Določanje meje občutljivosti, učinkovitosti pomnoževanja in dinamičnega območja ampliconov

Mejo občutljivosti (LOD) smo za vse tri amplicone določali v desetkratnih serijskih redčitvah suspenzije *E. amylovora* v vodi. Razpon koncentracije bakterije je bila od  $1,8 \times 10^8$  do 18 celic/mL. Vsako redčitev smo testirali z vsemi tremi ampliconi v treh ponovitvah. Standardne krivulje, s tem da smo izrisali vrednosti Ct v odvisnosti od logaritemske vrednosti števila bakterijskih celic. Mejo občutljivosti smo določili kot tisto koncentracijo bakterije kjer smo v več kot 50 % izvedenih poskusih zaznali prisotnost tarčne DNA. Nato smo izračunali še naklon (k) in korelacijski koeficient ( $R^2$ ) linearne regresijske premice. Koeficient variacije (CV) smo uporabljali kot merilo sipanja vrednosti Ct.

Učinkovitost reakcije PCR smo izračunali iz naklona regresijske premice po enačbi (Pfaffl, 2001; Rasmussen, 2001):

$$E = (10^{[-1/k]}) - 1 \quad \dots(1)$$

Učinkovitost pomnoževanja je vrednost med 0 oz. 0 % (do pomnoževanja ni prišlo) in 1 oz. 100% (vse molekule tarčne DNA se v enem ciklu PCR v realnem času podvojijo). 100% učinkovitost ustreza naklonu  $k = - 3.33$ .

Določili smo tudi dinamično območje, to je območje linearnega odnosa med vrednostmi Ct in logaritmi koncentracij, ki omogoča kvantifikacijo.

### 3.1.6 Vpliv gostiteljske rastline na pomnoževanje DNA *E. amylovora*

Izbrali smo 16 simptomatičnih vzorcev, ki so bili s standardnimi metodami določeni kot negativni na prisotnost bakterije *E. amylovora* in sicer po dva vzorca iz jablane, hruške, panešplje, ognjenega trna, kutine, japonske kutine jerebike in gloga. DNA smo izolirali iz 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta z uporabo DNeasy Mini kita (postopek je opisan v točki 3.1.7). Izolirano DNA smo redčili 10x, 100x in 1000x. V 18  $\mu\text{L}$  neredčene DNA in v vse redčitve smo dodali po 2  $\mu\text{L}$  suspenzije *E. amylovora* v koncentraciji  $10^7$  celic/mL. Izvedli smo PCR v realnem času za vse tri amplikone v dveh reakcijah ter primerjali naklone krivulj med redčitvami.

### 3.1.7 Primerjava različnih metod izolacije DNA na rastlinskih ekstraktih

Da bi imeli zadostno količino ekstrakta, smo združili ekstrakte treh gostiteljskih rastlin: ognjenega trna, kutine in jerebike. Ekstraktom smo dodali suspenzijo bakterije *E. amylovora*, tako da so bile končne koncentracije od  $1,8 \times 10^5$  –  $1,8 \times 10^2$  celic/mL. Iz 100  $\mu\text{L}$  tako pripravljenega ekstrakta smo izolirali DNA z uporabo:

- a) DNeasy Plant mini kita (Qiagen); metodo smo izvedli po navodilih proizvajalca z modifikacijo, da smo DNA na koncu raztapljali v 2 x 50  $\mu\text{L}$  pufra TE;
- b) Izopropanolne izolacije (Llop in sod., 1999) z modifikacijo, da smo namesto 1 ml začetnega materiala uporabili 100  $\mu\text{L}$ , ki jih nismo predhodno centrifugirali;
- c) Kompletna QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) in sistema KingFisher® mL po sledečem postopku: v 100  $\mu\text{L}$  vzorca smo dodali z 400  $\mu\text{L}$  liznega pufra ter 25  $\mu\text{L}$  proteinaze K. Po 30 minutni inkubaciji pri 65 °C smo ekstrakt centrifugirali 1 min pri 6000 g. V nadaljevanju smo prenesli 300  $\mu\text{L}$  ekstrakta v stripe KingFisher® mL, ki smo jih predhodno napolnili s sledečimi komponentami
  - Luknjica 1: 500  $\mu\text{L}$  veznega pufra + 20  $\mu\text{L}$  magnetnih delcev
  - Luknjica 2 in 3: 800  $\mu\text{L}$  pufra za spiranje
  - Luknjica 4: 100  $\mu\text{L}$  pufra za raztapljanje DNA
  - Luknjica 5: 100  $\mu\text{L}$  vode

Natančen instrumentalni program aparature KingFisher® mL je zapisan v prilogi 4.

Za vsak vzorec smo izvedli PCR v realnem času v treh ponovitvah v vsaj treh ločenih analizah PCR v realnem času. Učinkovitost pomnoževanja smo izračunali iz vzorcev, ki so vsebovali  $1,8 \times 10^5$  celic/mL in njihove 10 - kratne redčitve.

### 3.1.8 Primerjava metode PCR v realnem času z metodo vgnezdene PCR

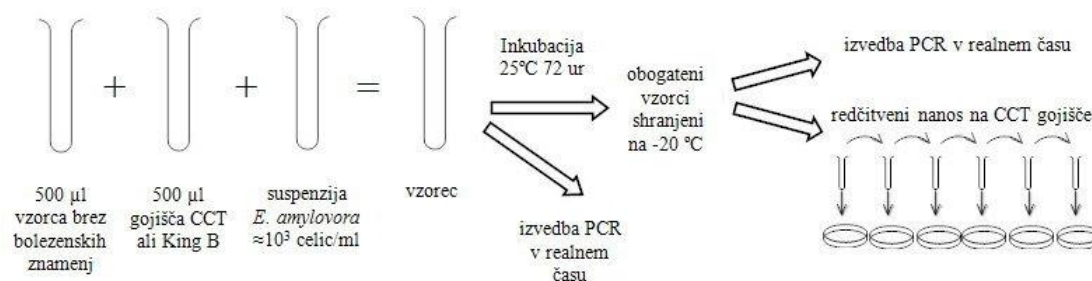
Izbrali smo 8 rastlinskih ekstraktov iz simptomatičnih vzorcev različnih gostiteljskih rastlin (jablana, hruška, panešplja, kutina, nešplja, skorš, glog in ognjeni trn). Ekstrakti so bili predhodno testirani z standardnimi metodami na prisotnost bakterije *E. amylovora* in so bili negativni. Vsak ekstrakt smo razdelili 3 x po 90  $\mu\text{L}$  in dodali 10  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterije *E. amylovora* v različnih koncentracijah. Končne koncentracije bakterije *E. amylovora* v pripravljenih vzorcih so bile  $1,8 \times 10^4$ ,  $1,8 \times 10^3$  in  $1,8 \times 10^2$  celic na mL rastlinskega ekstrakta.

DNA smo izolirali z uporabo kompleta QuickPick™ SML Plant DNA in sistema KingFisher® mL. Vsako analizo smo izvedli vsaj v 3 ponovitvah posameznega vzorca. Pri koncentracijah  $1,8 \times 10^4$  in  $1,8 \times 10^3$  celic/mL smo analizo izvedli enkrat, pri koncentraciji  $1,8 \times 10^2$  celic/mL pa dvakrat.

Vgnezdeno reakcijo smo izvajali kot je opisano v Llop in sod. (2000). PCR produkte smo analizirali na 1,5 % agaroznem gelu obarvanem z etidijevim bromidom. Vgnezdeno reakcijo smo za vse vzorce ponovili najmanj dvakrat.

## 3.2 SPREMLJANJE KONCENTRACIJE BAKTERIJE *E. amylovora* V OBOGATITVENIH GOJIŠČIH

Za spremljanje koncentracije smo uporabili 33 vzorcev brez bolezenskih znamenj, ki smo jih predhodno testirali na prisotnost *E. amylovora* s standardnimi metodami in so bili negativni. Vsak vzorec smo razdelili po 500  $\mu\text{L}$  v dve mikrocentrifugirki in v eno dodali gojišče CCT, v drugo pa gojišče King B V vse vzorce smo dodali suspenzijo bakterije *E. amylovora* v končni koncentraciji  $10^3$  celic/mL. Pred inkubacijo smo odvzeli po 50  $\mu\text{L}$  vzorca za izvedbo PCR v realnem času, preostanek pa inkubirali 72 ur pri 25 °C. Po inkubaciji smo ponovno odvzeli 50  $\mu\text{L}$  vzorca in izvedli PCR v realnem času. Shema poskusa je prikazana na sliki 10.



Slika 10: Izvedba poskusa za spremljanje koncentracije bakterije *E. amylovora* v obogatitvenih gojiščih CCT in King B ter izolacijo bakterije po obogatitvi

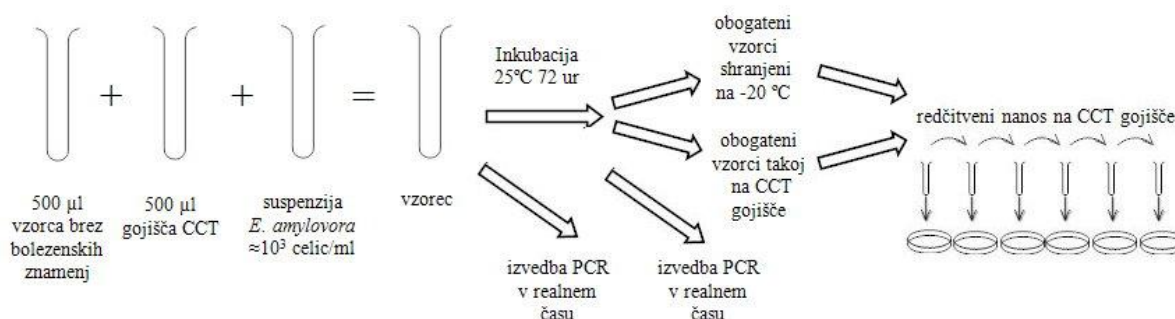
Figure 10: Design of experiment for following concentrations of bacteria *E. amylovora* in CCT and King's B enrichments and isolation bacteria after enrichment

### 3.2.1 Izolacija bakterije *E. amylovora* iz obogatenih vzorcev

Po obogatitvi v gojiščih King B in CCT smo glede na ocenjeno koncentracijo z reakcijo PCR v realnem času izvedli 4 do 8 – kratne redčitve v vodi. Na vsako gojišče CCT smo nanegli po 50  $\mu$ L neredčenega vzorca ali ustrezne redčitve. Plošče smo inkubirali 3 – 4 dni in precepljali značilne kolonije ter jih identificirali s testom aglutinacije.

### 3.2.2 Ugotavljanje vpliva zamrzovanja CCT obogatitev

Poskus smo izvedli v dveh delih in sicer smo najprej suspenzijo bakterije *E. amylovora* dodali v tekoče gojišče CCT ter inkubirali 72 ur pri 25 °C. Po inkubaciji smo pripravili sedem 10-kratnih redčitev obogatene suspenzije ter po 50  $\mu$ L vsake nanegli na plošče CCT. Postopek smo izvedli takoj po inkubaciji in po zamrzovanju suspenzije pri -20 °C. Učinek zamrzovanja smo nato testirali tudi pri izbranih 31 negativnih ekstraktih pripravljenih iz rastlin brez bolezenskih znamenj obogatenih v gojišču CCT. Po inkubaciji (25 °C, 72 ur) smo obogatene ekstrakte takoj redčili in nanegli na plošče CCT. Preostanek smo zamrznili pri -20 °C ter ponovili izolacijo na ploščah CCT. S PCR v realnem času smo analizirali vzorce pred in po obogatitvi. Shema poskusa je predstavljena na sliki 11.



Slika 11 : Izvedba poskusa za ugotavljanje vpliva zamrzovanja pri -20 °C obogatenih ekstraktov v gojišču CCT na uspešnost izolacije na ploščah CCT

Figure 11 : Design of experiment for influence of freezing enriched extracts to -20 °C in CCT media to successfulness of isolation on CCT plates

### 3.3 RAZISKAVE RAZNOVRSTNOSTI BAKTERIJ IZ RODU

#### *Pseudomonas*

##### 3.3.1 Rastlinski material

Rastlinski material z izraženimi različnimi znamenji bolezni je bil vzorčen v okviru sistematskega nadzora škodljivih organizmov rastlin Fitosanitarnе uprave RS (FURS) v sodelovanju s Fitosanitarno inšpekcijo RS. Večina testiranih vzorcev so bili poganjki jablan in hrušk in druge gostiteljske rastline iz družine rožnic, testirali pa smo tudi nekaj drugih gostiteljskih rastlin. V preliminarne raziskave smo vključili 319 sevov iz 140 vzorcev. Da bi zmanjšali število izolatov za analize, smo naredili izbor izolatov. Pri vzorcih, kjer smo izolirali več izolatov, smo le-te med seboj primerjali. Ohranili smo izolate, pri katerih smo izvedli največ analiz in izolate, ki so po kakšni analizi odstopali. Pri tem smo v večini upoštevali teste kot so BOX-PCR, 16S RFLP, teste LOPAT, test toksinov ter test patogenosti na stročjem fižolu. Določene izolate smo naknadno odstranili, ker se je izkazalo, da ne sodijo v rod *Pseudomonas* ali pa so v letih shranjevanja propadli. Izbrani izolati glede na gostiteljske rastline ter njihov delež so predstavljeni v preglednici 6.

Preglednica 6 : Prikaz število in delež izolatov glede na gostiteljske rastline

Table 6: The number and percentages of strains from different hosts

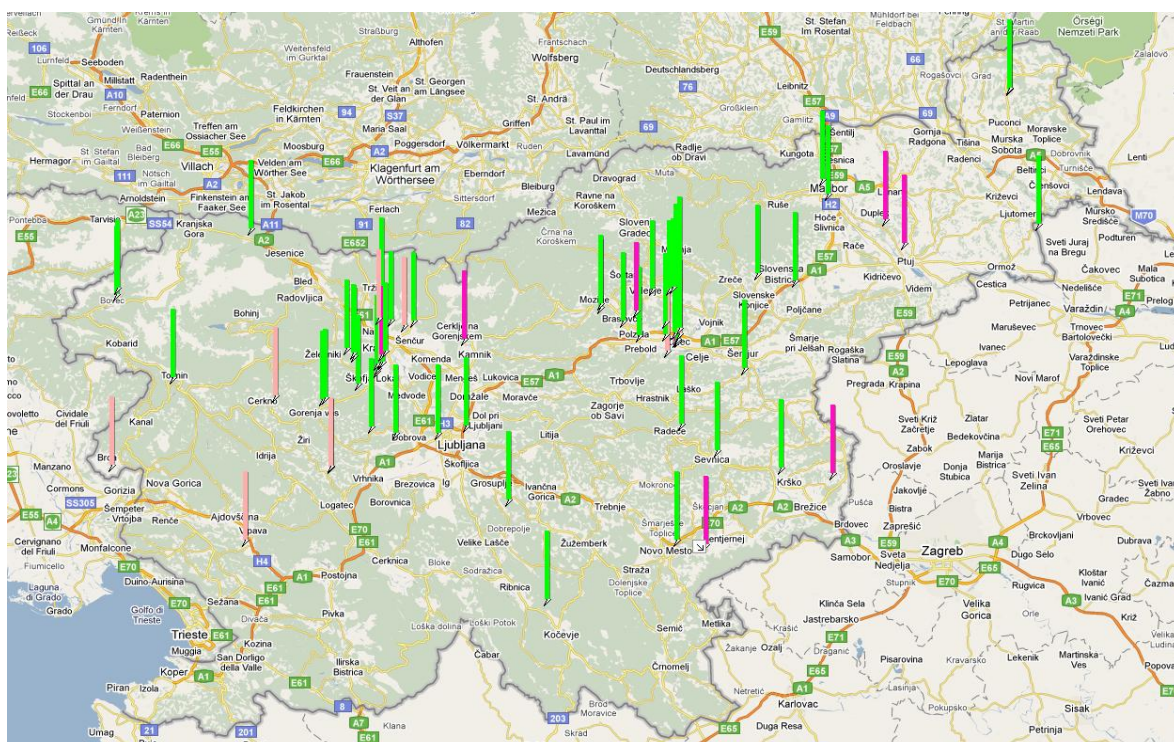
Gostitelj	Število izolatov	Delež
jablana	124	68.1%
hruška	13	7.1%
kutina	10	5.5%
panešplja	6	3.3%
ognjeni trn	2	1.1%
japonska kutina	3	1.6%
glog	2	1.1%
jerebika	3	1.6%
skorš	1	0.5%
fotinja	1	0.5%
vrtnica	1	0.5%
breskev	2	1.1%
marelica	5	2.7%
sliva	1	0.5%
radič	2	1.1%
žito	1	0.5%
fižol	3	1.6%
krizantema	1	0,5%
<b>SKUPAJ</b>	<b>181</b>	<b>100.0%</b>

Med 181 izbranimi izolati jih je bilo 80 nabranih v intenzivnem nasadu pridelovalnega in sadilnega materiala Mirozan. Razlog so bila bolezenska znamenja, ki so bila podobna okužbi z bakterijo *E. amylovora*, predvsem oranžno obarvani vršički z izcedkom enoletnih

poganjkov ter tudi zelo napredujoče okužbe starejših poganjkov. Največ vzorcev je bilo jablan sorte Breaburn.

### 3.3.1.1 Lokacija vzorčenja rastlinskega materiala

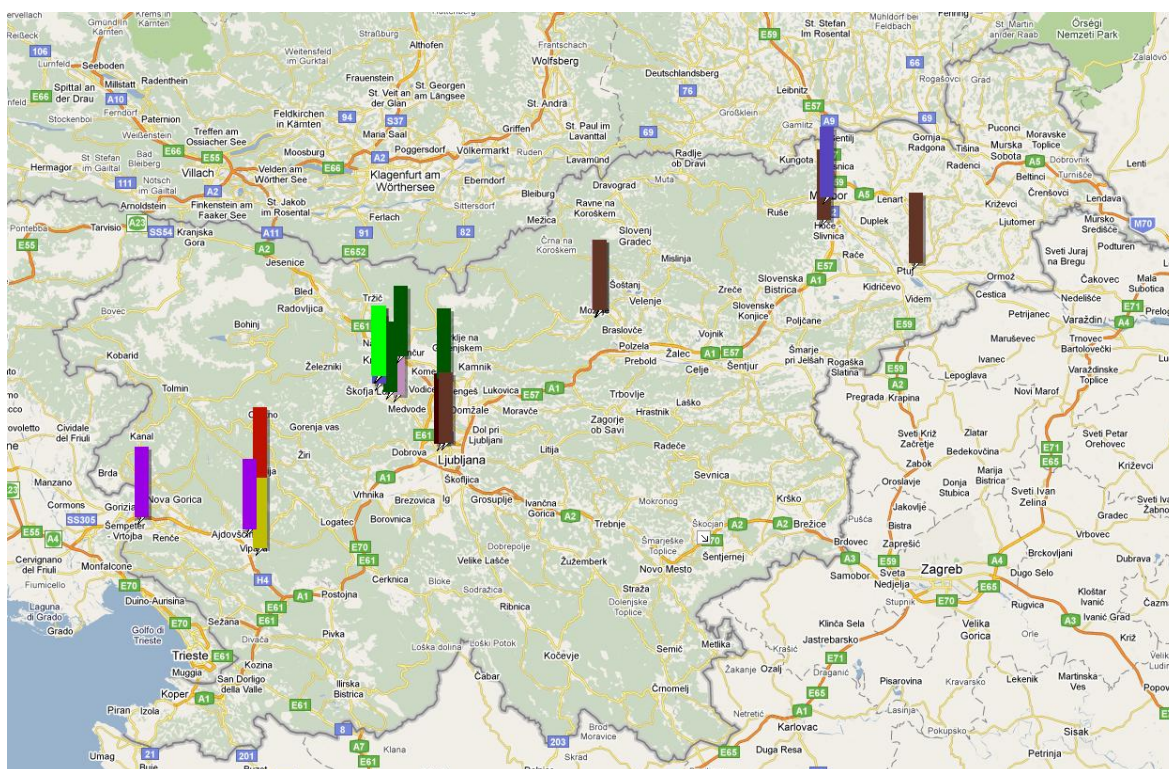
Podatke o geografski širini in geografski dolžini analiziranih izolatov smo pridobili iz podatkovne baze FitoNadzor, ki jo vzdržuje FURS in iz zapisnikov fitosanitarnih inšpektorjev pri vzorčenju vzorcev. Na slikah 12 in 13 so shematsko prikazane lokacije vzorcev iz gostiteljskih rastlin iz družine rožnic. V prikaz ni zajetih 5 vzorcev, ki so bili vzorčeni v različnih trgovskih in vrtnih centrih, ker ni razvidno ali je prišlo do okužbe rastlin pred uvozom ali po njem.



Slika 12 : Prikaz lokacij izoliranih izolatov iz vzorcev jablan, hrušk in kutin (zeleno=jablana, roza=hruška, vijolična=kutina)

Figure 12 : Locations of isolated strains from apples, pears and quinces (green=apple, pink=pear, violet=quince)





Slika 13: Prikaz lokacij izoliranih izolatov iz ostalih gostiteljskih rastlin iz družine rožnic (rjava=panešplja, temno rjava=vrtnica, temno vijolična=japonska kutina, zelena=jerebika, svetlo zelena=glog, roza=ognjeni trn, oker=breskev, rdeča=sliva, vijolična=marelica)

Figure 13: Locations of isolated strains from other hosts from family *Rosaceae* (brown=cotoneaster; dark brown=rose, dark violet=Chinese Flowering Quince, green=rowan, light green=hawthorn, pink=firethorn, ochre=peach, red=plum, violet=apricot)

### 3.3.2 Kontrolni sevi

V testih smo uporabili 39 kontrolnih bakterij različnih vrst iz rodu *Pseudomonas* in različnih patovarjev znotraj vrste *Pseudomonas syringae*. Bakterijske seve smo pridobili iz tujih zbirk mikroorganizmov in sicer iz ATCC, CFBP, GSPB, NCPPB, DSM. Seznam kontrolnih bakterij je v preglednici 7.

Preglednica 7 : Seznam kontrolnih bakterij, uporabljenih v študiji, leto izolacije, država izvora, gostiteljska rastlina ali drug izvor

Table 7 : List of used reference strains, year of isolation, country of origin, hosts plant or other source

NIB številka	Številka v tuji zbirki	Vrsta bakterije	Leto izolacije	Država izvora	Gostitelj ali izvor
NIB Z 1	NCPBP 281	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1950	Velika Britanija	<i>Syringa vulgaris</i>
NIB Z 689	NCPBP 2684	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1973	Nova Zelandija	<i>Phaseolus vulgaris</i>
NIB Z 688	GSPB 2204	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>			
NIB Z 1273	NCPBP 1321	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1961	Velika Britanija	<i>Phaseolus vulgaris</i>
NIB Z 690	GSPB 1836	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>			
NIB Z 835	CFBP 1754	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>papulans</i>	1973	Kanada	<i>Malus sylvestris</i>
NIB Z 1235	CFBP 2894	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	1980	Indija	<i>Aesculus indica</i>
NIB Z 1236	CFBP 2103	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>apii</i>	1942	ZDA	<i>Apium graveolens</i> cv. <i>Dulce</i>
NIB Z 1237	CFBP 1617	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	1959	ZDA	<i>Beta vulgaris</i>
NIB Z 1238	CFBP 2216	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	1958	Velika Britanija	<i>Avena sativa</i>
NIB Z 1239	CFBP 2067	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>helianthi</i>		Mehika	<i>Helianthus annuus</i>
NIB Z 1240	CFBP 1731	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lapsa</i>	1968		<i>Zea sp</i>
NIB Z 1241	CFBP 1657	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	1965	Nova Zelandija	<i>Brasica oleracea</i> var. <i>Botytis</i>
NIB Z 1242	CFBP 1642	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	1958	Madžarska	<i>Morus alba</i>
NIB Z 1243	CFBP 2897	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>myricae</i>	1978	Japonska	<i>Myrica rubra</i> (tige, galle)
NIB Z 1244	CFBP 2898	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>philadelphia</i>		Velika Britanija	<i>Philadelphus coronarius</i>
NIB Z 1245	CFBP 1908	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pori</i>	1978	Francija	<i>Allium porrum</i>
NIB Z 1246	CFBP 1660	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>primulae</i>		ZDA	<i>Primula sp.</i>
NIB Z 1247	CFBP 4091	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>primulae</i>	1967	Velika Britanija	<i>Primula sp.</i>
NIB Z 1248	CFBP 1674	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>striafaciens</i>			<i>Avena sativa</i>
NIB Z 1249	CFBP 2896	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1951	Japonska	<i>Hordeum vulgare</i>
NIB Z 1250	CFBP 2106	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	1959	Madžarska	<i>Nicotiana tabacum</i>
NIB Z 1251	CFBP 2353	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i>	1970	Japonska	<i>Thea sinensis</i>
NIB Z 1252	CFBP 2212	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	1960	Velika Britanija	<i>Lycopersicon esculentum</i>
NIB Z 830	CFBP 2351	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	1977	ZDA	<i>Prunus domestica</i>
NIB Z 826	CFBP 1670	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>		Jugoslavija	<i>Olea europaea</i>
NIB Z 1254	CFBP 1466	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1972	Francija	<i>Lycopersicon esculentum</i>
NIB Z 1255	CFBP 1590	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1974	Francija	<i>Prunus cerasus</i>
NIB Z 1256	CFBP 1592	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1974	Francija	<i>Pyrus communis</i>
NIB Z 1257	CFBP 2107	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1927	Švica	<i>Phaseolus sp</i>
NIB Z 1258	CFBP 2555	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1979	Francija	<i>Pyrus communis</i>
NIB Z 844	ATCC 12633	<i>Pseudomonas putida</i> A		ZDA	zemlja
NIB Z 845	CFBP 11370 alias 6176	<i>Pseudomonas putida</i> B			
NIB Z 846	ATCC 17415	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	1953	ZDA	zemlja
NIB Z 847	CFBP 2431	<i>Pseudomonas corrugata</i>	1972	Velika Britanija	<i>Lycopersicon esculentum</i>
NIB Z 849	ATCC 9446	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1943		kontaminanta na ploščah
NIB Z 1144	DSM 50090	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1951	Velika Britanija	predfilter vodnega rezervoarja
NIB Z 1233	CFBP 4060	<i>Pseudomonas avellanae</i>	1976	Grčija	<i>Corylus avellana</i>
NIB Z 1234	CFBP 2341	<i>Pseudomonas cannabina</i>	1957	Madžarska	<i>Cannabis sativa</i>

### 3.3.3 Priprava rastlinskega ekstrakta in izolacija bakterij na gojiščih

Ekstrakt smo pripravili v skladu z EPPO standardom za ugotavljanje prisotnosti bakterije *Erwinia amylovora* (EPPO, 2004) tako, da smo izbrano tkivo z izraženimi znamenji bolezni površinsko sterilizirali s 70-odstotnim etanolom, razrezali v fosfatnem pufru



(PBS), vorteksirali in po nekaj minutah odstranili rastlinski material. Pripravljen ekstrakt smo nanašali na gojišči SNA (angl. sucrose nutrient agar) in King B ter jih inkubirali 2-3 dni pri 28°C. Preostanek ekstrakta smo z dodatkom glicerola (10 vol. %) do testiranja hranili pri temperaturi -80 °C.

Za izolate, ki so morfološko ustrezali bakterijam iz rodu *Pseudomonas*, smo v nadaljevanju izvedli teste LOPAT. V letu 2003 smo shranili tako izolate, ki so reagirali preobčutljivostno na tobaku (v nadaljevanju HR pozitivni), kakor tudi tiste, ki niso (v nadaljevanju HR negativni). Zaradi našega večjega zanimanja za patogene seve iz rodu *Pseudomonas* smo po letu 2004 večinoma shranjevali in analizirali le HR pozitivne seve. V analize pa smo vključili tudi izolate, ki smo jih imeli shranjene v zbirki mikroorganizmov in so bili izolirani pred letom 2003.

### 3.3.4 Identifikacijski testi

#### 3.3.4.1 Biokemijski testi

Za vse izolate smo izvedli osnovne biokemijske teste za rod *Pseudomonas* (LOPAT; L-tvorba levana, O-oksidaža, P-pektinolitičnost, A-arginin dihidrolazni test, T-preobčutljivostna reakcija na tobaku). Na podlagi profila LOPAT lahko razdelimo izolate v posamezne skupine (preglednica 4). Izvedli smo tudi hidrolizo arbutina, želatine ter eskulina ter produkcijo kislina iz saharoze. Test fluorescence smo izvedli na gojišču King B. Pričakovani rezultati biokemijskih testov (Braun – Kiewnick in Sands, 2001; Janse, 2010) ter tvorbe toksinov pri določenih patovarjih *P. syringae* in drugih bakterijah so prikazani v preglednici 8.

Preglednica 8: Biokemijski testi in testi toksinov za razlikovanje *P. viridiflava*, *P. cichorii* in določenih patovarjev *P. syringae*

Table 8: Biochemical tests and toxins assay for discrimination between *P. viridiflava*, *P. cichorii* and some *P. syringae* pathovars

	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> <i>rasa 1</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> <i>rasa 2</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>papulans</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. cichorii</i>
Levan	+	+	+	+	-	V	-
Oksidaza	-	-	-	-	-	-	+
Pektinolitičnost	-	-	-	-	-	+	-
Arginin dihidrolaza	-	-	-	-	-	-	-
HR na tobaku	+	+	+	+	+	+	+
Hidroliza želatine	+	-	+	-	+	+	-
Hidroliza eskulina	+	-	±	-	+	+	V
Hidroliza arbutina	+	-	-	-	+	+	+
Produkcija kislina iz saharoze	+	+	+	+	+	-	-
tvorba siringomicina in siringopeptina	+ / nekaj -	-	-	-	-	-	-
tvorba koronatina	-	+ / nekaj -	-	-	-	-	-
tvorba fazeolotoksina	-	-	-	+	-	-	-

+ pozitivno, - negativno, ± variabilno/šibko, V variabilno, HR – preobčutljivostna reakcija

### 3.3.4.2 Analiza profila maščobnih kislin

Za 27 izolatov izoliranih v letu 2003 smo v sodelovanju z Plant Protection Service izvedli analizo maščobnih kislin. Izolate smo gojili na gojišču TSBA (priloga 1) 24 ur. Maščobne kisline smo ekstrahirali kot je opisano v Janse (1991). Hlapne estre maščobnih kislin smo ločevali s plinsko kromatografijo in analizirali s programskim paketom MIDI (Midi inc. Newark, USA). Profile izolatov smo primerjali med seboj in s profili drugih bakterij v knjižnici podatkov.

### 3.3.5 Inhibicija rasti bakterije *E. amylovora*

Test smo izvedli na sevih izoliranih v letu 2003. Na gojišče King B smo v črti nacepili testirani sev iz rodu *Pseudomonas* in nato po 24 urni inkubaciji na celotno gojišče nanesli še suspenzijo bakterije *E. amylovora*. Cono inhibicije smo odčitali po 72 urni inkubaciji pri 28 °C.

### 3.3.6 Odpornost na baker

Seve smo testirali na odpornost na baker tako, da smo jih gojili na gojiščih, ki so vsebovala različne koncentracije  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (Lim in Cooksay, 1993). Testirali smo koncentracije 0,3; 0,6; 0,9; in 1,2 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . Minimalna inhibitorna koncentracija je koncentracija, ki je preprečila konfluentno rast bakterij, nanesenih v koncentraciji  $10^8$  celic/mL po treh dneh inkubacije pri temperaturi 28 °C. Seve, ki so rastle na gojišču s koncentracijo 0,9 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , smo jih obravnavali kot odporne na baker. Določene izolate, ki so bili odporni na najvišjo koncentracijo bakra (1,2 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) smo dodatno testirali še pri koncentracijah 1,5; 1,8; 2,0 in 2,2 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.3.7 Test sinteze toksinov z indikatorsko glivo *Rhodotorula pilimanae*

Pri izbranih 181 izolatih in kontrolnih bakterijah smo preverili sintezo toksinov siringomicina in siringopeptina. Toksini, ki pronicajo iz bakterij, zavirajo rast indikatorske glive *Rhodotorula pilimanae*, kar je vidno v čisti coni okoli bakterijskih kolonij (Bultreys in sod., 1999, Bender in sod., 1999)

V preliminarnih testih smo preverjali delovanje metode. Pri prvih izvedbah metoda ni delovala. Gliva je po nanosu na gojišču PGNaCl zelo slabo rastla ali pa nismo opazili inhibicije glive pri kontrolnih sevih *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, za katere smo vedeli, da toksin sintetizirajo. Pri preverjanju različnih temperatur inkubacij in sestave gojišč smo prišli do ugotovitve, da je za izvedbo testa zelo ključnega pomena, da uporabljamo pri pripravi gojišča PGNaCl agar proizvajalca Difco. Po uspešni uvedbi

metode smo test izvedli v dveh delih in sicer v letu 2006 in 2009. Pri tem smo 26 sevov ponovili v obeh testih.

Končni postopek izvedbe testa toksinov je bil sledeč: vse testirane seve smo nacepili na agarju Medium 2 (priloga 1) 24 ur pri 25 °C. Nato smo vsak sev precepili v ravni črti na tri petrijeve plošče z gojiščem PGNaCl (priloga 1) ter inkubirali 4 dni pri 25 °C. Sledil je nanos glive *R. pilimanae*. Suspenzijo za nanos smo pripravili po sledečem protokolu: uporabili smo 24 urno kulturo glive *R. pilimanae* inkubirane pri 28 °C na gojišču MYA2 (priloga 1). Na petrijevo ploščo z glivo smo dodali 9 ml sterilne vode. V krogih smo premešali vodo ter nacepljeno glivo ter odlili suspenzijo v sterilno centrifugirko ter dolili sterilno vodo do skupnega volumna 50 ml.

Nanos suspenzije smo izvedli z razpršilko proizvajalca neoLab (kataloška številka 1-7246). Plošče smo gojili 48 ur pri 20 °C ter nato zmerili cone inhibicije. Rezultat testa toksinov je bil po kategorijah: 0 (neg) – ni bilo inhibicije, 1 (poz) – bistra cona inhibicije ter 2 (šibka inhibicija) – ni bistre cone, vendar inhibicija glive opazna. Pri kategoriji 1 in 2 smo tudi zmerili razdaljo inhibicije v mm.

### 3.3.8 Testi patogenosti

#### 3.3.8.1 Test patogenosti na stročjem fižolu

Test patogenosti smo izvedli pri 78 izbranih izolatih, ki so bili HR pozitivni in 4 kontrolne bakterije. Postopek izvedbe smo povzeli po Yessad in sod. (1994) in z določenimi spremembami je bil postopek sledeč:

**Priprava pladnjev:** Po dva pladnja smo zložili enega na drugega z vmesnim distančnikom (slika 14) in jih avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo na zgornjo površino pladnjev položili sterilni filter papir, v spodnji pladenj pa smo dolivali vodo, da bi povečali zračno vlago v komori.

**Priprava stročjega fižola:** Stročji fižol smo sterilizirali 5 min v 3% varikini in nato spirali 15 minut v sterilni vodi. Stroke smo posušili in nato položili na pladnje.

**Priprava bakterij:** Uporabili smo bakterijske seve, gojene 5 dni na NA gojišču (priloga 1)

**Izvedba testa:** Bakterijsko kulturo smo z iglo postrgali s plošče in vsak sev inokulirali dvakrat na polovico stročjega fižola (3 – 4 vbode na strok; skupaj 6 – 8 vbodov za vsak testiran sev).

**Inkubacijske razmere:** Temperatura podnevi in ponoči je bila 21 °C, fotoperioda 16 ur dan in 8 ur noči.

**Popis bolezenskih znamenj:** Bolezenska znamenja smo beležili 2., 4., 6., 9. in 13. dan. Ker so bolezenska znamenja zelo počasi napredovala in pri vseh vzorcih enakomerno, smo analizirali rezultate samo po 13 dneh inkubacije. Pri vsakem vzorcu smo med inkubacijo spremljali tip bolezenskih znamenj (rjave nekroze, vodni madeži, rjave pikice ob vbodu) ter jakost bolezenskih znamenj ocenili z primerjavo med vzorci (majhne, srednje in velike nekroze). Na koncu smo imeli za vsak vzorec dve kategoriji podatkov.

#### Ocena glede na tip bolezenskih znamenj

- 0 – po 13 dneh ni bilo vidnih bolezenskih znamenj razen nekroze ob mestu vboda
- 1 – vzorec je pri vseh pregledih imel rjave nekroze
- 2 – vzorec je pri vseh pregledih imel vodne madeže
- 3 – vzorec je imel najprej vodne madeže in nato so se spremenili v rjave madeže
- 4 – vzorec je imel ob vbodu in okoli njega rjave pikice

#### Ocena glede na jakost bolezenskih znamenj

- 0 - po 13 dneh ni bilo vidnih bolezenskih znamenj razen nekroze ob mestu vboda
- 1 – vzorec je imel vsaj nekaj vbodov z majhno nekrozo ( $\approx 2$  mm)
- 2 – vzorec je imel vsaj nekaj vbodov z srednjo nekrozo ( $\approx 3-4$  mm)
- 3 - vzorec je imel vsaj nekaj vbodov večjo nekrozo (nad  $\approx 4$  mm)



Slika 14 : Izvedba testa patogenosti na stročjem fižolu.

Figure 14: Pathogenicity test on bean pods

### 3.3.8.2 Test patogenosti na plodovih hruške sorte Conference

Test patogenosti smo izvedli pri 181 izbranih izolatih in 38 kontrolnih bakterijah. Štiri bakterijske seve smo v istem poizkusu testirali dvakrat. Postopek izvedbe smo povzeli po Yessad in sod. (1992). Z določenimi spremembami je bil postopek sledeč:

**Priprava posodic:** Za test patogenosti smo uporabili sterilne posodice (Golias) in vanjo položili po dva sterilna filter papirja. V vsako posodico smo dodali 10 ml sterilne vode ter jo napolnili s 3 – 4 hruškami

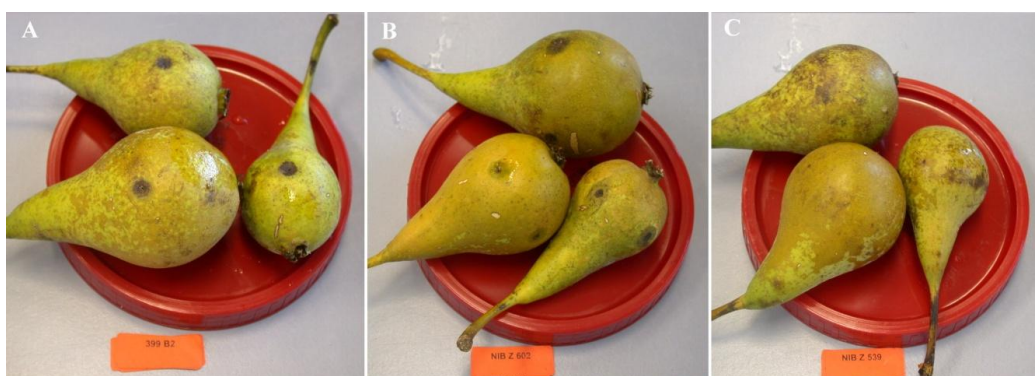
**Priprava hrušk:** Hruške smo nabrali 9. 7. 2009 in smo jih do izvedbe testa hranili v hladni sobi 4 tedne pri 4 °C. Nato smo jih sterilizirali v 1% varikini in trikrat spirali z vodo Mili-QUF ter posušili v laminariju

**Priprava bakterij:** Bakterijske seve smo do izvedbe testa gojili 24 ur pri 25 °C na gojišču King B.

**Izvedba testa:** Bakterijsko kulturo smo z iglo postrgali s plošče in vsako hruško 4-krat vbodli. Z vsakim sevom smo inokulirali najmanj 3 hruške.

**Inkubacijske razmere:** Posodice smo inkubirali v rastni komori v temi pri 26 °C in zračni vlagi 100%.

**Popis bolezenskih znamenj:** Po 6 dneh inkubacije smo pregledali vse inokulirane hruške ter vzorce, kjer ni nobena hruška kazala nekroz ob mestu vboda po slikanju zavrgli. Druge vzorce smo inkubirali še dodatnih 24 ur in nato izmerili obseg nekroz ob vsakem vbodu. Pri določenih vzorcih smo opazili tudi klorotičen prstan okoli nekroze (slika 15).



Slika 15: Test patogenosti na plodovih hruške Conference. A) Nekroza ob mestu vboda, B) Nekroza ob mestu vboda s klorotičnim prstanom, C) Brez bolezenskih znamenj na mestu vboda

Figure 15: Pathogenicity test on immature pear fruits Conference. A) Necrosis at inoculation point, B) Necrosis at inoculation point with chlorotic ring, C) No symptoms at inoculation points

**Obdelava rezultatov:** Po izmeri nekroz vseh vbodov smo naredili frekvenčni diagram na podlagi katerega smo se odločili za 7 razredov bolezenskih znamenj t.i. indeksov patogenosti (I) s katerimi smo želeli kvantificirati intenziteto okužbe posameznih sevov. Skala indeksov patogenosti je bila sledeča:

- 0 – ni bolezenskih znamenj
- 1 – nekroza na mestu vboda
- 2 – nekroza od 1 – 2 mm
- 3 - nekroza 2 – 3 mm
- 4 - nekroza 3 – 4 mm
- 5 – nekroza 4 – 5 mm
- 6 – nekroza od 5 mm naprej

Za vsak testiran izolat smo izračunali patogenost (P) po sledeči formuli (Moragrega in sod., 2003):

$$P = \frac{\sum_{n=1}^N I_n}{N \cdot I_{max}} \times 100 \quad \dots(2)$$

kjer  $I_n$  ustreza indeksu patogenosti, N je število vbodov za določen izolat in  $I_{max}$  je maksimalni indeks patogenosti (v našem primeru 6).

Kriterij za označitev izolata kot patogen (1), nepatogen (0) ali sumljiv (2) je bil povzet po Yessad in sod. (1992) in je bil sledeč:

- 0 – vsi vbodi so bili brez bolezenskih znamenj
- 1 – vsaj 40% vbodov je imelo napredujoča bolezenska znamenja (razred 2-6)
- 2 – vsaj en vbod je imel bolezenska znamenja

### 3.3.8.3 Test patogenosti na listih hruške sorte Conference

Test patogenosti smo izvedli pri 181 izbranih izolatih in 39 kontrolnih bakterijah. Postopek izvedbe smo povzeli po Yessad in sod. (1992) in z določenimi spremembami je bil postopek sledeč:

**Priprava plošč:** Uporabili smo petrijeve plošče s premerom 14 cm. V vsako ploščo smo nalili po 80 ml vodnega agarja (agar Difco (10 g/L) ter nanj položili sterilni filter papir.

**Priprava listkov:** Listke mladih poganjkov smo nabrali 20. 8. 2009 ter jih do naslednjega dne hranili v hladni sobi pri 4 °C. Sterilizirali smo jih 5 minut v 1% varikini in nato spirali trikrat v vodi Mili-QUF. Posušili smo jih v laminariju in nato položili v petrijeve plošče.

**Priprava kulture:** Vse testirane seve smo predhodno gojili 24 ur v tekočem gojišču King B pri 25 °C. Za inokulacijo listkov smo vse seve s pomočjo lestvice po Mcfarlandu in merjenjem OD na spektrofotometru (Tecan) umerili na koncentracijo  $10^8$  cfu/mL.

**Izvedba testa:** Na dnu vsakega listka v glavno listno žilo naredili rez dolg 0,5 cm in na rano odpipetirali po 20 µL umerjene bakterijske suspenzije. Petrijeve plošče smo ovili s parafinskim trakom. Vsak bakterijski sev smo inokulirali na 4 – 5 listkov.

**Inkubacijske razmere:** Petrijeve plošče smo inkubirali pri fotoperiodi 16 ur dan pri 24 °C / 8 ur noči pri 20 °C.

**Popis bolezenskih znamenj:** Po 4 dnevih inkubacije smo pregledali in slikali vse listke in listke brez bolezenskih znamenj označili z 0, listke z nekrozo omejeno na mesto inokulacije z 1 ter pri listkih z napredujočo nekrozo ocenili procent nekrotične površine s programom ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>).

**Obdelava rezultatov:** Po izmeri vseh površin nekroz pri listih z napredujočo okužbo smo le te na podlagi frekvenco pojavljanja med vsemi listki razdelili v dodatne razrede:

- 2 – nekrotična površina med 1% - 2%;
- 3 – nekrotična površina med 2% - 5%;
- 4 – nekrotična površina med 5% - 10%;
- 5 – nekrotična površina med 10% - 20%;
- 6 – nekrotična površina med 20% - 50%;
- 7 – nekrotična površina nad 50%.

Za vsak testiran izolat smo izračunali patogenost (P) kakor smo to naredili pri testu patogenosti na plodovih hruške in tudi kriterij za označitev izolata kot patogen (1), nepatogen (0) ali sumljiv (2) je bil enak:

- 0 – vsi listki so bili brez bolezenskih znamenj
- 1 – vsaj 40% listov je kazalo napredujoča bolezenska znamenja (razred 2 – 7)
- 2 – vsaj en listek je imel bolezenska znamenja

### 3.3.9 Molekularne metode

#### 3.3.9.1 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA (16S rDNA RFLP) z encimoma *RsaI* in *MnII*

16Sr DNA RFLP z encimoma *RsaI* in *MnII* smo izvedli pri 77 izbranih sevih in pri kontrolni bakteriji *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

DNA smo izolirali s 5 % Chelexom (BioRad) po sledečem postopku: v 100  $\mu$ L 5% Chelexa smo dodali 1  $\mu$ L zanko kulture ter z vorteksom premešali, kuhali v vreli vodi 10 minut, centrifugirali 15 minut pri 14000 rpm (centrifuga Eppendorf) ter supernatant prenesli v svežo mikrocentrifugirko.

Za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo uporabili evbakterijske začetne oligonukleotide za 16S rDNA (27fevb in 1495revb; Bianciotto in sod., 1996), pri čemer dobimo 1500 bp dolge fragmente. Zaporedje začetnih oligonukleotidov, sestava reakcijske mešanice ter program pomnoževanja so podani v prilogi 2.

Produkt PCR 16S rDNA smo razrezali z encimoma *RsaI* in *MnII*. Restrikcijsko mešanico (priloga 2) smo inkubirali pri 37 °C čez noč. Restrikcijske fragmente smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo v pufru 1xTAE (2,5% agaroz, 80V, 75 min).

Za primerjavo smo naredili tudi *in-silico* analizo restrikcije z obema encimoma z zaporedji 16S rDNA različnih bakterij iz rodu *Pseudomonas* pridobljenih iz GeneBank. Za analizo smo uporabili program Vector NTI (Informax).

#### 3.3.9.2 Repetitivni PCR z BOX1A oligonukleotidnim začetnikom (BOX-PCR)

Analizo smo izvedli pri 181 izbranih sevih in 39 kontrolnih bakterijah. Za izvedbo reakcije PCR smo iz bakterijskih sevov izolirali DNA s 5% chelexom ali z uporabo UltraClean™ Microbial DNA Isolation kita (MO-BIO) po protokolu proizvajalca ali z alkalno lizo. Postopek alkalne lize je bil sledeč: v 500  $\mu$ L vode smo dodali 1  $\mu$ L zanko kulture, vorteksirali ter centrifugirali 2 min pri 10000 g. Ostranili smo supernatant in v mikrocentrifugirko dodali 100  $\mu$ L 0,5M NaOH ter inkubirali 15 min pri 95 °C. Nato smo centrifugirali 2 min pri 10000 g in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. DNA, izolirano z alkalno lizo ali z uporabo UltraClean™ Microbial DNA Isolation kita smo umerili z Nanodropom na 50 mg/ $\mu$ L. DNA sevov, ki je bila izolirana v letu 2003 z uporabo 5% chelexa, nismo umerili.

Reakcijo PCR in program pomnoževanja smo izvedli po protokolu (Rademaker in sod., 1998). Produkta PCR smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo v pufru 0,5xTAE (1,5% agaroz, 70V, 17 ur v hladni sobi). Uporabili smo agarozo UltraPure (Invitrogen). Po elektroforezi smo gele barvali z etidijevim bromidom (EtBr). V 1 L 0,5xTAE pufru smo dodali 60  $\mu$ L EtBr (založna raztopina 10 mg/mL) ter barvali 30 minut s stresanjem. Sledilo je 30 min razbarvanja v Mili-QUF.

Analiza podatkov je potekala z programom Bionumerics. Normalizacija gelov je potekala v skladu z navodili programa. Primerjava prstnih odtisov DNA pri različnih sevih je



potekala na podlagi denzitometričnih krivulj in za izdelavo matrike podobnosti smo uporabili Pearsonovo korelacijo. Nastavitve so bile 1% optimizacija in poravnava krivulj (angl. curve smoothing) 2,5%. Za izris dendrograma smo uporabili metodo neponderirane aritmetične sredine (UPGMA).

### 3.3.10 Obdelava podatkov

Podatke smo obdelali z računalniškim programom Bionumerics 6.01 (Applied Maths). Za analizo BOX-PCR smo v program vnesli slike gelov, za vse druge podatke smo jih vnesli kot numerične vrednosti. Numerične vrednosti analiziranih rezultatov in ostali podatki o izoliranih sevih so zbrani v prilogi 10. Legenda tabele je prikazana v preglednici 9.

Preglednica 9: Legenda tabele v prilogi 10

Table 9: Legend of table in annex 10

Test	Oznaka v tabeli priloge 10	Oznaka stolpca v tabeli priloge 10	Oblika rezultata		
Tvorba fluorescentnega pigmenta	Fluorescenca	N	0 - negativno	1 - pozitivno	
Produkcija kisline iz saharoze	Kislina iz saharoze	O	0 - negativno	1 - pozitivno	
Hidroliza arbutina	Arbutin	P	0 - negativno	1 - pozitivno	
Hidroliza eskulina	Eskulin	Q	0 - negativno	1 - pozitivno	2 - dvomljivo
Hidroliza želatine	Želatina	R	0 - negativno	1 - pozitivno	
LOPAT (L-tvorba levana, O-oksidaza, P-pektinolitičnost, A-arginin dihidrolazni test, T-preobčutljivostna reakcija na tobaku)	Levan	S	0 - negativno	1 - pozitivno	2 - variabilno
	Oksidaza	T	0 - negativno	1 - pozitivno	
	Pektat	U	0 - negativno	1 - pozitivno	2 - variabilno
	Arginin	V	0 - negativno	1 - pozitivno	
	HR	W	0 - negativno	1 - pozitivno	
skupina LOPAT	X	la, lb, la ali lb, la ali pektinolitični la, II, III, Iva, Vb, nedefinirani			
Test sinteze toksinov	Rezultat	Y	0 - negativno	1 - pozitivno	2 - šibka inhibicija
	Povprečna cona inhibicije	Z	vrednost od 0 - 32		
Test patogenosti na stročjem fižolu	Tip bolezenskih znamenj	AA	vrednost od 0 - 4 (razlaga pod točko 3.3.8.1)		
	Jakost bolezenskih znamenj	AB	vrednost od 0 - 3 (razlaga pod točko 3.3.8.1)		
Test patogenosti na plodovih hruške sore Conference	Patogenost	AC	Vrednost od 0 - 100		
	Rezultat	AD	0 - nepatogen	1 - patogen	2 - sumljiv
Test patogenosti na listih hruške sorte Conference	Patogenost	AE	Vrednost od 0 - 100		
	Rezultat	AF	0 - nepatogen	1 - patogen	2 - sumljiv
Analiza prstnih odtisov DNA z BOX-PCR	Skupina BOX	AG	vrednost od 1-33		
Test odpornosti na baker	Odpornost na baker	AH	vrednost od 0 - 2,2		
Polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA	RFLP: Rsa + dolžina produkta	AI - AM	Rsa 897, 802, 357, 146, 121		
	RFLP: Mnl + dolžina produkta	AN - AW	Mnl 418, 330, 281, 261, 253, 238, 187, 157, 126, cca 100		
	Restriksijski profil	AX	Rsa 1 Mnl 1, Rsa 1 Mnl 2, Rsa 2 Mnl 2, Rsa 2 Mnl 3, Rsa 2 Mnl 4		
Analiza profila maščobnih kislin	Oznaka maščobnih kislin	AY - CA	Odstotek posamezne maščobne kisline (0 - 100%)		

### 3.3.10.1 Uporaba Simpsonovega indeksa diverzitete za izračun diskriminatorne sposobnosti uporabljenih metod

Za izračun diskriminatorne sposobnosti uporabljenih metod smo uporabili Simpsonov indeks diverzitete. Indeks ima vrednost od 0 – 1 in večja kakor je vrednost, večja je diskriminatorna sposobnost metode (Hunter in sod., 1988). Indeks temelji na verjetnosti, da se dva nesorodna seva iz populacije razporedita v različne tipizacijske skupine. Simpsonov indeks diverzitete smo izračunali po sledeči formuli:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1) \quad \dots(3)$$

Kjer je  $N$  skupno število analiziranih sevov,  $S$  je skupno število tipizacijskih skupin in  $n_j$  je število sevov, ki pripada  $j$  tipu.

## 4 REZULTATI

Za razvoj metode PCR v realnem času smo načrtovali dva amplikona na različnih delih kromosomske DNA bakterije *E. amylovora*. Z razvojem nove metode smo želeli zaznati širši spekter sevov bakterije *E. amylovora*, pridobiti občutljivo in specifično metodo za zanesljivo ugotavljanje prisotnosti te bakterije v vzorcih brez izraženih bolezenskih znamenj, uporabiti metodo kot dodatni test pri vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji ter z zmožnostjo kvantifikacije spremljati koncentracijo bakterije v obogatitvenih gojiščih.

Bakterije iz rodu *Pseudomonas* smo pogosto izolirali iz rastlinskih vzorcev, ki so kazali znake ožiga. Uporabili in uvedli smo različne metode z namenom identifikacije in ugotavljanje raznolikosti teh bakterij.

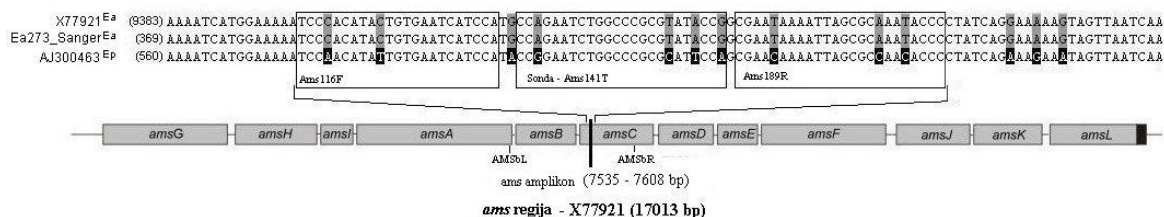
### 4.1 PCR V REALNEM ČASU ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJE *E. amylovora*

#### 4.1.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in sond za PCR v realnem času

Amplikon Ams smo načrtovali znotraj gena *amsC*, ki je del regije *ams* na kromosomski DNA bakterije *E. amylovora*. Regija je vpletena v sintezo kapsularnega polisaharida amilovorana. Amplikon je znotraj regije, ki jo pomnožujemo z oligonukleotidnima začetnikoma AMSbL in AMSbR (Bereswill in sod., 1995), ki se uporabljata za ugotavljanje prisotnosti *E. amylovora* z navadno reakcijo PCR. S primerjavo sekvenc smo preverili, da začetna oligonukleotida in sonda ne nalegajo na del genoma sorodne bakterije *E. pyrifoliae*, ki ima genski zapis za podoben polisaharid.

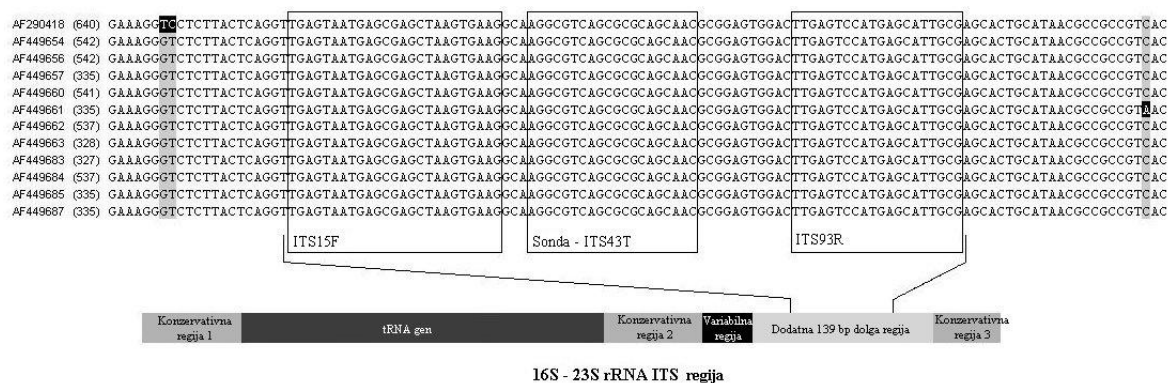
Amplikon ITS smo načrtovali znotraj 139 bp dolgega nukleotidnega zaporedja, ki se pojavlja kot dodatna regija na določenih rRNA operonih (McGhee in sod., 2002).

Na slikah 16 in 17 sta amplikona shematsko prikazana skupaj s poravnavo nukleotidnih zaporedi, ki so bila uporabljena pri načrtovanju amplikonov. Natančna zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond pa prikazana v preglednici 10.



Slika 16: Shematski prikaz amplicona Ams s poravnanimi nukleotidnimi zaporedji regije *ams* bakterije *E. amylovora* (okrajšava Ea) in regije *cps* bakterije *E. pyrifoliae* (okrajšava Ep)

Figure 16: Schematic presentation of the Ams amplicon within aligned nucleotide sequences of the *ams* region of *Erwinia amylovora* (suffix Ea) and *Erwinia pyrifoliae* (suffix Ep)



Slika 17: Shematski prikaz amplicona ITS s poravnanimi nukleotidnimi zaporedji regije 16S – 23S rRNA ITS, ki vsebuje 139 bp dolgo dodatno zaporedje znotraj operona 16S - 23S rRNA ITS *E. amylovora*

Figure 17: Schematic representation of ITS amplicon within available *Erwinia amylovora* nucleotide sequences of the 16S - 23S rRNA ITS regions containing optional 139 bp region within 16S - 23S rRNA ITS operon

Preglednica 10 : Začetni oligonukleotidi in sonda amplicona Ams in ITS

Table 10: Primers and probes for Ams and ITS amplicons

Amplikon	Oligo/sonda	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Dolžina amplicona	Tarča
Ams	Ams116F	TCC CAC ATA CTG TGA ATC ATC CA	74 bp	Gen <i>amsC</i>
	Ams189R	GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG		
	Ams141T	FAM-CCA GAA TCT GGC CCG CGT ATA CCG-TAMRA		
ITS	ITS15F	TGA GTA ATG AGC GAG CTA AGT GAA G	79 bp	Regija 16S-23S rRNA ITS
	ITS93R	CGC AAT GCT CAT GGA CTC AA		
	ITS43T	FAM-AGG CGT CAG CGC GCA GCA AC-TAMRA		

Specifičnost začetnih oligonukleotidov, sonde ter celotnih amplikonov smo preverili *in silico* s primerjavo z znanimi zaporedji v bazi podatkov GenBank s pomočjo programa BLAST.

#### **4.1.2 Specifičnost metode PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti *E. amylovora***

Rezultati pomnoževanja s PCR v realnem času pri različnih sevih bakterije *E. amylovora* so pokazali, da so vsi trije amplikoni specifični in rezultati ustrezajo značilnostim tarčne regije (preglednica 11). Pri vseh testiranih sevih *E. amylovora* smo dobili pozitiven signal pri pomnoževanju z amplikonom Ams. To pomeni, da smo s tem amplikonom zajeli več sevov *E. amylovora* kakor s plazmidnim amplikonom, kjer nismo dobili specifičnega signala pri sevih brez plazmida pEA29 na katerega ti začetni oligonukleotidi in sonda nalegajo. Kakor pričakovano, tudi pri amplikonu ITS nismo dobili pozitivnega signala pri sevih *E. amylovora* iz Rubusa. Razlog je v tem, da naj ti sevi ne bi vsebovali dodatnega zaporedja dolgega 139 bp na operonu 16S-23S rRNA (McGhee in sod, 2002), kjer smo načrtovali začetne oligonukleotide in sondo.

Posebnost so rezultati pomnoževanja pri treh sevih iz rodu *Erwinia*, ki so bili izolirani iz hrušk na Japonskem (Hokkaido). Ti sevi so taksonomsko uvrščeni med *E. amylovora* in *E. pyrifoliae*, saj imajo določene lastnosti od ene in določene od druge bakterijske vrste (Kim in sod., 2001; Maxson-Stein in sod., 2003). Tako smo dobili pozitiven signal pri pomnoževanju z amplikonom ITS in negativnega z Ams in plazmidnim amplikonom.

Nespecifično pomnoževanje smo preverjali pri različnih bakterijskih vrstah, ki so prisotne in povzročajo bolezenska znamenja na rastlinah iz družine rožnic ali na ostalih gostiteljskih rastlinah, različne seve bakterije *Pantoea agglomerans*, ki se uporabljajo za biološki nadzor ter neidentificirane bakterijske seve, ki smo jih izolirali iz nekrotizirajočega rastlinskega tkiva jablane, hruške in kutine. Poleg tega smo testirali tudi izolirane rastlinske DNA iz različnih gostiteljskih rastlin. Pri nobenem testiranem sevu ali DNA nismo opazili nespecifičnega pomnoževanja (preglednica 12).

Preglednica 11: Rezultati PCR v realnem času z uporabo kemije TaqMan pri različnih sevih *E.amylovora*Table 11: Results of real-time PCRs using TaqMan chemistry in different *E. amylovora* strains

Sevi <i>E. amylovora</i>	Gostiteljska rastlina	Izvor in leto izolacije	Rezultati PCR v realnem času		
			Plazmid*	ITS**	Ams**
219 sevov	<i>Malus domestica</i> , <i>Pyrus communis</i> , <i>Cydonia oblonga</i> , <i>Cotoneaster</i> sp., <i>Photinia</i> sp., <i>Crataegus</i> sp.	Slovenija, 2007	+	+	+
NCPBB 311	<i>Pyrus communis</i>	Kanada, 1952	+	+	+
NCPBB 2791	<i>Pyrus communis</i>	ZDA, 1975	+	+	+
NCPBB 683 <sup>T</sup>	<i>Pyrus communis</i>	Velika Britanija, 1959	+	+	+
NCPBB 4306	<i>Pyrus communis</i>	Egipt, 1982	+	+	+
NCPBB 775	<i>Crataegus</i> sp.	Velika Britanija, 1959	+	+	+
CFBP 1367	<i>Crataegus</i> sp.	Francija, 1972	+	+	+
LMG2020 – ne sintetizira levan	<i>Pyrus communis</i>	Nizozemska, 1981	+	+	+
ICMP 13293 <sup>b</sup>	<i>Cotoneaster</i> sp.	Avstralija, 1997	+	+	+
MB1 <sup>b</sup>	<i>Prunus domestica</i>	Nemčija, 2000	+	+	+
MB2 <sup>b</sup>	<i>Rosa rugosa</i>	Nemčija, 2000	+	+	+
Pear 8 <sup>b</sup>		Nova Zelandija, 1992	+	+	+
RGC 53 mukoidna <sup>b</sup>		Nova Zelandija, 1991-92	+	+	+
RGC 53 nemukoidna <sup>b</sup>		Nova Zelandija, 1991-92	+	+	+
IVIA 1596 brez pEA29	<i>Pyrus communis</i>	Španija, 1996	-	+	+
IVIA 1614-2 brez pEA29	<i>Crataegus</i> sp.	Španija, 1996	-	+	+
NCPBB 1859	<i>Rubus idaeus</i>	ZDA, 1966	+	-	+

\* Metoda PCR v realnem času s tarčo na plazmidu pEA29 (Salm in Geider, 2004)

\*\* Metoda PCR v realnem času s tarčo na kromosomski DNA, razvita tej doktorski disertaciji

Seve bakterije *E. amylovora* iz preglednice 11 in različne bakterijske vrste iz preglednice 12 smo pomnoževali z SYBRGreen kemijo in talilno temperaturo produkta po disociacijskem koraku primerjali z referenčnim sevom *E. amylovora*. Pozitiven signal s kemijo SYBRGreen smo dobili skoraj pri vseh testiranih bakterijskih sevih iz obeh preglednic. Med specifičnimi in nespecifičnimi produkti smo ločili z analizo talilne temperature po disociacijskem koraku. Odstopali so le označeni sevi iz preglednice 12; če smo pomnoževali z oligonukleotidnimi začetniki Ams, smo ugotovili, da je talilna temperatura produktov enaka pri sevih iz rodu *Erwinia* iz nekrotičnih cvetov hrušk, *E. pyrifoliae* ter pri sevih *E. amylovora*. V primeru, da smo pomnoževali z oligonukleotidnimi začetniki ITS, je bila talilna temperatura produktov enaka pri sevih *E. amylovora* in sevih iz rodu *Erwinia* iz Hokkaida, kjer smo dobili pozitiven signal tudi z uporabo kemije TaqMan.

Preglednica 12: Rezultati PCR v realnem času z uporabo TaqMan kemije pri različnih bakterijskih sevih in izolirani

Table 12: Results of real-time PCRs using TaqMan chemistry in different bacterial strains and extracted DNA

<i>Sevi ostalih bakterij in izolirana DNA</i>	<i>Gostiteljska rastlina</i>	<i>Izvor in leto izolacije</i>	<i>Rezultati PCR v realnem času</i>			
			<i>Plazmid*</i>	<i>ITS**</i>	<i>Ams**</i>	
<b>Sevi iz rodu</b>	IVIA 2055-2	<i>Pyrus communis</i>	Španija, 1999	-	-	***
<b>Erwinia</b>	IVIA 2056-4	<i>Pyrus communis</i>	Španija, 1999	-	-	***
<b>izolirani iz nekrotičnih svetov hrušk<sup>c</sup></b>	IVIA 2057-5	<i>Pyrus communis</i>	Španija, 1999	-	-	***
	IVIA 3978	<i>Pyrus communis</i>	Španija, 2000	-	-	***
<b><i>Erwinia pyrifoliae</i></b>						
	CFBP 4172 <sup>T</sup>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Južna Koreja, 1996	-	-	***
<b>Sevi iz rodu</b>	223b	<i>Pyrus communis</i> (Barlett)	Hokkaido, 1996	-	+	***
<b>Erwinia iz</b>	J.41	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	Hokkaido, 1995	-	+	***
<b>Hokkaido, Japonska<sup>b</sup></b>	J.71	<i>Pyrus ussuriensis</i> (Mishirazu)	Hokkaido, 1995	-	+	***
<b><i>Erwinia billingiae</i></b>						
	DSMZ 17872 <sup>T</sup>	<i>Pyrus communis</i>	Velika Britanija, 1959	-	-	-
<b><i>Erwinia tasmaniensis</i></b>						
	DSMZ 17950 <sup>T</sup>	<i>Malus domestica</i>	Tasmanija, 1999	-	-	-
<b><i>Erwinia sp.</i></b>						
		<i>Pyrus pyrifolia</i>	Avstralija	-	-	-
<b><i>Pectobacterium atrosepticum</i></b>						
	Kr 20			-	-	-
<b><i>Dickeya chrysanthemi</i></b>						
	NCPBP 402 <sup>T</sup>	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	ZDA, 1956	-	-	-
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>						
	5 sevov (HR pozitivni)	<i>Pyrus communis</i> , <i>Cydonia oblonga</i> , <i>Cotoneaster sp.</i> , <i>Pyracantha sp.</i>	Slovenija, 2003	-	-	-
	5 sevov (HR negativni)	<i>Malus domestica</i> , <i>Sorbus sp.</i> , <i>Chaenomeles sp.</i> , <i>Crateagus sp.</i>	Slovenija, 2003	-	-	-
<b><i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i></b>						
	NCPBP 281 <sup>T</sup>	<i>Syringa vulgaris</i>	Velika Britanija, 1950	-	-	-
	NCPBP 2684	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nova Zelandija, 1973	-	-	-
<b><i>Pseudomonas syringae pv. morsprunorum</i></b>						
	CFBP 2351	<i>Prunus domestica</i>	ZDA, 1977	-	-	-
<b><i>Pseudomonas syringae pv. papulans</i></b>						
	CFBP 1754	<i>Malus sylvestris</i>	Kanada, 1973	-	-	-
<b><i>Pantoea agglomerans</i> (DNA biokontrolnih sevov)<sup>b</sup></b>						
	Eh252, Eh318, C9-1, P5d, A9c, P5a, P10-c			-	-	-
<b>DNA izolirana iz rastlinskih vzorcev</b>						
	14 vzorcev	<i>Malus domestica</i> , <i>Pyrus communis</i> , <i>Cydonia oblonga</i> , <i>Cotoneaster sp.</i> , <i>Crateagus sp.</i> , <i>Pyracantha sp.</i> , <i>Sorbus sp.</i> , <i>Chaenomeles sp.</i>	Slovenija, 2003-2005	-	-	-
<b>24 bakterijskih sevov izoliranih iz nekrotizirajočega rastlinskega tkiva jablane, hruške in kutine</b>						
				-	-	-

\* Metoda PCR v realnem času s tarčo na plazmidu pEA29 (Salm in Geider, 2004)

\*\* Metoda PCR v realnem času s tarčo na kromosomski DNA, razvita tej doktorski disertaciji

\*\*\* Rezultati talilne temperature po pomnoževanju s SYBR Green kemijo so enaki kontrolni bakteriji NCPBP 683<sup>T</sup>.

### 4.1.3 Določanje meje občutljivosti (LOD), učinkovitosti in dinamičnega območja amplikonov

Parametre s katerimi opisujemo kvaliteto in zanesljivost metod PCR v realnem času smo določali s pomnoževanjem suspenzije *E. amylovora* v vodi. Izvedli smo tri ločene reakcije (priloga 5). Učinkovitost pomnoževanja je bila za amplikon Ams od 101% - 106%, za ITS od 101 - 105% in za plazmidni amplikon od 97% - 104% (preglednica 13). Meja občutljivosti je bila pri vseh treh amplikonih pri koncentraciji  $1,8 \times 10^3$  celic/mL, kar pomeni manj kot 4 celice na reakcijo.

Dinamično območje je bilo pri vseh treh amplikonih od  $1,8 \times 10^3$  -  $1,8 \times 10^8$  celic/mL (preglednica 13).

Preglednica 13: Glavni parametri, ki opisujejo značilnosti pomnoževanja Ams, ITS in plazmidnega amplikona v treh reakcijah PCR v realnem času

Table 13: Main parameters describing the performance characteristics of Amp, ITS and plasmid amplicons in three real time PCR reactions

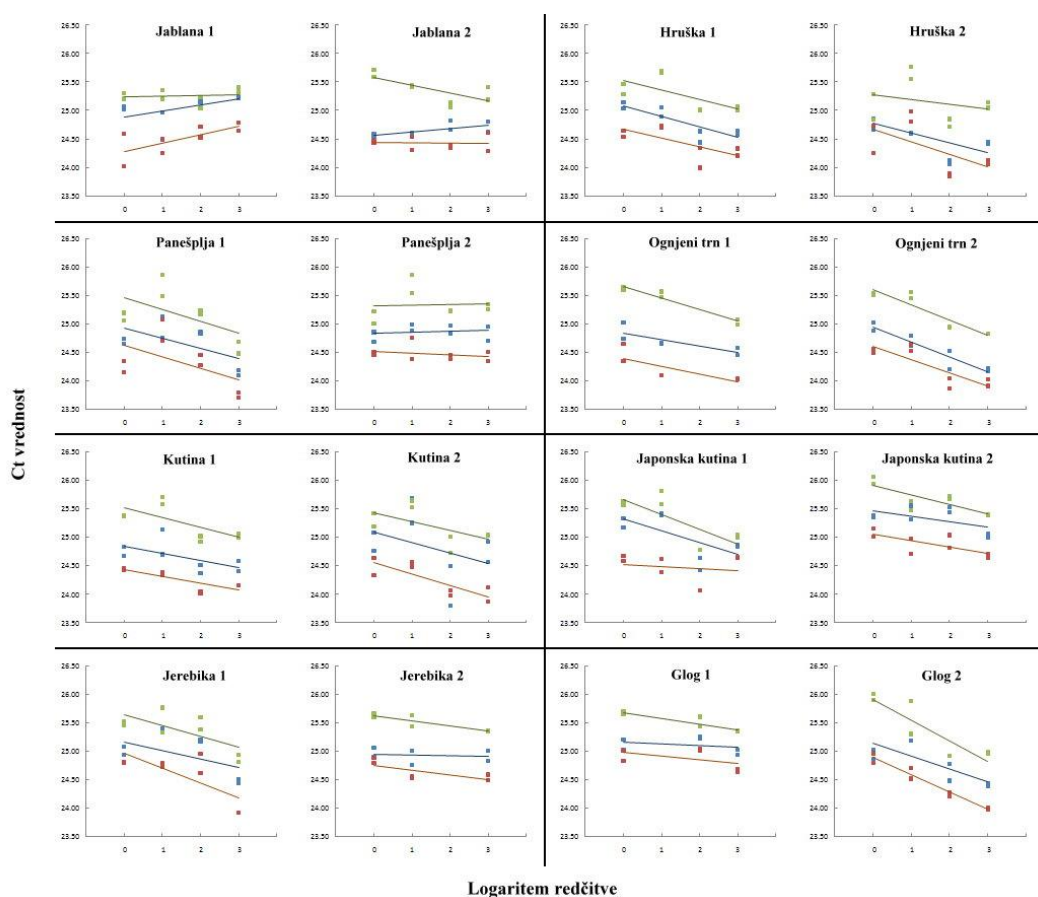
Amplikon	Dinamično območje (celice/mL)		Linearna regresija			LOD		
	od	do	naklon (k)	R <sup>2</sup>	E	celice/mL	povprečni Ct	CV
Ams	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,30	1,00	1,009	$10^3$	34,2	1,2%
	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,20	0,99	1,054	$10^3$	34,5	2,5%
	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,19	0,99	1,056	$10^2$	37,1	1,2%
ITS	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,22	1,00	1,046	$10^3$	33,6	1,2%
	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,29	0,99	1,015	$10^3$	34,8	2,3%
	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,22	0,99	1,044	$10^3$	34,5	2,0%
Plazmid	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,40	0,99	0,970	$10^3$	34,9	2,0%
	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,38	0,99	0,978	$10^3$	36,1	2,0%
	$1,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^8$	-3,22	0,99	1,043	$10^3$	35,1	1,5%

Opazili smo visoko ponovljivost med ponovitvami reakcije pri vseh amplikonih, saj koeficient variacije med ponovitvami reakcije, ko so bile v linearnem območju metode, ni presejal 3%. Največja variabilnost Vrednosti Ctje bila pri koncentraciji  $1,8 \times 10^3$  celic/mL in jo lahko pripišemo stohastičnemu efektu pri reakciji PCR v realnem času, ki se pojavi, če je v reakcijski mešanici prisotnih manj kot 10 kopij tarčne DNA (Ellison in sod., 2006; Morrison in sod., 1998).



#### 4.1.4 Vpliv gostiteljske rastline na pomnoževanje DNA *E. amylovora*

Vpliv gostiteljske rastline na pomnoževanje v reakciji PCR v realnem času smo ugotavljali pri različnih gostiteljskih rastlinah. V štiri desetkratne redčitve izolirane DNA smo dodali enako količino suspenzije bakterije *E. amylovora* in primerjali naklone krivulj. Če gostiteljska rastlina ne bi vplivala na inhibicijo med pomnoževanjem, bi bile krivulje vodoravne. Ugotovili smo, da je pri večini vzorcev inhibicija prisotna, saj smo pri bolj redčenih vzorcih dobili nižje vrednosti Ct, vendar inhibicija ni bila odvisna od gostiteljske rastline. Tako je bila inhibicija prisotna pri enem ekstraktu panešplje (panešplja 1), pri drugem ekstraktu iste rastline pa je bila inhibicija komaj opazna (panešplja 2). Poleg tega smo ugotovili, da tudi vsi amplikoni pri istih vzorcih niso bili enako inhibirani. Nakloni krivulj pri različnih gostiteljskih rastlinah in amplikonih so prikazani na sliki 18.



Slika 18: Vpliv različnih ekstraktov na inhibicijo pomnoževanja v PCR v realnem času pri različnih gostiteljskih rastlinah in amplikonih (rdeča=ITS amplikon; modra=Ams amplikon; zelena=plazmid amplikon)

Figure 18: Influence of different extracts on inhibition of amplification in real time PCR in different hosts plants and amplicons (red=ITS amplicon; blue=Ams amplicon; green=plasmid amplicon).

#### 4.1.5 Primerjava različnih metod izolacije DNA na rastlinskih ekstraktih

Za izvedbo poskusa smo združili tri ekstrakte iz različnih gostiteljskih rastlin pri katerih smo opazili inhibicijo v reakciji PCR v realnem času v poskusu pod točko 4.1.4 (vzorci: ognjeni trn 2, kutina 2, jerebika 1). Na združenem ekstraktu smo primerjali tri metode izolacije DNA: DNeasy (DNeasy Plant Mini Kit), izopropanolna izolacija (Llop in sod., 1999) in QuickPick izolacijo. V vzorce je bila pred izolacijo dodana suspenzija *E. amylovora* v končni koncentraciji  $1,8 \times 10^5 - 1,8 \times 10^2$  celic/mL. Vsi rezultati PCR v realnem času so zbrani v prilogi 6.

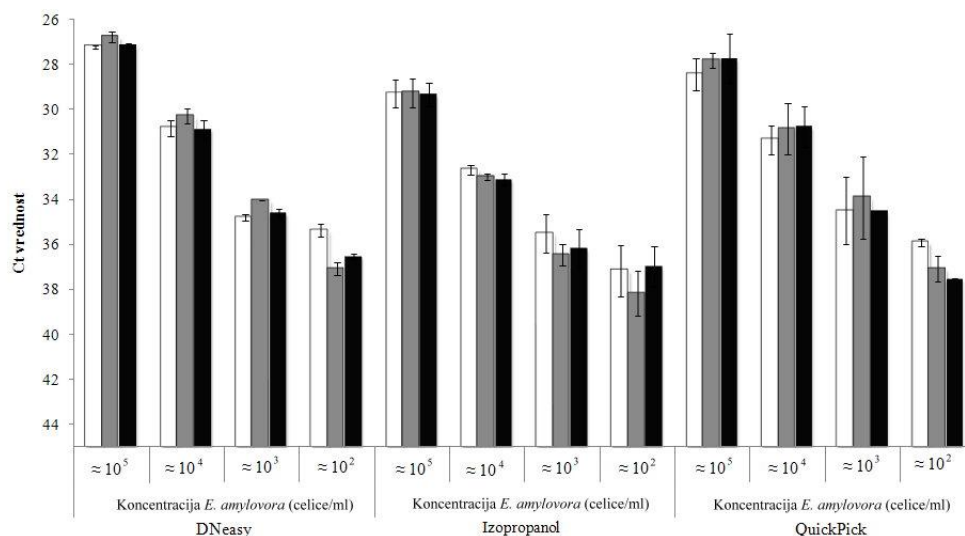
Iz analize rezultatov smo ugotovili, da imajo različne metode izolacije DNA vpliv na vrednosti Ct pri pomnoževanju DNA v reakciji PCR v realnem času (slika 19) in tudi na učinkovitost reakcije. Najnižje vrednosti Ct so bile pri izolacijah DNeasy in Quickpick, medtem ko so bile pri izopropanolni izolaciji vrednosti Ct višje. Te vrednosti so bile v povprečju za 1,8 cikla višje kot pri izolaciji DNeasy.

Učinkovitost pomnoževanja v PCR reakciji smo izračunali s primerjavo vrednosti Ct vzorcev DNA, ki so vsebovali  $1,8 \times 10^5$  *E. amylovora* celic/mL in 10 kratno redčino teh vzorcev v vodi. Iz preglednice 14 je razvidno, da smo inhibitorje reakcije PCR najbolj odstranili z izolacijskimi metodami QuickPick in DNeasy pri tem ko izopropanolna izolacija ni bila tako učinkovita.

Preglednica 14: Primerjava učinkovitosti pomnoževanja različnih ampliconov pri vzorcih z koncentracijo  $10^5$  celic/mL in desetkratno redčitvijo pri različnih načinih izolacije

Table 14: Comparison of amplification efficiencies of different amplicons in samples with  $10^5$  cells/mL of *E. amylovora* and ten fold dilution isolated with different methods

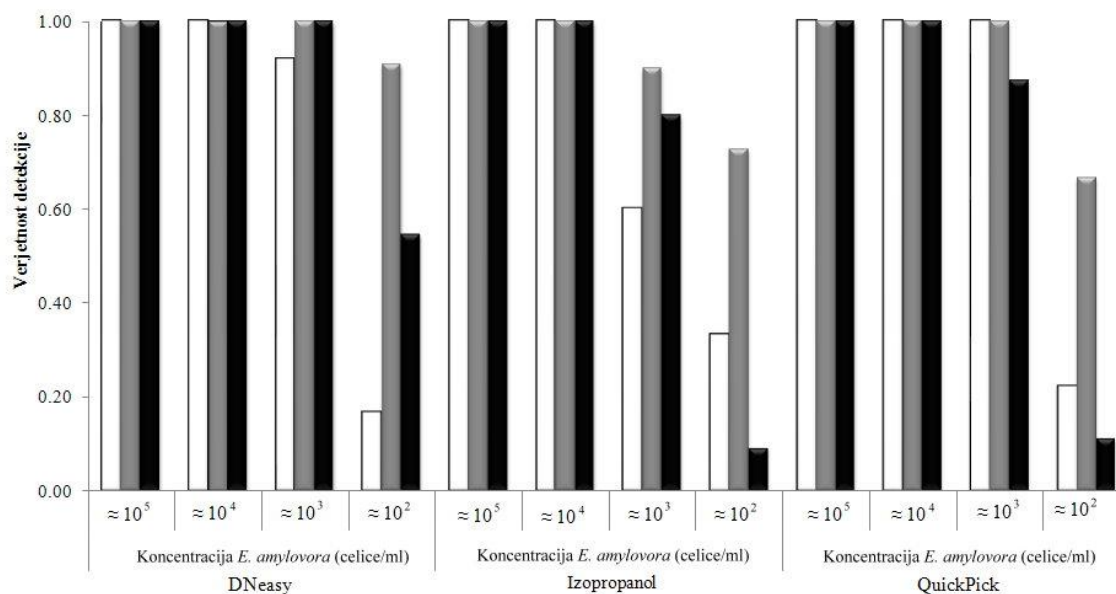
	Učinkovitost $10^{(1/k)} - 1$		
	DNeasy	Izopropanol	QuickPick
<b>Ams</b>	0,959	0,733	0,984
<b>ITS</b>	0,934	0,743	0,957
<b>Plazmid</b>	0,704	0,742	0,828



Slika 19: Vpliv koncentracije bakterije *E. amylovora* in načina izolacije na vrednosti Ct v reakciji PCR v realnem času pri analizi z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) in plazmidnim (črni stolpci) amplikonom. Intervali napake prikazujejo standardno deviacijo.

Figure 19: Influence of *Erwinia amylovora* concentrations and DNA extraction method on real-time PCR results in analysis of symptomatic samples. Ams (white), ITS (grey) and plasmid (black) real-time PCR systems were used. Error bars indicate standard deviation.

Na sliki 20 je prikazana verjetnost določanja, ki smo jo izračunali na osnovi razmerja med pozitivnimi paralelkami in vsemi testiranimi paralelkami, za vse tri načine izolacije ter pri vseh testiranih koncentracijah bakterije v vzorcih. Razvidno je, da je verjetnost določanja pri koncentracijah  $1,8 \times 10^5$  in  $1,8 \times 10^4$  celic/mL 100%, pri  $1,8 \times 10^3$  celic/mL pa je odvisna od načina izolacije in amplikona. V vseh primerih pa je verjetnost določanja nad 50%. Pri koncentraciji  $1,8 \times 10^2$  celic/mL (ustreza manj kot eni celici na reakcijo) pa je verjetnost določanja pri amplikonu Ams in plazmidnem amplikonu nizka v primerjavi z amplikonom ITS, kjer je verjetnost določanja od 67-91% in je odvisna od načina izolacije.



Slika 20: Vpliv koncentracije bakterije *E. amylovora* in načina izolacije na verjetnost določanja v reakciji PCR v realnem času pri analizi z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) in plazmidnim (črni stolpci) amplikonom

Figure 20: Influence of *Erwinia amylovora* concentrations and DNA extraction method on real-time PCR results in analysis of symptomatic samples, Ams (white), ITS (grey) and plasmid (black) real-time PCR systems were used

#### 4.1.6 Primerjava metode PCR v realnem času z metodo vgnezdene PCR

Primerjavo občutljivosti nove metode PCR v realnem času v primerjavi z vgnezdeno reakcijo PCR (Llop in sod., 2000) smo izvedli pri osmih ekstraktih iz različnih gostiteljskih rastlin, v katere smo dodali suspenzijo *E. amylovora* v končni koncentraciji od  $1,8 \times 10^4$  –  $1,8 \times 10^2$  *E. amylovora* celic/mL. DNA smo izolirali z metodo QuickPick, ki smo jo izbrali na podlagi najboljšega odstranjevanja inhibitorjev in posledično najboljše učinkovitosti pomnoževanja v reakciji PCR (preglednica 14). Izvedli smo PCR v realnem času za vse tri amplikone in za primerjavo vgnezdene PCR reakcije (Llop in sod., 2000). Rezultati reakcije PCR v realnem času so v prilogi 7.

Tudi v tem primeru smo vzorcu določili pozitivni rezultat, če smo v vsaj 50 % izvedenih paralelkah zaznali prisotnost tarčne DNA. Pri vsakem vzorcu smo tudi izračunali verjetnost določanja (preglednica 15). Tako smo z metodo PCR v realnem času ne glede na uporabljen amplikon zanesljivo zaznali bakterijo *E. amylovora* v vseh ekstraktih s koncentracijami  $1,8 \times 10^4$  in  $1,8 \times 10^3$  celic/mL. V nasprotju smo z metodo vgnezdene PCR reakcije zaznali *E. amylovora* pri 75 % ekstraktih s koncentracijo  $1,8 \times 10^4$  bakterijskih celic/mL in le pri 50 % ekstraktov s koncentracijo  $1,8 \times 10^3$  bakterijskih

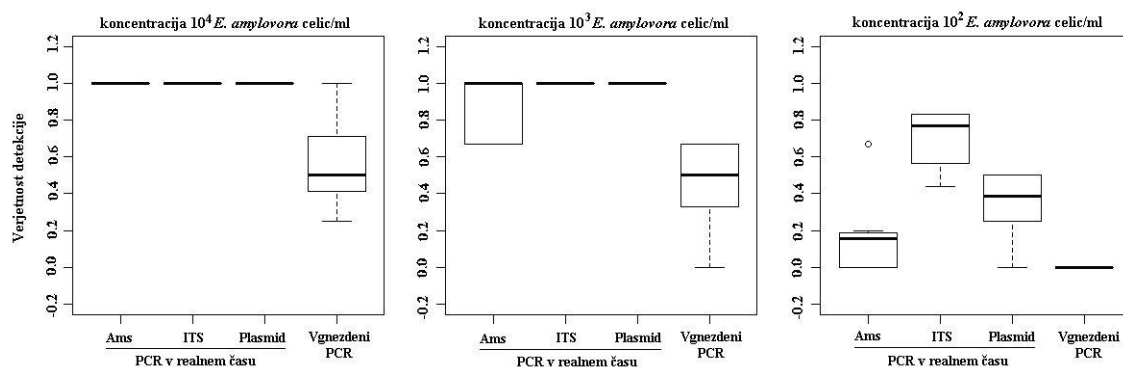
celic/mL (preglednica 15). Pri ekstraktih s koncentracijo  $1,8 \times 10^2$  bakterijskih celic/mL z vgnezdno reakcijo PCR nismo dobili pozitivnega rezultata. Z metodo PCR v realnem času smo pri istih vzorcih dobili pozitivni rezultat v 88 % ekstraktov z amplikonom ITS, medtem ko sta odstotka uspešnosti določevanja pri amplikonu Ams in plazmidnem amplikonu precej nižja (Ams 13 %; pEA29 38 %).

Preglednica 15: Primerjava rezultatov pomnoževanja treh amplikonov s PCR v realnem času in vgnezdene PCR pri določanju bakterije *E. amylovora* v ekstraktih različnih gostiteljskih rastlin z dodano bakterijo v koncentraciji  $1,8 \times 10^4 - 1,8 \times 10^2$  celic/mL

Table 15: Comparison of three different real-time PCR assays and nested PCR for detection of *E. amylovora* in spiked samples of different hosts with concentration  $1,8 \times 10^4 - 1,8 \times 10^2$  cells/mL

Koncentracija (celice/ml)	Gostiteljska rastlina	PCR v realnem času						vgnezdni PCR	
		Ams		ITS		Plasmid		Rezultat	Verjetnost
		Rezultat	Verjetnost	Rezultat	Verjetnost	Rezultat	Verjetnost		
$1,8 \times 10^4$	Jablana	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.50
	Hruška	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.75
	Panešplja	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.50
	Kutina	+	1.00	+	1.00	+	1.00	-	0.25
	Nešplja	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.67
	Skorš	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.50
	Glog	+	1.00	+	1.00	+	1.00	-	0.33
	Ognjeni trn	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	1.00
$1,8 \times 10^3$	Jablana	+	0.67	+	1.00	+	1.00	+	0.67
	Hruška	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.67
	Panešplja	+	0.67	+	1.00	+	1.00	-	0.33
	Kutina	+	1.00	+	1.00	+	1.00	-	0.00
	Nešplja	+	0.67	+	1.00	+	1.00	-	0.33
	Skorš	+	1.00	+	1.00	+	1.00	-	0.33
	Glog	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.67
	Ognjeni trn	+	1.00	+	1.00	+	1.00	+	0.67
$1,8 \times 10^2$	Jablana	-	0.00	+	0.83	-	0.33	-	0.00
	Hruška	+	0.67	+	0.83	-	0.33	-	0.00
	Panešplja	-	0.00	+	0.83	+	0.50	-	0.00
	Kutina	-	0.17	+	0.83	+	0.50	-	0.00
	Nešplja	-	0.17	+	0.50	-	0.17	-	0.00
	Skorš	-	0.20	-	0.44	-	0.44	-	0.00
	Glog	-	0.14	+	0.71	-	0.00	-	0.00
	Ognjeni trn	-	0.00	+	0.63	+	0.50	-	0.00

Verjetnost določanja je pri vseh testiranih koncentracijah največja pri amplikonu ITS, nato pri plazmidnem in amplikonu Ams ter najslabša pri vgnezdni reakciji PCR (preglednica 15, slika 21).



Slika 21 : Primerjava verjetnosti določanja bakterije *E. amylovora* s tremi amplikoni PCR v realnem času in vgnezdeno PCR v ekstraktih različnih gostiteljskih rastlin z dodano bakterijo v koncentraciji  $1,8 \times 10^4$  –  $1,8 \times 10^2$  celic/mL

Figure 21: Comparison of probability of detecting *E. amylovora* with three different real-time PCR assays and nested PCR in spiked samples of different hosts with concentration  $1,8 \times 10^4$  –  $1,8 \times 10^2$  cells/mL

Opazovali smo vpliv različnih gostiteljskih rastlin na uspešnost pomnoževanja v PCR reakciji. Ugotovili smo, da pri koncentraciji  $1,8 \times 10^4$  in  $1,8 \times 10^3$  bakterijskih celic/mL različne gostiteljske rastline nimajo vpliva na vrednosti Ct reakcije PCR v realnem času, saj so vrednosti Ct pri posameznih gostiteljih zelo podobne in tudi koeficient variance je pod 3 % (preglednica 16). Pri koncentraciji  $1,8 \times 10^2$  bakterijskih celic/mL pa se verjetnosti določanja razlikujejo tudi med različnimi gostitelji, vendar gre to pripisati stohastični razporeditvi tarčne DNA.

Preglednica 16 : Izračunana povprečna vrednost Ct, standardna deviacija, koeficient variance med reakcijami PCR v realnem času med vsemi gostiteljskimi rastlinami

Table 16: Average Ct value, standard deviation, coefficient of variation in real time PCR reaction in all host plants

		<b>Ams</b>	<b>ITS</b>	<b>Plazmid</b>
Koncentracija <i>E. amylovora</i> $10^4$	<b>Povprečen Ct</b>	31,894	31,169	31,434
	<b>Standardna deviacija</b>	0,364	0,225	0,281
	<b>Koeficient variance (CV)</b>	1,14 %	0,72 %	0,89 %
Koncentracija <i>E. amylovora</i> $10^3$	<b>Povprečen Ct</b>	34,948	34,572	34,505
	<b>Standardna deviacija</b>	0,788	0,574	0,700
	<b>Koeficient variance (CV)</b>	2,26 %	1,66 %	2,03 %
Koncentracija <i>E. amylovora</i> $10^2$	<b>Povprečen Ct</b>	35,856	37,297	36,738
	<b>Standardna deviacija</b>	0,602	0,642	0,535
	<b>Koeficient variance (CV)</b>	1,68 %	1,72 %	1,46 %

#### 4.1.7 Uporaba metode PCR v realnem času pri naravnih rastlinskih vzorcih

Metodo PCR v realnem času smo uporabili kot dodaten presejalni test pri rastlinskih vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji, ki so bili nabrani v okviru posebnega nadzora

bakterije *E. amylovora*, vendar na gojiščih bakterije *E. amylovora* nismo izolirali. Od leta 2007 smo tako s to metodo dodatno preverili prisotnost bakterije pri 49 vzorcih. Pri 9 vzorcih smo dobili pozitiven rezultat z vsemi tremi amplikoni, kar nakazuje na to, da je bila v vzorcih prisotna DNA bakterije *E. amylovora*. Pri 4 vzorcih smo preverjali viabilnost celic z obogatitvijo v King B in CCT gojišču in analizo PCR v realnem času pred in po obogatitvijo. Pri vseh vzorcih smo ugotovili, da se vrednosti Ct niso spremenile in tako sklepamo, da celice niso bile viabilne.

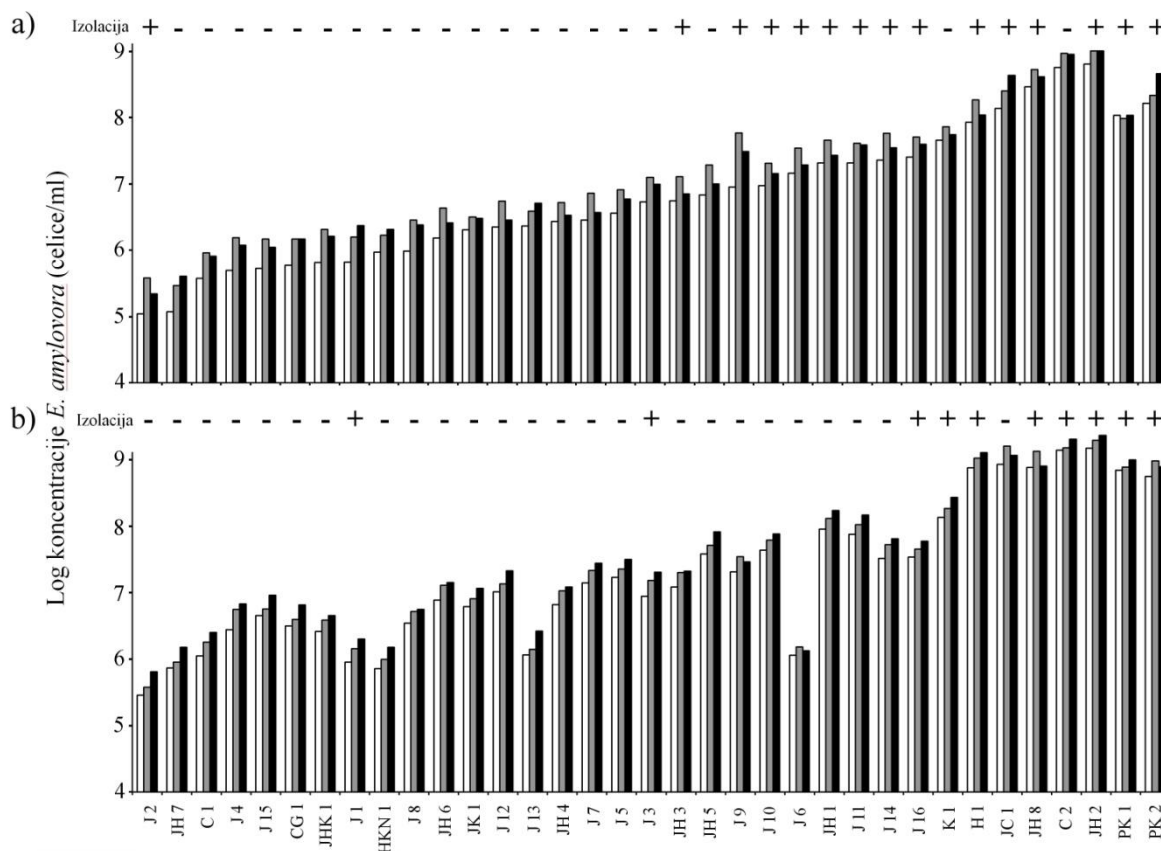
#### **4.1.8 Uporabe metode PCR v realnem času kot identifikacijski test**

V letih 2007 – 2009 smo test uspešno uporabili pri identifikaciji sevov *E. amylovora*. V letu 2007 smo za identifikacijo pri 219 sevih uporabili vse tri amplikone (preglednica 11), v letu 2008 in 2009 pa smo identifikacijo izvedli samo z Ams sistemom pri 47 pozitivnih sevih.

## **4.2 UPORABA METODE PCR V REALNEM ČASU ZA SPREMLJANJE KONCENTRACIJE CELIC *E. amylovora* V OBOGATITVENIH GOJIŠČIH**

Koncentracijo bakterije *E. amylovora* smo ocenili v ekstraktih latentnih vzorcev pred in po obogatitvi v tekočih gojiščih King B in CCT. Ocenjevanje koncentracije smo ocenili s primerjavo vrednosti Ct vzorca in standardne krivulje z znano koncentracijo *E. amylovora*. Povprečna vrednost Ct vzorcev pred obogatitvijo je ustrezala koncentraciji, ki smo jo v dejansko dodali v vzorce ( $6 \times 10^2$  cfu/mL). Opazili smo, da so vrednosti Ct med vzorci nekoliko variirale (priloga 8), saj je bil koeficient variance pri gojišču King B 3,86 % (Ams), 4,66 % (ITS) in 4,97% (plazmid) ter nekoliko nižji pri gojišču CCT: 3,76% (Ams), 3,59 % (ITS) in 4,23 % (plazmid). Razlog večjega koeficienta variabilnosti je v stohastičnem efektu razporeditve tarčne DNA, saj smo dodali koncentracijo, ki je na limiti občutljivosti metode in tudi posledica delne inhibicije pri posameznih vzorcih.

Koncentracije bakterije *E. amylovora* v vzorcih po obogatitvi so bile variabilne in so bile v rangi od približno  $10^5$  celic/mL –  $10^9$  celic/mL (priloga 9; slika 22). Najvišja ocenjena koncentracija v vzorcu je bila celo višja, kakor če smo pomnoževali bakterijo v gojišču brez rastlinskega ekstrakta. Opazili smo, da pri večini vzorcev obogatitev v King B korelira z obogatitvijo v gojišču CCT (slika 22) in tako semiselektivno gojišče ni bistveno pripomoglo k višji namnožitvi bakterije. Nismo pa opazili nobene korelacije med gostiteljskimi rastlinami in koncentracijo *E. amylovora* po obogatitvi.



Slika 22: Koncentracija *E. amylovora* po obogatitvi pri latentnih vzorcih z dodano bakterijo *E. amylovora* ocenjeno z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) ter plazmidnim (črni stolpci) amplikonom. (a) v gojišču King B, (b) v gojišču CCT. Rezultati izolacije na CCT gojišču so napisani nad stolpci za posamezno tekoče gojišče. Oznaka vzorca označuje gostiteljske rastline iz katerih je bil vzorec sestavljen (J=jablana, H=hruška, C=panešplja, K=kutina, H=glog, N=nešplja) in pozitivna kontrola (PK, *E. amylovora* v PBS pufri)

Figure 22: Concentration of *Erwinia amylovora* after enrichment of spiked symptomless samples in liquid media as determined with Ams (white), ITS (grey) and plasmid (black) real-time PCR systems: a) in King's B media and b) in CCT media. Results of isolation of *E. amylovora* in pure culture from enriched samples is marked above concentration bars. Sample labels designate host plant (A=apple, P=pear, C=cotoneaster, Q=quince, H=hawthorn, M=medlar) and positive control (PC, *E. amylovora* without plant extract)

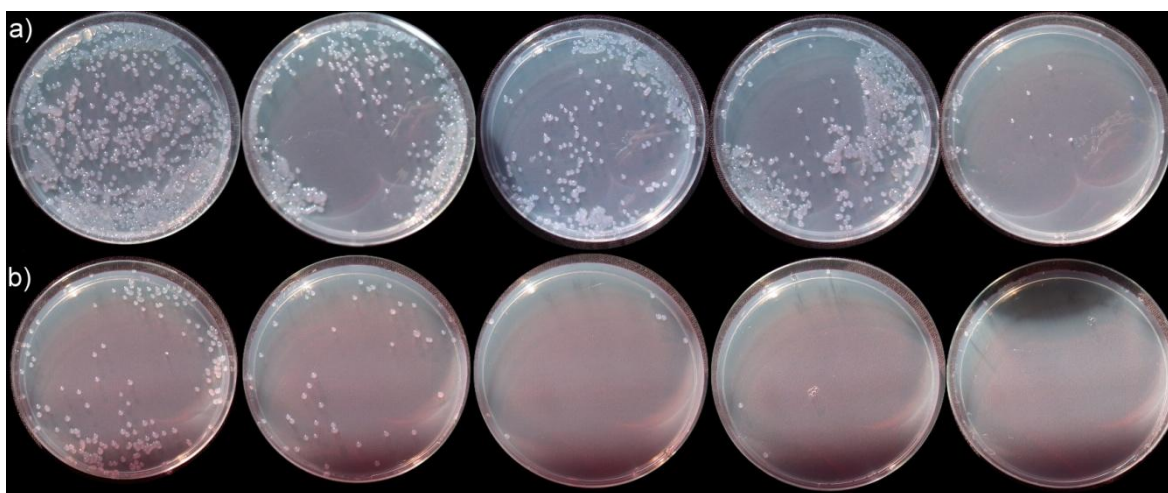
#### 4.2.1 Izolacija bakterije *E. amylovora* iz obogatenih vzorcev

Obogateni ekstrakti latentnih vzorcev so bili nanešeni na gojišče CCT. Število redčitev je bilo odvisnih od ocene koncentracije (od 4 – 8 desetkratnih redčitev na vzorec). Uspešnost izolacije na trdnem gojišču CCT iz obogatitev King B je bila 39 % in iz obogatitev CCT samo 24 %. Izolacija je bila v glavnem uspešna iz vzorcev z ocenjeno koncentracijo nad  $10^7$  celic/mL (slika 22). Kar pri 48 % vzorcih sta bili izolaciji iz obeh obogatitev (King B in CCT) negativni (priloga 9).



#### 4.2.2 Ugotavljanje vpliva zamrzovanja obogatitev CCT pri -20 °C

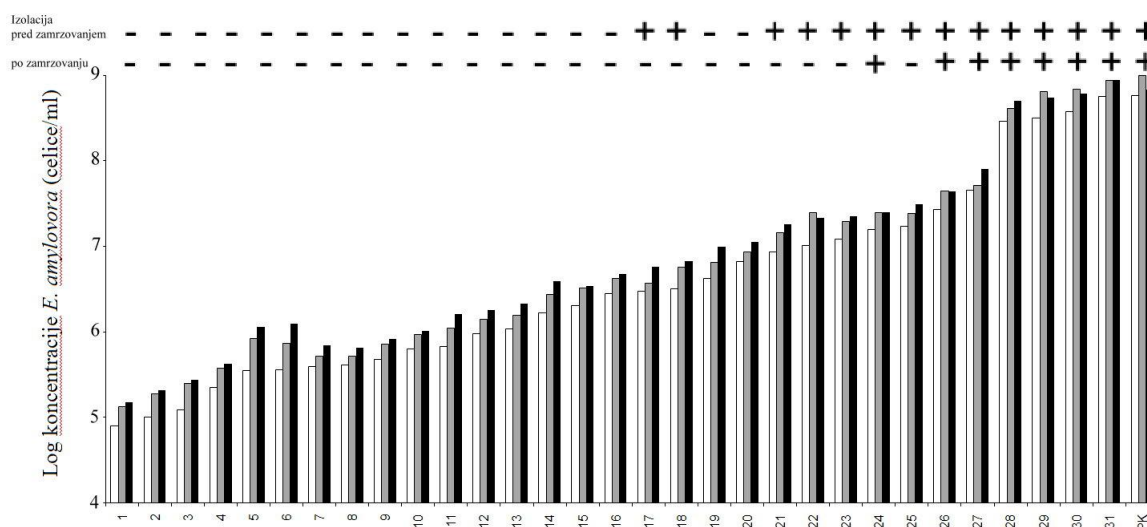
Opazili smo, da ima zamrzovanje suspenzije *E. amylovora* pri -20 °C po obogatitvi v gojišču CCT negativen učinek na število bakterij, ki zraste na plošči CCT (slika 23). Po enkratnem zamrzovanju je zrastle približno 100 - krat manj bakterij kakor pred zamrzovanjem. Takega zmanjšanja števila bakterij pri zamrzovanju suspenzije *E. amylovora* obogatene v gojišču King B nismo opazili.



Slika 23: Vpliv zamrzovanja (pri -20 °C) obogatene suspenzije *E. amylovora* v gojišču CCT na število zrastlih kolonij *E. amylovora* na ploščah CCT (od leve proti desni; 3 kratna – 7 kratna redčitev). a) pred zamrzovanjem, b) po zamrzovanju

Figure 23: Influence of freezing (to -20 °C) of enriched suspension of *E. amylovora* in CCT media on number of *E. amylovora* colonies on CCT plates (3 fold to 7 fold dilution from left to right). a) plates with extract before freezing, b) plates with extract after freezing

Dodatno smo ugotavljali vpliv zamrzovanja pri -20 °C pri obogatenih ekstraktih latentnih vzorcev z dodano bakterijo *E. amylovora*. Po obogatitvi je bila koncentracija bakterije *E. amylovora* v teh vzorcih od  $7,9 \times 10^4$  celic/mL in do skoraj  $6 \times 10^8$  celic/mL ocenjena s PCR v realnem času (slika 24). Od 31 testiranih vzorcev, ki smo jih obogatili v gojišču CCT smo bakterijo *E. amylovora* pred zamrzovanjem izolirali iz 13 vzorcev (42 %) od tega je bila izolacija uspešna pri 3 vzorcih (od 9-ih), ki so imeli koncentracijo med  $10^6$  in  $10^7$  celic/mL, pri ostalih pozitivnih je bila ocenjena koncentracija nad  $10^7$  celic/mL. Po zamrzovanju pa je bila izolacija uspešna le še pri 7 vzorcih (22,6 %) pri katerih je bila ocenjena koncentracija nad  $10^7$  celic/mL (slika 24).



Slika 24 : Koncentracija *E. amylovora* po obogatitvi pri latentnih vzorcih z dodano bakterijo *E. amylovora* ocenjeno z amplikonom Ams (beli stolpci), ITS (sivi stolpci) ter plazmidnim (črni stolpci) amplikonom. Nad grafom je prikaz uspešnost izolacije bakterije *E. amylovora* pred zamrzovanjem obogatitev CCT pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ter po njem.

Figure 24: Concentration of *Erwinia amylovora* after enrichment of spiked symptomless samples in liquid media as determined with Ams (white), ITS (grey) and plasmid (black) real-time PCR assays. Above the chart are results of isolation *E. amylovora* before and after freezing CCT enrichments at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 4.3 RAZISKAVE RAZNOVRSTNOSTI BAKTERIJ IZ RODU *PSEUDOMONAS*

V raziskavi smo želeli preučiti raznolikost bakterij iz rodu *Pseudomonas* v Sloveniji, zato smo v letih od 2003 – 2009 zbirali izolate iz različnih gostiteljskih rastlin in lokacij. Za identifikacijo bakterij in preučevanje raznolikosti smo uporabili različne metode.

#### 4.3.1 Biokemijski testi in identifikacija bakterij

Testi LOPAT so osnovni testi pri identifikaciji fluorescentnih bakterij rodu *Pseudomonas* in na podlagi rezultatov teh testov jih razvrščamo v različne skupine LOPAT (preglednica 4). Tako smo med izbranimi 181 izolati največ izolatov (47,5 %) uvrstili v skupino Ia, kamor uvrščamo tudi patovar *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. 24,3 % izolatov, ki so bili v 98% izolirani iz jablan je bilo uvrščenih v skupino Ib, kamor sodijo nekateri drugi patovarji iz vrste *Pseudomonas syringae*, kot so patovarji *papulans*, *delphinii* itd. Zaradi variabilnosti rezultatov med ponovitvami izvedenih testov LOPAT smo znotraj HR pozitivnih izolatov uvedli dodatni dve skupini, in sicer 15 izolatov pri katerih smo med ponovitvami opazili različne rezultate pri tvorbi levana, zato smo jih uvrstili v skupino Ia

ali Ib. Poleg teh smo pri 6 izolatih opazili različne rezultate pri pektinolitičnosti na rezinah krompirja in zato smo jih pripisali posebni skupini Ia ali pektinolitični Ia (preglednica 17, priloga 10).

Med patogenimi bakterijami rodu *Pseudomonas* smo izolirali tudi 3 seve, ki jih po značilnosti LOPAT uvrščamo v skupino II, skupaj z bakterijami *Pseudomonas viridiflava*. V skupino III (skupina značilna za *P. cichorii*) smo uvrstili en izolat iz jablane.

Izolirali smo tudi 26 izolatov (14,4 %), ki so bili HR negativni (preglednica 17). Tudi pri teh sevih smo uvedli novo skupino, ker smo pri 4 izolatih opazili različne rezultate pri tvorbi levana. Skupino smo poimenovali Va ali Vb. Pri 8 izolatih smo opazili značilnosti LOPAT, ki so odstopale od opisanih skupin, zato so ostali nedefinirani. V rod *Pseudomonas* pa smo jih uvrstili na podlagi fluorescence na gojišču King B.

Preglednica 17: Razporeditev izbranih izolatov v skupine LOPAT

Table 17: Distribution of selected strains in LOPAT groups

	LOPAT skupina	Število Izolatov	Gostitelji
<b>HR pozitivni izolati</b>	<b>Ia (+ - - - +)</b>	86	Jablana (53), hruška (8), kutina (7), fotinija (1), ognjeni trn (1), panešplja (2), vrtnica (1), japonska kutina (1), skorš (1), breskev (2), marelica (4), sliva (1), fižol (3), žito (1)
	<b>Ib (- - - - +)</b>	44	Jablana (43), panešplja (1)
	<b>Ia ali Ib (V - - - +)</b>	15	Jablana (8), hruška (2), panešplja (2), kutina (1), ognjeni trn (1), jerebika (1)
	<b>Ia ali pektinolitični Ia (+ - V - +)</b>	6	Jablana (5), hruška (1)
	<b>II (- - + - +)</b>	3	Jablana (2), kutina (1)
	<b>III (- + - - +)</b>	1	Jablana (1)
<b>HR negativni izolati</b>	<b>IVa (+ + + + -)</b>	1	Hruška
	<b>Vb (+ + - + -)</b>	13	Jablana (9), japonska kutina (2), jerebika (1), glog (1)
	<b>Va ali Vb (V + - + -)</b>	4	Glog (1), radič (2), krizantema (1)
	<b>Nedefinirani (- - - -)</b>	3	Jablana(2), marelica (1)
	<b>Nedefinirani (+ - - - -)</b>	2	Jablana (1), panešplja (1)
	<b>Nedefinirani (+ + - - -)</b>	2	Kutina (1), jerebika (1)
	<b>Nedefinirani (+ - - + -)</b>	1	Hruška

V= variabilna lastnost izolata med ponovitvami testa

+ pozitiven rezultat

- negativen rezultat

Pričakovani rezultati produkcije kisline iz saharoze pri različnih skupinah LOPAT so, da je pozitivna pri skupini Ia, Ib in IVa ter negativna pri skupinah II, III in Va. Pri skupinah IVb in Vb je rezultat variabilen. Pozitiven oz. negativen rezultat pomeni, da je tako reagiralo

več kot 80 % sevov. Naši rezultati so se v večini primerov ujemali s pričakovanimi, saj je bila pri vseh sevih znotraj skupin Ia in Ib produkcija pozitivna, razen pri enem sevu (99,3 % ujemanje). Rezultat testa je odstopal še pri enem izolatu iz LOPAT skupine II. Rezultati testa pri kontrolnih bakterijah iz preglednice 7 so se ujemali s pričakovanimi.

Hidroliza arbutina je značilnost določenih *P. syringae* patovarjev (*syringae*, *aptata*, *atrofaciens*, *dysoxyli*, *japonica*, *tomato*, *delphinii*, *garcae*, *oryzae*, *papulans* itd). Patovarji kot so *phaseolicola*, *glycinea*, *morsprunorum*, *helianthi* itd. naj bi bili negativni. Med našimi izolati, ki smo jih testirali iz skupine Ia in Ib (141 izolatov), jih 4 ne hidrolizira arbutina. To so izolati iz žita, marelice, kutine in jerebike.

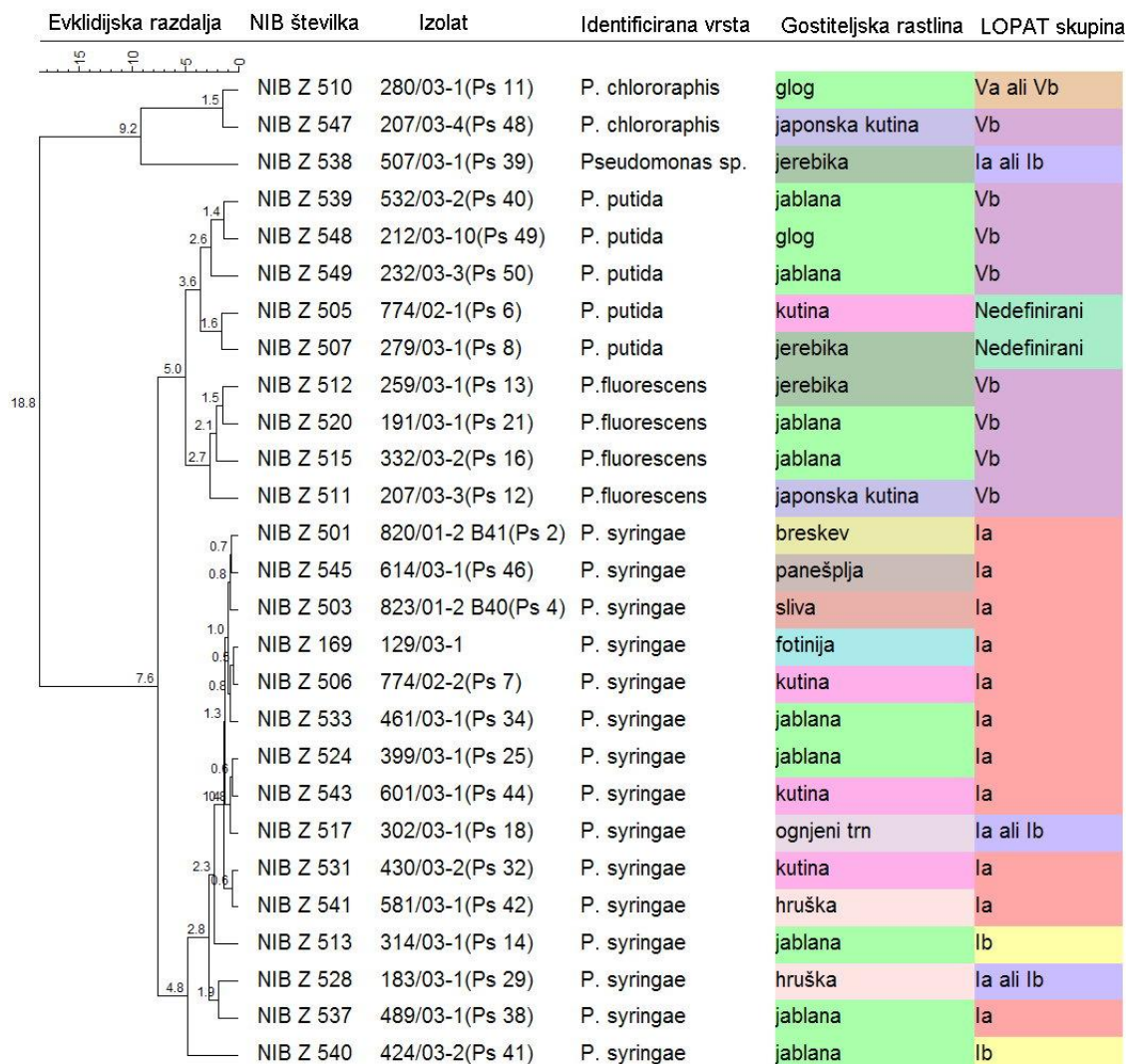
Med kontrolnimi bakterijami smo hidrolizo arbutina izvedli pri 33 izolatih. Negativni so bili patovarji *theae*, *mori*, *aesculi*, *philadelphi*, *morsprunorum*, *P. avellanae* ter nekatere nepatogene bakterije rodu *Pseudomonas*. Patovarji *phaseolicola*, *glycinea*, *helianthi*, ki naj bi bili po literaturi negativni (tako je reagiralo 80% ali več sevov), so bili v našem primeru pozitivni. Za določene patovarje nismo našli podatkov o sposobnosti hidrolize arbutina, tako da rezultatov ne moremo primerjati.

Za patovar *syringae* je značilno, da izolati utekočinjajo želatino in tudi hidrolizirajo eskulin. Med 148 izolati iz skupine Ia in Ib sta bila oba testa pozitivna pri 124 izolatih (84 %), 6 izolatov (4 %) je bilo eskulin pozitivnih pri tem da niso imeli sposobnosti utekočinjanja želatine. 7 izolatov (5 %) je bilo negativnih pri obeh testih; trije so bili izolirani iz fižola, kar nakazuje da gre za patovarje *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Trije so bili izolirani iz jablan in en izolat iz marelice. Izolat iz žita je utekočinjal želatino, a ni hidroliziral eskulina. Pri 10 izolatih (7 %) smo opazili, da pri hidrolizi eskulina pride do spremembe barve v rjavo, vendar fluorescenca gojišča ostane nespremenjena in ne upade, kakor se to zgodi pri sevih, ki so hidrolizirali eskulin. Pri teh sevih smo označili hidrolizo eskulina kot dvomljivo, čeprav smo zasledili, da tako spremembo opisujejo kot pozitiven rezultat (Jaap Janse, osebna komunikacija, april 2010) Od teh 10 sevov jih je 9 hidroliziralo želatino.

#### 4.3.2 Analiza profila maščobnih kislin

Med izbranimi sevi smo analizo profila maščobnih kislin izvedli pri 27 izolatih. 2 izolata smo identificirali kot *P. chlororaphis*, 5 izolatov kot *P. putida* in 4 izolate kot *P. fluorescens*. Preostalih 15 vzorcev smo uvrstili znotraj vrste *P. syringae*. Nekoliko odstopajoč profil maščobnih kislin od sevov iz knjižnice podatkov sta imela seva NIB Z 538 iz jerebike in NIB Z 540 iz jablane. Vnesene podatke vrednosti maščobnih kislin posameznih izolatov smo vnesli program Bionumerics in izvedli klustersko analizo. Za izdelavo matrike podobnosti smo uporabili evklidijsko razdaljo (angl. Euclidian distance) (slika 25). Iz dendrograma (slika 25) je razvidno, da se profil maščobnih kislin ni ujemal z razdelitvijo z gostiteljskimi rastlinami, se pa je razdelitev ujemala med HR pozitivnimi in

HR negativnimi sevi. Izjema je le sev NIB Z 538, ki je izstopajoč tudi po restriksijskem profilu.



Slika 25: Dendrogram 27 izolatov pri katerih smo izvedli analizo profila maščobnih kislin. Dendrogram je narejen s programskim paketom Bionumerics; za izdelavo matrike podobnosti je bila uporabljena evklidijska razdalja

Figure 25: Dendrogram of 27 strains analyzed for fatty acids composition. Dendrogram was produced with Bionumerics software; similarity matrix based upon Euclidean distance

### 4.3.3 Inhibicija rasti bakterije *E. amylovora*

Pri bakterijskih sevih iz rodu *Pseudomonas* izoliranih v letu 2003 smo testirali sposobnost inhibicije rasti bakterije *Erwinia amylovora* na gojišču King B. Pri 4 izolatih, ki so bili vsi HR negativni (NIB Z 510, NIB Z 511, NIB Z 515 IN NIB Z 539), smo ugotovili, da so inhibirali rast bakterije *E. amylovora* (slika 26). Čeprav te bakterije ne povzročajo bolezenskih znamenj, so lahko pomembne pri diagnostiki bakterije *E. amylovora*, saj lahko



ovirajo izolacijo te bakterije na gojišču. Nekateri nepatogeni sevi rodu *Pseudomonas* se uporabljajo tudi za omejevanje širjenja hruševega ožiga kot biotični antagonisti. Da bi preverili možnost delovanja naših izolatov kot biotičnih agensov bi bilo potrebno opraviti nadaljnje teste v naravnih razmerah, saj je znano, da je stopnja inhibicije v kulturi in naravi lahko zelo različna (Vanneste J., 2000). Sev NIB Z 511 je poleg sposobnosti inhibicije rasti bakterije *E. amylovora* tudi odporen na baker.

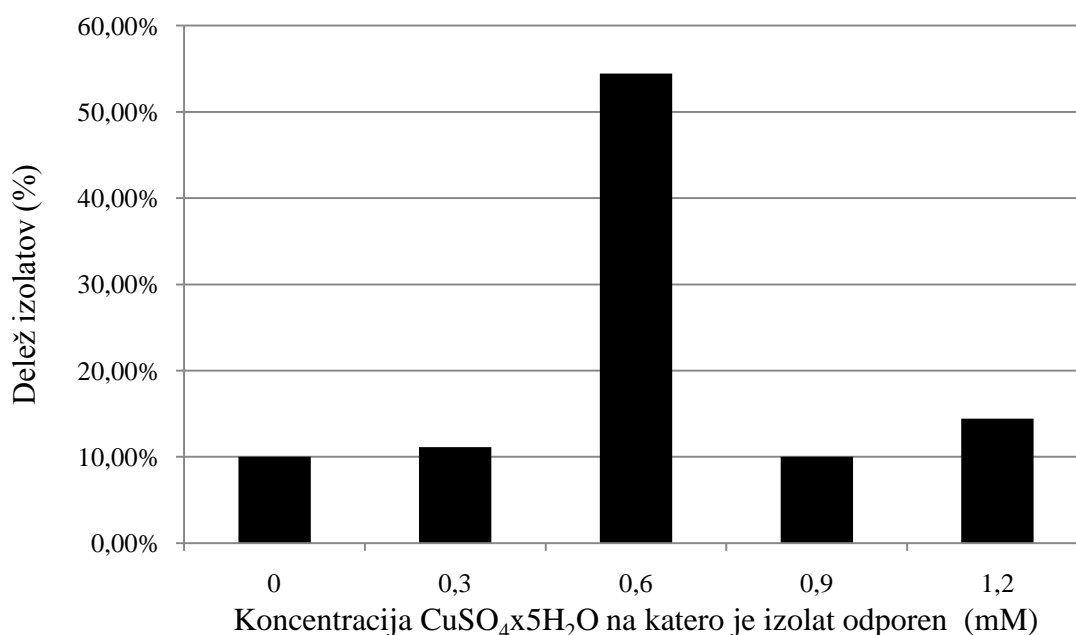


Slika 26: Cona inhibicije rasti bakterije *E. amylovora* okrog seva NIB Z 539 nacepljenega v ravni črti

Figure 26: Zone of inhibition of growth *E. amylovora* by strain NIB Z 539 streaked in straight line

#### 4.3.4 Odpornost na baker

Škropljenje z bakrom je eno najpogosteje uporabljenih sredstev za omejevanje bakterijskih okužb, vendar so pri bakterijah rodu *Pseudomonas* pogosto opazili, da so odporni na baker. Želeli smo preveriti, kakšna je odpornost na baker slovenskih izolatov. Test smo izvedli pri 90 izbranih izolatih. Ugotovili smo, da je večina izolatov odporna na 0,6 mM  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in jih glede na določeno mejo med občutljivostjo in odpornostjo (0,8 mM koncentracija) lahko določimo kot občutljive seve (slika 27). 5 izolatov od 13, ki so bili odpornih na koncentracijo 1,2 mM smo testirali tudi na višje koncentracije. Rezultati so pokazali, da 2 izolata nista bila odporna na višje testirane koncentracije, 3 izolati pa so bili odporni na najvišjo testirano koncentracijo (2,2 mM). Vsi so bili izolirani iz jablan iz nasadov.



Slika 27: Odpornost sevov iz rodu *Pseudomonas* na baker (N = 90)

Figure 27: Resistance of strains from genus *Pseudomonas* against copper (N = 90)

#### 4.3.5 Test sinteze toksinov z indikatorsko glivo *Rhodotorula pilimanae*

S testom sinteze toksinov z indikatorsko glivo *Rhodotorula pilimanae* (slika 28) ugotavljamo sposobnost tvorbe siringomicinov in siringopeptinov pri izolatih bakterije *Pseudomonas syringae*. Pri izbranih izolatih smo to naredili v dveh poskusih pri čemer smo 26 izolatov ponovili v obeh testih. Med izolati, ki smo jih na podlagi testov LOPAT razdelili v skupino Ia je bil delež izolatov, ki so sintetizirali vsaj enega od toksinov več kot 74 % (preglednica 18). Podoben odstotek toksin pozitivnih sevov smo opazili tudi pri skupini, kamor smo razporedili Ia izolate z variabilnim rezultatom testa pektinolitičnosti. Pri skupini Ib kamor smo uvrstili levan negativne izolate je delež izolatov, ki so imeli sposobnost inhibicije glive nižji in sicer 47,7 %. Prav tako v skupini, kamor smo uvrstili izolate z variabilnim rezultatom tvorbe levana (skupina Ia ali Ib), kjer je bil delež toksin pozitivnih sevov 26,7 %. Povprečna cona inhibicije je bila od 3,3 mm in do 32 mm.

Iz preglednice 18 je tudi razvidno, da so tudi HR negativni sevi inhibirali rast glive *Rhodotorula pilimanae*. Pri določenih izolatih smo opazili bistro cono, pri nekaterih pa močno inhibicijo, vendar cona ni bila bistra. *Pseudomonas syringae* izolate, ki tvorijo toksin smo izolirali iz vseh testiranih gostiteljskih rastlin iz družine rožnic in tudi iz fižola.

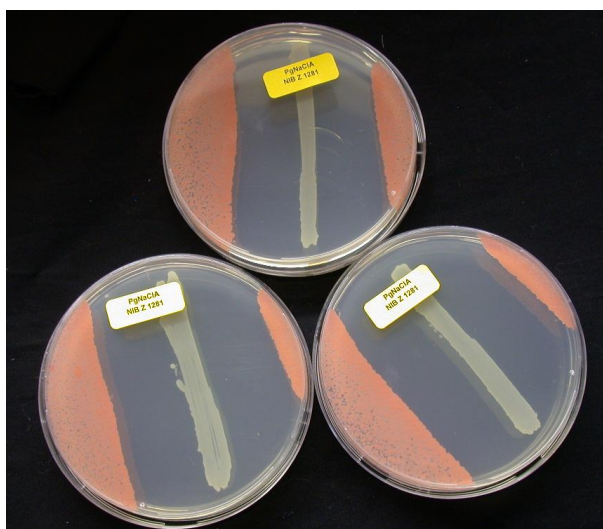
Na sposobnost inhibicije rasti glive *Rhodotorula pilimanae* smo testirali tudi 39 kontrolnih bakterijah. Med patovarji *Pseudomonas syringae* smo opazili sposobnost inhibicije rasti

glive pri patovarjih *syringae*, *lapsa*, *aptata*, *phaseolicola* in *glycinea* ter pri *P. corrugata*. Med HR negativnimi kontrolnimi bakterijami smo inhibicijo opazili pri *P. chlororaphis*, *P. aurefaciens* (ki naj bi bila sedaj vrsta *P. chlororaphis*). Delno inhibicijo smo opazili pri vrsti *P. avellanae* ter znotraj vrste *P. syringae* pri patovarjih *tomato* in *myrica*.

Preglednica 18: Rezultati testa tvorbe toksinov pri testiranih izolatih glede na skupine LOPAT

Table 18: Results of toxin assay for strains in regard to LOPAT groups

	LOPAT skupina	Število izolatov	Toksin (0) negativno	Toksin (1) pozitivno	Toksin (2) šibka inhibicija
HR pozitivni izolati	<b>Ia (+ - - - +)</b>	86	16 (18,6 %)	64 (74,4 %)	6 (7,0 %)
	<b>Ib (- - - - +)</b>	44	21 (47,7 %)	20 (45,5 %)	3 (6,8 %)
	<b>Ia ali Ib (V - - - +)</b>	15	10 (66,7 %)	4 (26,7 %)	1 (6,7 %)
	<b>Ia ali pektinolitični Ia (+ - V - +)</b>	6	1 (16,7 %)	4 (66,7 %)	1 (16,7 %)
	<b>II (- + - +)</b>	3	3 (100 %)	0	0
	<b>III (- - - - +)</b>	1	1 (100 %)	0	0
HR negativni izolati	<b>IVa (+ + + + -)</b>	1	1 (100 %)	0	0
	<b>Vb (+ + - + -)</b>	13	6 (46,2 %)	4 (30,8 %)	3 (23,1 %)
	<b>Va ali Vb (V + - + -)</b>	4	1 (25 %)	1 (25 %)	2 (50 %)
	<b>Nedefinirani (različni profili)</b>	8	5 (62,5 %)	1 (12,5 %)	2 (50 %)
<b>Skupaj HR pozitivni izolati</b>		155	52 (33,6 %)	92 (59,4 %)	11 (7,1 %)
<b>Skupaj HR negativni izolati</b>		26	13 (50 %)	6 (23,1 %)	7 (26,9 %)



Slika 28: Inhibicije rasti glive *R. pilimanae* (roza barva) kot posledica sinteze toksina pri testiranem sevu NIB Z 1281 nacepljenem v ravni črti

Figure 28: Growth of the yeast *R. pilimanae* (pink color) inhibited by strain NIB Z 1281 streaked in straight line



Pri primerjavi rezultatov 26 izolatov, ki smo jih testirali tako v letu 2006 in v letu 2009 smo opazili, da se nam rezultat ujema pri 20 izolatih. Pri štirih izolatih smo v prvem poskusu dobili pozitiven rezultat in v drugem negativnega, pri dveh pa ravno obratno.

#### 4.3.6 Test patogenosti na stročjem fižolu

Pri 78 testiranih izolatih smo ocenili 4 različne tipe bolezenskih znamenj. Pri 50 izolatih smo opazili rahlo nekrozo ob mestu vboda, kar smo ocenili kot negativen rezultat. Pri 20 izolatih smo v celotnem času inkubacije opazili rjave nekroze. Take nekroze so značilne za seve patovarja *syringae*, ki niso izolirani iz fižola ampak iz drugih gostiteljskih rastlin (Cheng in sod., 1989). Pri 6 izolatih smo opazili najprej vodne madeže, ki so kasneje prešli v rjave nekroze. To je značilno za seve patovarja *syringae*, ki so izolirani iz fižola, le da pri nas nekroze niso bile vdrte, kakor poročajo za te seve. So pa ti sevi povzročali enaka bolezenska znamenja kot kontrolna bakterija NIB Z 689 (NCPBP 2684), ki je bila izolirana iz fižola (slika 29). Pri enem izolatu (NIB Z 504) smo opazili vodne madeže od začetka do konca inkubacije, kar je značilno za patovar *phaseolicola*. Nov tip madeža smo opazili pri sevu iz fotinije in sicer rjave drobne nekroze ob mestu vboda. Po jakosti smo 11 sevov ocenili z 1, 10 z 2 in 7 sevov z jakostjo 3. Iz preglednice 19 je razvidno da so bili pozitivni na testu patogenosti samo sevi, ki smo jih uvrstili v skupino Ia in en sev (NIB Z 646) iz LOPAT skupine II. Za seve *P. viridiflava* je značilno, da povzročajo nekroze, ki so po barvi podobne rji. Tudi pri nas smo opazili tako barvo pri tem sevu.



Slika 29 : Bolezenska znamenja na strokih fižola po 13 dneh inkubacije. A) NIB Z 554 (M399/03-2-1); B) D399/09 B2; C) D461/03 C9; D) NIB Z 689 (NCPBP 2684 iz *Phaseolus vulgaris*)

Figure 29: Symptoms on bean pods after 13 days of incubation. A) NIB Z 554 (M399/03-2-1); B) D399/09 B2; C) D461/03 C9; D) NIB Z 689 (NCPBP 2684 iz *Phaseolus vulgaris*)

Preglednica 19 : Rezultati testa patogenosti na fižolu glede na skupine LOPAT

Table 19: Results of pathogenicity test on bean pods in regard to LOPAT groups

	LOPAT skupina	Število izolatov	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4
HR pozitivni izolati	Ia + - - - +	51	24 (47,1%)	19 (37,3%)	1 (2,0%)	6 (11,8%)	1 (2,0%)
	Ib - - - - +	18	18 (100%)	0	0	0	0
	Ia ali Ib V - - - +	6	6 (100%)	0	0	0	0
	Ia ali pektinolitični Ia + - V - +	1	1 (100%)	0	0	0	0
	II - + - +	1	0	1 (100%)	0	0	0
	III - + - - +	1	1 (100%)	0	0	0	0

#### 4.3.7 Test patogenosti na plodovih hruške sorte Conference

Test patogenosti na plodovih smo izvedli na izbranih 181 sevih in 38 kontrolnih bakterijah. V preglednici 20 je prikazano število in deleži izolatov, ki so bili pozitivni, negativni ali sumljivi na testu patogenosti, glede na to v katero skupino LOPAT smo jih uvrstili. Razvidno je, da je največji delež pozitivnih med izolati, ki so uvrščeni v skupino Ia in izolati, ki so uvrščeni v skupino Ia, vendar imajo variabilni rezultat testa pektinolitičnosti. Med izolati, ki so uvrščeni v skupino Ib in so torej levan negativni, ni bilo nobenega seva, ki bi bil pozitiven na testu patogenosti. Tudi znotraj skupine, kamor je uvrščenih 15 izolatov, kjer smo dobili variabilne rezultate tvorbe levana med ponovitvami je samo en izolat (NIB Z 806) bil pozitiven na testu patogenosti. Drugi izolat (NIB Z 805) iz istega vzorca je bil levan pozitiven in je prav tako povzročal bolezenska znamenja na plodovih. Med 26 HR negativnimi izolati je bil le en izolat pri katerem je smo pri 3 od 12 vbodih opazili rahlo nekrozo na mestu inokulacije.

Izolate, ki so bili pozitivni na testu patogenosti na plodovih hrušk smo izolirali iz različnih gostiteljskih rastlin in sicer iz hruške, jabolane, japonske kutine, kutine, panešplje, skorša, marelice in slive. Ali je delež pozitivnih izolatov odvisen od gostiteljske rastline ne moremo reči, ker imamo za to premalo podatkov, saj je število izolatov iz drugih gostiteljskih rastlin razen jablan razmeroma majhno.

Med 38 kontrolnimi bakterijami, ki smo jih testirali (iz preglednice 7 nismo testirali samo NIB Z 830 - *Pseudomonas syringae* pv *morsprunorum*) so bile pozitivne vse tri kontrolne bakterije *P. syringae* pv. *syringae* izolirane iz španskega bezga, fižola in ječmena (*Hordeum vulgare*) in pa izolat *P. syringae* pv. *aptata*. Izolati, ki so bili na testu

patogenosti sumljivi pa so bili *P. syringae* pv. *lapsa* in en sev *P. viridiflava*, ki je bil izoliran iz hruške. Sumljiv rezultat testa patogenosti smo dobili tudi pri bakteriji *P. corrugata* pri čemer je imel samo en vbod od 12 nekrozo na mestu vboda, kar bi verjetno lahko določili tudi kot negativen rezultat.

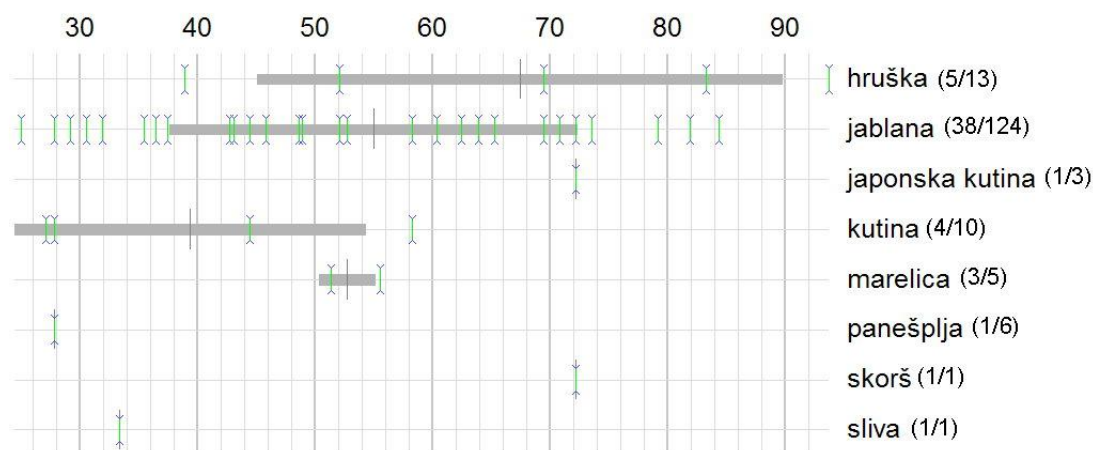
Preglednica 20 : Število pozitivnih, negativnih in sumljivih izolatov na TP na nezrelih plodovih hrušk Conference glede na skupino LOPAT

Table 20: Number of positive, negative and suspicious strains in pathogenicity test on immature pear fruits Conference in regard to LOPAT groups

	LOPAT skupina	Število izolatov	TP plodovi (0) negativni	TP plodovi (1) pozitivni	TP plodovi (2) sumljivi
HR pozitivni izolati	Ia (+ - - - +)	86	26 (30,2%)	49 (57,0%)	11 (12,8%)
	Ib (- - - - +)	44	41 (93,2%)	0	3 (6,8%)
	Ia ali Ib (V - - - +)	15	14 (93,3%)	1 (6,7%)	0
	Ia ali pektinolitični Ia (+ - V - +)	6	1 (16,7%)	4 (66,7%)	1 (16,7%)
	II (- + - +)	3	1 (33,3%)	0	2 (66,7%)
	III (- + - - +)	1	1 (100%)	0	0
HR negativni izolati	IVa (+ + + + -)	1	1 (100%)	0	0
	Vb (+ + - - -)	13	12 (92,3%)	0	1 (7,7%)
	Va ali Vb (V + - - -)	4	4 (100%)	0	0
	Nedefinirani (različni profili)	8	8 (100%)	0	0
<b>Skupaj HR pozitivni izolati</b>		155	84 (54,2%)	54 (34,8%)	17 (11%)
<b>Skupaj HR negativni izolati</b>		26	25 (96,2)	0	1 (3,8%)

Štiri seve smo nacepili dvakrat in primerjali rezultate. Dva izolata sta bila negativna v obeh paralelkah, dva izolata pa pozitivna prav tako v obeh paralelkah. Pri izračunu patogenost se rezultati pri enem izolatu zelo ujamejo (izolat 399/03 B2 – P=77,8 in P=81,9) pri izolatu 461/03 pa nekoliko manj (P=48,6 in P=77,8).

Iz slike 30, ki prikazuje graf ANOVA izračunane patogenosti pozitivnih sevov, lahko vidimo, da se izolati iz iste gostiteljske rastline lahko zelo razlikujejo v patogenosti. Graf ANOVA nakazuje razlike v patogenosti med gostiteljskimi rastlinami, vendar je zaradi manjšega števila izolatov iz drugih gostiteljskih rastlin tak zaključek preliminaren.



Slika 30 : Graf ANOVA izračunane patogenosti (vrednosti nad grafom) pozitivnih sevov pri TP na plodovih hruške *Conference* glede na gostiteljske rastline. V oklepaju: število pozitivnih sevov / število analiziranih sevov

Figure 30: ANOVA plot of calculated pathogenicity (values above chart) of positive strains in pathogenicity test on pear fruit *Conference* in different host plants. In brackets: number of positive strains / number of analyzed strains

#### 4.3.8 Test patogenosti na listih hruške sorte *Conference*

Test patogenosti na listih smo izvedli pri izbranih 181 sevih in 39 kontrolnih bakterijah. Iz preglednice 21 je razvidno, da je tudi pri testu patogenosti na listih hrušk delež pozitivnih izolatov največji znotraj skupine LOPAT Ia, ter da je tudi v tem primeru znotraj skupine Ib ni seva, ki bi bil pozitiven. Se pa je v primerjavi s testom patogenosti na plodovih hrušk znotraj te skupine povečal delež sevov, ki so bili na testu patogenosti sumljivi. Med izolati skupine II (*P. viridiflava*) sta bila dva izolata pozitivna, pri enem pa je bil rezultat sumljiv. Med HR negativnimi izolati smo samo pri enem sevu opazili na enem od listkov nekrozo na mestu inokulacije.

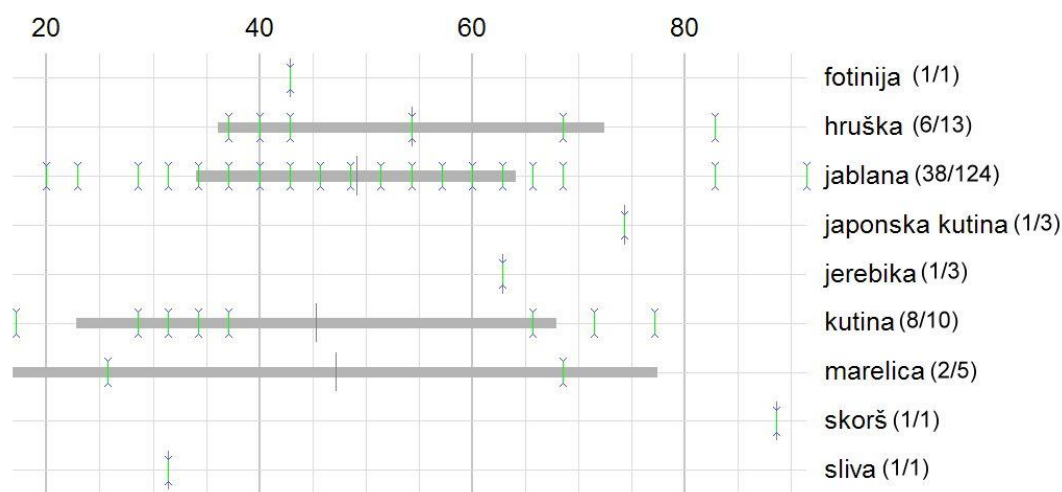
Med 39 kontrolnimi bakterijami, ki smo jih testirali, je bil pozitiven sev *P. syringae* pv. *syringae* iz fižola, *P. syringae* pv. *aptata*, pv. *morsprunorum* in pv. *phaseolicola* ter en sev *P. viridiflava*. Sumljiv rezultat pa smo dobili pri preostalih dveh sevih *P. syringae* pv. *syringae* ter patovarjih *lapsa*, *myrica*, *philadelphi* in *primule*. Pri slednjih treh patovarjih je bil pozitiven samo en listek na mestu inokulacije.

Izolati, ki so bili pozitivni pri testu patogenosti na listih so bili prav tako izolirani iz različnih gostiteljskih rastlin in sicer iz: hruške, jablane, japonske kutine, kutine, skorša, marelice, slive, fotinije ter jerebice. Najbolj patogene seve na podlagi izračuna patogenosti pri testu patogenosti na listih hrušk smo izolirali iz hruške, jablane, japonske kutine, jerebice, kutine, marelice in skorša (slika 31).

Preglednica 21 : Število pozitivnih, negativnih in dvomljivih izolatov na TP na listih hruške Conference glede na skupino LOPAT

Table 21: Number of positive, negative and suspicious strains in pathogenicity test on pear leaves Conference with regard to LOPAT groups

	LOPAT skupina	Število izolatov	TP listi (0) negativni	TP listi (1) pozitivni	TP listi (2) sumljivi
HR pozitivni izolati	Ia (+ - - - +)	86	21 (24,4%)	51 (59,3%)	14 (16,3%)
	Ib (- - - - +)	44	32 (72,7%)	0	12 (27,3%)
	Ia ali Ib (V - - - +)	15	9 (60,0%)	2 (13,3%)	4 (26,7%)
	Ia ali pektinolitični Ia (+ - V - - +)	6	2 (33,3%)	4 (66,6%)	0
	II (- + - +)	3	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)
	III (- + - - +)	1	1 (100%)	0	0
HR negativni izolati	IVa (+ + + + -)	1	1 (100%)	0	0
	Vb (+ + - + -)	13	13 (100%)	0	0
	Va ali Vb (V + - + -)	4	4 (100%)	0	0
	Nedefinirani (različni profili)	8	7 (87,5%)	0	1 (12,5%)
<b>Skupaj HR pozitivni izolati</b>		155	65 (41,9%)	59 (38,1%)	31 (20%)
<b>Skupaj HR negativni izolati</b>		26	25 (96,2)	0	1 (3,8%)



Slika 31 : Graf ANOVA izračunane patogenosti (vrednosti nad grafom) pozitivnih sevov pri TP na listih hruške Conference glede na gostiteljske rastline

Figure 31: ANOVA plot calculated pathogenicity (values above chart) of positive strains in pathogenicity test on pear leaves Conference in different host plants

Primerjava izražanja bolezenskih znamenj na testih patogenosti na plodovih in listih hrušk je opisana v poglavju 4.3.9.3.

### 4.3.9 Molekularne metode

#### 4.3.9.1 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA (16S rDNA RFLP) z encimoma *RsaI* in *MnII*

Pri 77 izbranih izolatih in eni kontrolni bakteriji *P. syringae* pv. *syringae* smo izvedli restrikcijo PCR produkta pomnožene 16S rDNA. Restrikcija je bila izvedena z encimoma *RsaI* in *MnII*. Z encimom *RsaI* smo med izolati dobili dva različna profila. Razlika med njima je bila, da so imeli nekateri izolati restrikcijski fragment dolžine  $\approx 800$  bp (*Rsa* 1 restrikcijski profil), drugi pa dolžine  $\approx 880$  bp (*Rsa* 2 restrikcijski profil). Ostali restrikcijski fragmenti so bili enakih dolžin ( $\approx 360$  bp,  $\approx 150$  bp in  $\approx 120$  bp). Pri analizi *in silico* zaporedij (priloga 11) z encimom *RsaI* smo ugotovili, da naj bi imeli sevi, ki imajo  $\approx 800$ bp dolg restrikcijski fragment, dodatno restrikcijsko mesto, ki razdeli  $\approx 880$  bp dolg produkt na dodatna dva fragmenta in sicer  $\approx 73$  in  $\approx 6$  bp, a na agaroznem gelu smo po elektroforezi opazili pod 100 bp nejasne lise.

Z encimom *MnII*, ki je pogosteje rezal, smo dobili večjo raznolikost in sicer 4 različne restrikcijske profile (preglednica 22). Tudi tukaj smo z analizo *in silico* zaporedij različnih patovarjev znotraj *P. syringae* in drugih bakterij iz rodu *Pseudomonas* preverili naše podatke (priloga 11). V teoretični restrikciji je restrikcijskih fragmentov še dosti več, kakor smo jih opazili na agaroznem gelu, vendar ker so bili manjši od 100bp jih z 2,5% agarozno gelsko elektroforezo nismo ločili. Najmanjši produkti, ki so bili še dobro vidni so bili okoli 100 bp. Pri treh sevih smo opazili še dodatni restrikcijski fragment v dolžini 330bp. Ugotovili smo, da je glede na druge prisotne fragmente to možno samo pri nepopolni restrikciji, zato smo jih iz analize odstranili.

Preglednica 22 : Dolžine restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA dobljenih z encimom *MnII*

Table 22: Length of restriction fragments of PCR amplified 16S rDNA obtained with *MnII* enzyme

Profil	Dolžina restrikcijskih fragmentov z encimom <i>MnII</i> (bp)									
	Mnl 418	Mnl 330	Mnl 281	Mnl 261	Mnl 253	Mnl 238	Mnl 187	Mnl 157	Mnl 126	Mnl cca 100
Mnl 1	x				x	x			x	x
Mnl 2	x					x	x		x	x
Mnl 3	x		x				x		x	x
Mnl 4				x		x	x	x	x	x

Med izolati, ki so imeli restrikcijski profil *Rsa* 1 smo opazili restrikcijske profile Mnl 1 in Mnl 2. Med restrikcijskim profilom *Rsa* 2 pa smo opazili profile Mnl 2, Mnl 3 in Mnl 4. Če smo združili rezultate restrikcij z obema encimoma smo dobili 5 različnih profilov.

Iz preglednice 23 lahko ugotovimo, da imamo znotraj LOPAT skupine Ia izolate, ki imajo vsi enak restrikcijski profil *Rsa* 1, vendar se razlikujejo na podlagi restrikcijskega profila Mnl. Izolati is skupin Ib, Ia ali Ib ter Ia ali pektinolitični Ia imajo vsi, razen seva iz jerebike

Rsa 1 in Mnl 1 restrikcijski profil. Sev iz jerebrike (NIB Z 538) ima restrikcijski profil Rsa 2 Mnl 2. Ta sev je odstopal od ostalih izolatov tudi v knjižnici podatkov pri analizi profila maščobnih kislin (slika 25).

Izolat, ki sodi v LOPAT skupino II (NIB Z 646) je imel poseben restrikcijski tip. Ker smo ga uvrstili v skupino, kamor uvrščamo bakterije *P. viridiflava*, smo primerjali restrikcijski profil z analizo *in silico* sekvence 16S rDNA bakterije *P. viridiflava* (priloga 11). Na podlagi profila Rsa sta se analizi ujemali, na podlagi profila Mnl pa je bilo razvidno, da ima naš izolat eno restrikcijsko mesto več. To razdeli produkt 253 bp na 187 bp in 66 bp. Ker fragmentov pod 100 bp na 2,5% gelu nismo ločili, smo to opazili samo v dodatnem produktu dolgem  $\approx 190$ bp. Za dokončno potrditev bi bilo potrebno narediti sekvenčno analizo 16S rDNA.

Preglednica 23 : Razporeditev izolatov v restrikcijske profile na podlagi restrikcijskih encimov *RsaI* in *MnlI* glede na skupine LOPAT

Table 23: Distribution of strains in restriction profiles on the basis of *RsaI* in *MnlI* restriction enzymes in different LOPAT groups

		LOPAT skupina	Št. Izolatov	Restrikcijski profili			
				Rsa 1 Mnl 1	Rsa 1 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 3
HR pozitivni izolati	Ia (+ - - - +)	33	15	18	0	0	0
	Ib (- - - - +)	15	15	0	0	0	0
	Ia ali Ib (V - - - +)	6	5	0	1	0	0
	Ia ali pektinolitični Ia (+ - V - +)	1	1	0	0	0	0
	II (- + - +)	1	0	0	0	0	1
	III (- + - - +)	1	1	0	0	0	0
HR negativni izolati	Iva (++++ -)	0	0	0	0	0	0
	Vb (++ - + -)	13	0	0	13	0	0
	Va ali Vb (V + - + -)	1	0	0	1	0	0
	Nedefinirani (različni profili)	3	0	0	0	3	0
<b>Skupaj HR pozitivni izolati</b>		57	37	18	1	0	1
<b>Skupaj HR negativni izolati</b>		17	0	0	14	3	0

Preliminarni rezultati kažejo, da na podlagi restrikcijskega profila Rsa lahko ločimo med HR pozitivnimi (profil Rsa 1) in HR negativnimi (profil Rsa 2) sevi znotraj rodu *Pseudomonas*. Pri naših izolatih to velja za vse seve razen za sev NIB Z 646 iz kutine, ki smo ga identificirali kot *Pseudomonas viridiflava* in že prej omenjeni sev iz jerebrike (NIB Z 538), ki ima profil maščobnih kislin drugačen od ostalih *P. syringae* sevov (slika 25). Pri

analizi *in silico* (priloga 11) smo ugotovili, da ima lahko restrikcijski profil Rsa 1 tudi *P. chlororaphis*, ki je nepatogena bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Na podlagi analiziranih sevov lahko na osnovi restrikcijskega profila Rsa grobo ločimo med HR pozitivne in HR negativne seve iz rodu *Pseudomonas*. Za dokončno potrditev bi morali analizirati večje število sevov.

#### 4.3.9.2 Repetitivni PCR z BOX1A oligonukleotidnim začetnikom (BOX-PCR)

Po normalizaciji in obdelavi agaroznih gelov s programom Bionumerics smo 155 HR pozitivnih sevov razvrstili v 22 skupin BOX (priloga 3). Kriterij za isto skupino je bila 70 % podobnost pri primerjavi denzitometričnih krivulj posameznih prstnih odtisov DNA. 124 sevov (83 %) lahko razdelimo v 6 skupin (skupine 3, 4, 6, 8, 10 in 19), ki vsebujejo po več kot pet sevov. V dve skupini so grupirani po štiri sevi (skupina 1 in 7), skupina 11 ima tri seve, skupini 18 in 21 po dva, pri ostalih skupinah (2, 5, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20 in 22) pa imajo sevi edinstven prstni odtis DNA saj so se od drugih sevov razlikovali za več kot 70 %.

Za 13 sevov smo izvedli reakcijo PCR in nanos na gel v dveh ponovitvah. Pri razvrščanju vseh rezultatov s ponovitvami smo ugotovili, da so se pri devetih sevih prstni odtisi DNA pri ponovljenem gelu ujemali z že postavljenimi skupinami, pri štirih sevi so se razporedili v druge skupine. Trije sevi so se prerazporedili znotraj skupin 6, 7 in 8, ki so si bile že na videz podobne. Razlika med njimi je bila večinoma v intenziteti posameznih lis na gelu, kar je prispevalo k različnemu razporejanju. En sev se je prerazporedil iz skupine 3 v skupino 4.

Ko smo imeli določene skupine že med vsemi 155 HR pozitivnimi bakterijami iz rodu *Pseudomonas* (LOPAT skupine Ia, Ib, II in III), smo v analizo priključili tudi 33 kontrolnih bakterij *P. syringae* in *P. viridiflava* (priloga 3). Določeni patovarji so se razvrstili v že ustvarjene skupine, drugi pa so se razvrstili posebej. Patovar *papulans* se je razvrstil s štirimi sevi (3 jablane, panešplja) iz skupine 1. Med tremi kontrolnimi bakterijami *P. syringae* pv. *syringae* se je vsaka razporedila v drugo skupino; iz španskega bezga v skupino 3, iz ječmena skupaj s patovarjema *lapsa* in *aptata* v skupino 4 ter sev iz fižola v skupino 6. Kontrolna bakterija *P. viridiflava*, izolirana iz hruške (NIB Z 1255=CFBP 1590) in se je razporedila z izolatom iz jablane NIB Z 1164 (83,9% podobnost). Kontrolna bakterija *P. viridiflava*, izolirana iz višnje (NIB Z 1258=CFBP 2555) pa se je razporedila z izolatom NIB Z 646 iz kutine (86,3% podobnost). Obe kontrolni bakteriji *P. viridiflava* ter naša dva izolata iz jablane in kutine skupaj tvorijo skupino s 69,9% podobnostjo.

Pri primerjavi patovarjev, ki so uvrščeni v genomsko skupino 2 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*, *glycinea*, *aesculi*, *myricae*, *tabaci*, *mori* in *P. savastanoi* pv. *savastanoi*) smo opazili, da so imeli sevi zelo podoben prstni odtis DNA (priloga 3) Med temi patovarji na



podlagi analize z BOX PCR ne moremo razlikovati. Od naših sevov so se v to skupino razvrstili izolat iz marelice (NIB Z 941), izolata NIB Z 100 in NIB Z 102. Izolat NIB Z 504 ima na osnovi računalniškega izračuna 69,2 % podobnost s to skupino, vendar je nižja podobnost posledica variabilnost med geli in ponovitvami. Če smo ta izolat primerjali z drugo ponovitvijo kontrolne bakterije NIB Z 688 (*P. syringae* pv. *phaseolicola*), je bila podobnost 97,6 %, zaradi česar ga lahko opravičeno uvršamo v to skupino. 64 % podobnost tej skupini ima tudi prstni odtis DNA izolata izoliranega iz vrtnice.

Vzorec žita (NIB Z 854) se uvršča z kontrolnimi bakterijami iz genomske vrste 4 (*P. syringae* pv. *porri*, *coronafaciens*, *striaefaciens*).

Če smo v analizo vključili tudi 26 HR negativnih sevov smo dobili 11 novih skupin BOX od katerih je 5 sevov imelo edinstveni prstni odtis DNA. Samo en sev se je razvrstil s HR pozitivnim sevom iz skupine BOX 15, ki je imel edinstven prstni odtis DNA. Podobnost med sevoma je bila 70,6 %.

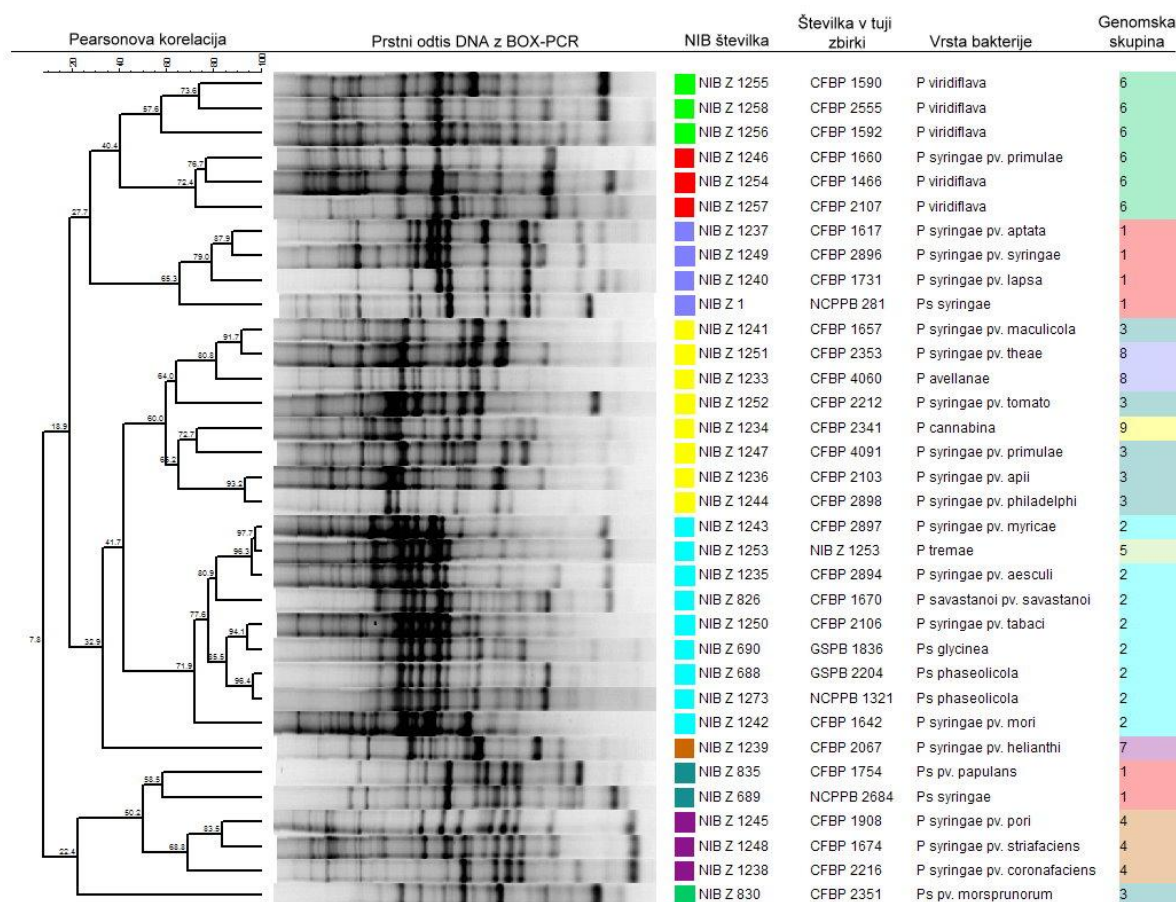
Pri primerjavi rezultatov LOPAT s skupinami BOX (preglednica 24) smo ugotovili, da med tema dvema testoma ni nobene povezave, saj so bili v posamezne skupine BOX razvrščeni sevi iz različnih skupin LOPAT in tudi izolati iz iste skupine LOPAT so razvrščeni v različne skupine BOX.

Preglednica 24: Razporeditev izolatov v skupine BOX glede na skupine LOPAT

Table 24: Distribution of strains in BOX groups in regard to LOPAT groups

		BOX skupina																																				
LOPAT skupina		Št. izolatov	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33			
HR pozitivni izolati	Ia (+ - - - +)	86	1	1	13	11	1	28	3	10			8	3	1		1						2	1		2												
	Ib (- - - - +)	44	2		4				1						1		1	1					34															
	Ia ali Ib (V - - - +)	15	1		10			1		1													1			1												
	Ia ali pektinolitični Ia (+ - V - +)	6			1	1		3		1																												
	II (- + - +)	3										1										1		1														
III (- + - - +)	1																						1															
HR negativni izolati	Iva (+ + + - -)	1																																		1		
	Vb (+ + - - -)	13																								1		1							6	1	3	1
	Va ali Vb (V + - - -)	4																									3							1				
	Nedefinirani (različni profili)	8																1							1				4	1	1							
	Skupaj HR pozitivni izolati	155	4	1	28	12	1	32	4	12	1	8	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	37	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Skupaj HR negativni izolati	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	1	4	1	2	6	1	3	2		

Preverili smo tudi ali lahko na podlagi analize kontrolnih sevov z BOX-PCR ločimo seve iz različnih genomskih skupin, kot so to izvedli Marques in sod. (2008). Ugotovili smo, da je trend razporejanja sevov iz istih genomskih skupin skupaj, vendar sevov iz določenih genomskih sevov ne moremo ločiti (slika 32).

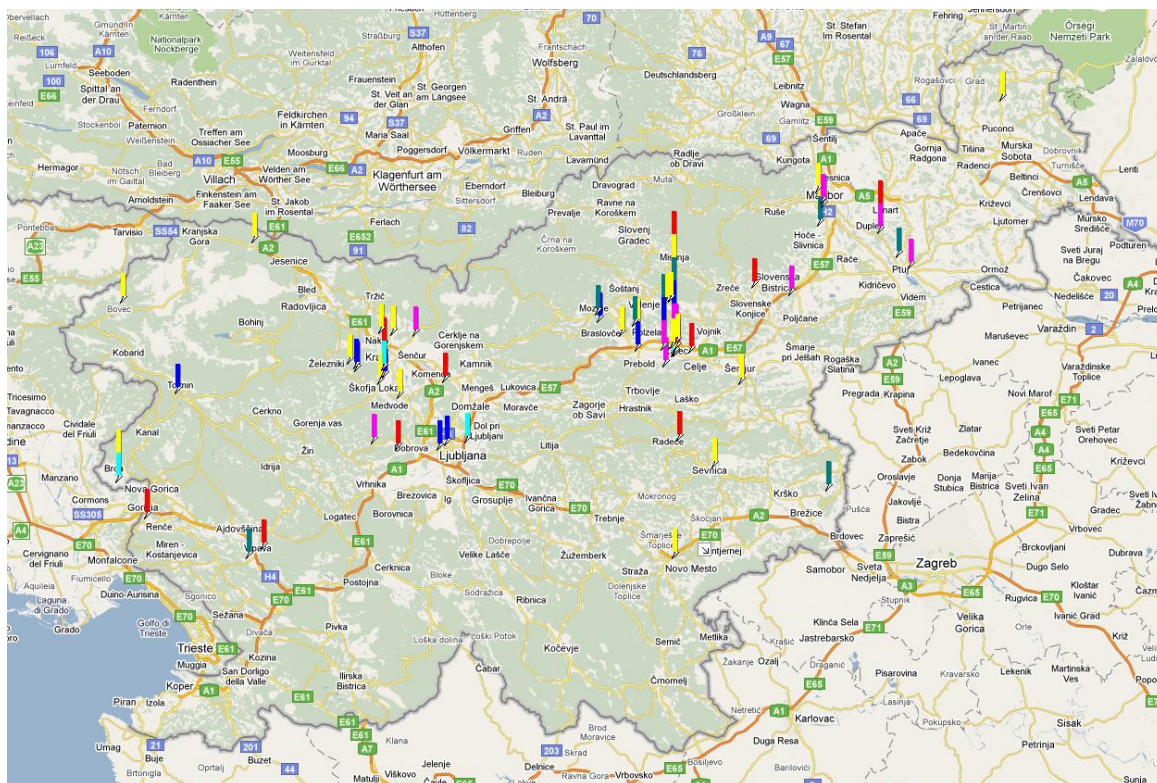


Slika 32: Dendrogram primerjave prstnih odtisov DNA kontrolnih bakterij dobljenih z BOX-PCR. Dendrogram je narejen s programskim paketom Bionumerics; za izdelavo matrike podobnosti je bila uporabljena Pearsonova korelacija

Figure 32: Dendrogram obtained by comparison of BOX-PCR fingerprinting patterns from reference strains. Dendrogram was produced with Bionumerics software; similarity matrix based upon Pearson correlation

Ugotovili smo, da večina prstnih odtisov DNA dobljenih z analizo BOX ni omejena niti na gostiteljske rastline (priloga 3) in tudi ne na lokacijo (slika 33). V skupini BOX 6 smo opazili izolate iz največ različnih gostiteljskih rastlin in sicer iz jablane, hruške, breskve, jerebike, kutine, marelice, skorša in tudi slive. Najmanj gostiteljev je imela skupina BOX 19, saj je bilo kar 95 % (35 sevov) izolatov iz jablan, vendar je bilo tudi 28 sevov iz te skupine izoliranih iz iste drevesnice. BOX PCR je tako lahko primerna metoda za sledenje širjenja posameznega klona. Poleg je lahko tudi kot pomoč pri določanju različnih *P. syringae* patovarjev, vendar ne patovarja *syringae*.

Šest najpogostejših skupin BOX (skupine: 3, 4, 6, 8, 10 in 19) z lokacijo vzorčenja je prikazana na sliki 33. Razvidno je, da lahko na eni lokaciji najdemo izolate, ki pripadajo različnim skupinam BOX pri tem da smo izolate iz istih skupin BOX izolirali na zelo različnih lokacijah po Sloveniji.



Slika 33: Geografska razpršenost izolatov, ki so bili razvrščeni v 6 največjih skupin BOX. Barva legenda: skupina BOX 3 = rumena, skupina BOX 4 = temno zelena, skupina BOX 6 = rdeča, skupina BOX 8 = roza, skupina BOX 10 = svetlo modra, skupina BOX 19 = temno modra

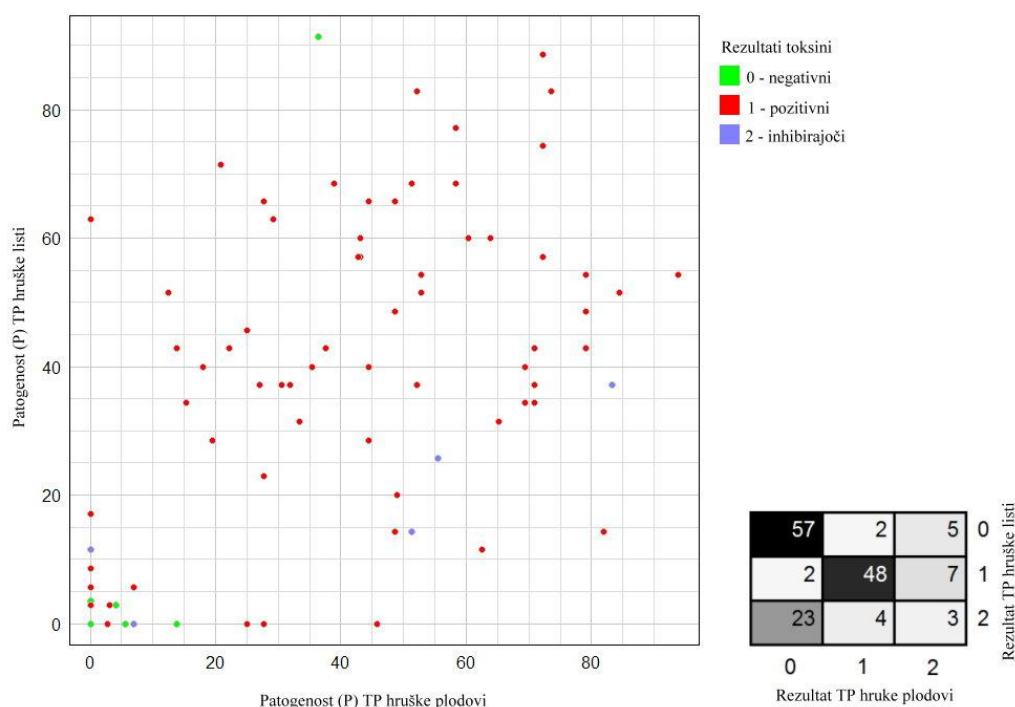
Figure 33: Geographical distribution of isolates clustered in major 6 BOX groups. Color legend: BOX group 2 = yellow, BOX group 4 = dark green, BOX group 6 = red, BOX group 8 = pink, BOX group 10 = light blue, BOX group 19 = dark blue

### 4.3.9.3 Preverjanje povezav med testi

#### 4.3.9.3.1 Preverjanje povezave med testi patogenosti

Pri primerjavi rezultatov testa patogenosti na plodovih in listih hruške smo upoštevali rezultate 151 sevov, ki smo jih uvrstili v vrsto *P. syringae*. Ugotovili smo, da je bilo 37,8% sevov pri obeh testih patogenosti negativnih, 31,8% sevov pri obeh testih patogenosti pozitivnih. Najbolj je odstopalo 23 sevov (15,2%), pri katerih smo na listih opazili nekrozo ob mestu inokulacije, na plodovih pa ni bilo vidnih nobenih bolezenskih znamenj. Le štiri sevi (2,6%) so bili takšni, da so bili na enem testu patogenosti pozitivni, na drugem pa negativni (slika 34 – desno). Pri primerjavi izračunane patogenosti pri teh dveh testih patogenosti med patogenimi sevi lahko rečemo, da ni bilo korelacije, kar se vidi tudi iz razpršenosti na 2-D razsevnem grafikonu (slika 34 - levo).





Slika 34 : Levo) 2-D razsevni grafikon primerjave izračunane patogenosti pri izolatih na testu patogenosti na plodovih in listih hruške. Barve prikazujejo rezultate testa toksinov; Desno) Kontingenčna tabela rezultatov testa patogenosti na plodovih in listih hrušk (0 – negativni, 1 – pozitivni, 2 – sumljivi)

Figure 34: Left) 2-D scatter plot of calculated pathogenicity of strains in pathogenicity test on pear fruits and leaves. Colors show the results of toxin assay; Right) Contingency table of results in pathogenicity test on pear fruits and leaves (0- negative, 1 positive, 2 suspicious).

Pri primerjavi rezultatov testov patogenosti na plodovih in listih hrušk ter na strokih fižola pri 76 izolatih, kjer imamo podatke za vse tri teste patogenosti, smo opazili, da je bil manjši delež pozitivnih sevov na fižolu, kakor na plodovih in listih hrušk. To pomeni, da so določeni sevi povzročali napredujoča bolezenska znamenja na plodovih ali listih, pri tem da so bili pri testu patogenosti na fižolu negativni. Obratno je sev NIB Z 504 (izoliran iz fižola) reagiral samo na fižolu s tipičnimi vodnimi madeži, zato smo ga na osnovi tega in drugih testov identificirali kot patovar *phaseolicola* in je tak rezultat pričakovan. Odstopal je tudi sev NIB Z 678 (izoliran iz panešplje) s pozitivnim testom na plodovih hrušk, strokih fižola, vendar je bil negativen na listih hrušk.

#### 4.3.9.3.2 Preverjanje povezave med tvorbo toksinov in testi patogenosti

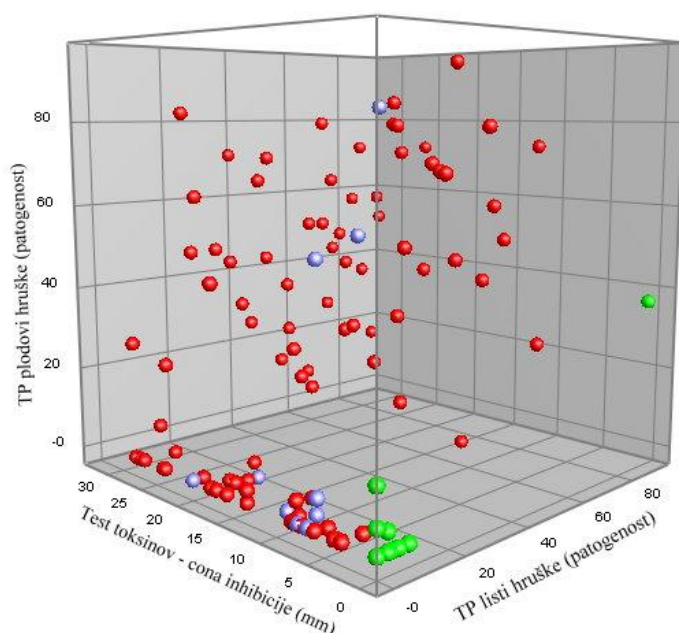
Povezavo med testi patogenosti in sposobnostjo sinteze toksinov smo izvedli med izolati, ki smo jih uvrstili v vrsto *P. syringae* (LOPAT skupine: Ia, Ib, Ia ali Ib Ia ali pektinolitični Ia). Rezultati so zbrani v preglednici 25 in prikazani na sliki 35. Ugotovili smo, da je bilo med sevi, ki so povzročali napredujoča bolezenska znamenja na plodovih, 50 sevov (92,6 %) tudi pozitivnih pri sintezi toksinov (rdeče obarvani na sliki 35), samo en sev (1,9%) je bil negativen (zelena barva). Tudi pri testu patogenosti na listih hrušk smo dobili podobne rezultate. 94,7% sevov, ki so bili pozitivni na testu patogenosti je tudi sintetiziralo toksin. Odstopal je sev NIB z 1157 izoliran iz jablane, ki je povzročal zelo izrazita bolezenska znamenja, vendar je bil test toksinov negativen. Pri testu patogenost na strokih fižolu so bolezenska znamenja povzročali izključno sevi, ki so bili sposobni sinteze toksinov.

Preglednica 25 : Primerjava rezultatov testa toksinov in testov patogenosti na plodovih hrušk, listih hrušk in stročjem fižolu

Table 25: Comparison of results of pathogenicity tests on pear fruits, leaves and bean pods

		Rezultat testa toksinov z glivo <i>R. pilimanae</i>					
		negativni		pozitivni		inhibirajoči	
TP plodovi hruške	Negativni	44	53,7%	31	37,8%	7	8,5%
	Pozitivni	1	1,9%	50	92,6%	3	5,6%
	Mejni	3	20,0%	11	73,3%	1	6,7%
TP listi hruške	Negativni	35	54,7%	24	37,5%	5	7,8%
	Pozitivni	1	1,8%	54	94,7%	2	3,5%
	Mejni	12	40,0%	14	46,7%	4	13,3%
TP fižol	Negativni	29	59,2%	19	38,8%	1	2,0%
	Pozitivni tip 1	0	0,0%	19	100,0%	0	0,0%
	Pozitivni tip 2	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%
	Pozitivni tip 3	0	0,0%	6	100,0%	0	0,0%
	Pozitivni tip 4	0	0,0%	1	100,0%	0	0,0%

Ugotovili pa smo tudi, da je bilo med sevi, ki so bili negativni na testih patogenosti na listih, plodovih ali fižolu, približno 38% takih, ki so bili sposobni sinteze toksinov.



Slika 35 : 3-D razsevni grafikon; X=Test toksinov; Y= TP plodovi hruške in Y= TP listi hruške. Legenda obarvanosti; Toksin pozitivni (rdeče), toksin negativni (zeleno), toksin inhibirajoči (violično)

Figure 35: 3d scatter plot; X=Toxin assay; Y= TP on pear fruit in Y= TP on pear leaves. Color legend; Toxin positive (red), toxin negative (green), toxin inhibition (violet)

#### 4.3.9.3.3 Preverjanje povezave med molekularnimi testi, testi patogenosti in tvorbo toksinov

Med 74 sevi, kjer smo upoštevali rezultate restrikcijske analize pomnožene 16S rDNA smo opazili, da imajo sevi, ki so bili pozitivni na testu patogenosti na plodovih hrušk izključno restrikcijski profil Rsa 1 Mnl 2 (preglednica 26). Med pozitivnimi sevi na testu patogenosti na listih tudi prevladujejo sevi s takim profilom, le dva seva sta imela restrikcijski tip Rsa 1 Mnl 1. To sta bila seva NIB Z 169 iz fotinije in sev NIB Z 544 iz kutine. Tudi na testu patogenosti na strokih fižola opazimo, da so tip bolezenskih znamenj 1 in 3 povzročali le sevi s profilom Rsa 1 Mnl 2 in ne s profilom Rsa 1 Mnl 1. Le dva seva, ki sta bila pozitivna na testu patogenosti na strokih fižola sta imela restrikcijski profil Rsa 1 Mnl 1, vendar sta povzročala drugačen tip bolezenskih znamenj. NIB Z 504 je povzročal vodne madeže značilne za *P. syringae* pv. *phaseolicola*, sev iz fotinije pa je povzročal poseben tip bolezenskih znamenj. Sevi z restrikcijskim profilom Rsa 2 Mnl 2 so bili vsi razen seva NIB Z 538 HR negativni. Ravno ta sev je bil tudi patogen na testu patogenosti na listih hruške. Ostali sevi so bili nepatogeni. Profil Rsa 2 Mnl 4 pa ima sev, ki smo ga identificirali kot *P. viridiflava* in je bil patogen na listih hruške, sumljiv na plodovih in povzročal je tudi tipične nekroze na stročjem fižolu.

Preglednica 26 : Rezultati testov patogenosti na plodovih hruške, listih hruške, stročjem fižolu in rezultati toksinov glede na restriksijski tip

Table 26: Results of pathogenicity test on pear fruits, leaves, bean pods in different restriction profiles

		Rsa 1 Mnl 1	Rsa 1 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 3	Rsa 2 Mnl 4
<b>Rezultati toksinov</b>	negativni	25	0	6	3	1
	pozitivni	11	18	6	0	0
	inhibirajoči	1	0	3	0	0
<b>TP plodovi hruške</b>	negativni	35	0	14	3	0
	pozitivni	0	17	0	0	0
	sumljivi	2	1	1	0	1
<b>TP listi hruške</b>	negativni	19	1	14	3	0
	pozitivni	2	15	1	0	1
	sumljivi	16	2	0	0	0
<b>TP fižol</b>	Negativni	35	4	0	0	0
	Pozitivni tip 1	0	11	0	0	1
	Pozitivni tip 2	1	0	0	0	0
	Pozitivni tip 3	0	3	0	0	0
	Pozitivni tip 4	1	0	0	0	0

Če primerjamo rezultate restriksijske analize pomnožene 16S rDNA in skupin BOX (preglednica 27), vidimo, da se različni restriksijski profili razvrščajo v druge skupine BOX in da se sevi z istim restriksijskim profilom razvrščajo v več skupin BOX. Na ta način vidimo, da z analizo BOX pokažemo večjo raznolikost med sevi v primerjavi z restriksijsko analizo pomnožene 16 rDNA, kar je bilo tudi pričakovano. Odstopa samo sev NIB Z 538, ki se grupira v skupino BOX 6 pri tem, da ima restriksijski profil Rsa 2 Mnl 2, ostali sevi iz te skupine pa imajo restriksijski profil Rsa 1 Mnl 2 .

Preglednica 27 : Primerjava razporeditve sevov z različnimi restriksijskimi profili v skupine BOX

Table 27: Comparison of distribution of strains with different restriction profiles into BOX groups

		skupina BOX																		
		1	3	4	5	6	8	9	10	12	14	19	20	24	25	26	28	29	30	31
Restriksijski profil	Rsa 1 Mnl 1	2	17	3	1					1	1	11	1							
	Rsa 1 Mnl 2					8	7		3											
	Rsa 2 Mnl 2					1								2	1		6	1	3	1
	Rsa 2 Mnl 3															3				
	Rsa 2 Mnl 4							1												

Primerjava rezultatov sevov iz različnih skupin BOX, skupin LOPAT, testov patogenosti in sposobnosti sinteze toksinov ter restriksijske analize pomnožene 16S rDNA je prikazana v preglednici 28. Razvidno je, da smo imeli znotraj iste skupine BOX seve, ki se razlikujejo tako v tvorbi levana kot pektinolitičnosti in so tako razvrščeni v skupine Ia, Ib ali tudi II. Večjo korelacijo smo opazili pri sposobnosti sinteze toksinov. V skupini 6, kamor smo uvrstili 32 izolatov, jih je bilo 90,6% toksin pozitivnih, sevi iz skupin BOX 7 (4 sevi), BOX 8 (12 sevov), BOX 10 (8 sevov) so bili vsi toksin pozitivni, v skupini BOX





#### 4.3.9.4 Uporaba Simpsonovega indeksa diverzitete za izračun diskriminatorne sposobnosti uporabljenih metod

Za izračun diskriminatorne sposobnosti posameznih metod, ki smo jih uporabili za ugotavljanje raznovrstnosti sevov, smo uporabili simpsonov indeks diverzitete. V preglednici 29 so prikazane izračunane vrednosti diskriminatornih indeksov posameznih metod in tudi indekse pri kombinaciji različnih metod. Naredili smo ločen izračun z upoštevanjem rezultatov samo HR pozitivnih sevov in za vse analizirane seve (preglednica 29)

Preglednica 29: Diskriminatorni indeksi za uporabljene metode in za različne kombinacije metod

Table 29: Discrimination indices for used methods and for different combination of them

Metoda	Samo HR pozitivni sevi			Vsi sevi		
	Število tipov	Diskriminatorni index	Število analiziranih sevov	Število tipov	Diskriminatorni index	Število analiziranih sevov
BOX-PCR	22	0,856	155	32	0,893	181
Rezistenca na baker	5	0,680	71	5	0,658	90
Test patogenosti na listih hruške	3	0,643	155	3	0,619	181
LOPAT testi	6	0,604	155	13	0,705	181
Test patogenosti na plodovih hruške	3	0,577	155	3	0,541	181
Test toksinov	3	0,534	155	3	0,571	181
Test patogenosti na strokih fižola	5	0,524	78	/	/	/
16 S rDNA RFLP	4	0,496	57	5	0,661	74
Profil maščobnih kislin	4	0,442	16	7	0,761	27
BOX-PCR + test patogenosti na listih hruške	32	0,909	155	44	0,932	181
BOX-PCR + test toksinov	32	0,907	155	47	0,931	181
BOX-PCR + LOPAT test	36	0,899	155	50	0,924	181
BOX-PCR + test patogenosti na plodovih hruške	32	0,885	155	44	0,914	181
BOX-PCR + 16 S rDNA RFLP	13	0,845	57	21	0,901	74
LOPAT testi z ostalimi biokemijskimi testi	20	0,719	143	34	0,792	167

Po pričakovanju je bila metoda z največjim diskriminatornim indeksom metoda BOX-PCR. Pri uporabi različnih kombinacij metod še dodatno povečujemo sposobnost razlikovanja sevov. Diskriminatorni indeksi se večinoma nekoliko povešajo če upoštevamo rezultate vseh analiziranih sevov iz rodu *Pseudomonas* in ne samo rezultate HR pozitivnih sevov iz tega rodu. Pri kombinaciji molekularnih z fenotipskimi testi je potrebna previdnost, saj se lahko zmanjša zanesljivost, ker imajo fenotipski testi slabo ponovljivost.

#### 4.3.9.5 Raznolikost sevov iz različnih gostiteljskih rastlin

Bakterije iz rodu *Pseudomonas* smo izolirali iz 18 različnih gostiteljskih rastlin, pri tem smo HR pozitivne seve izolirali iz 15 gostiteljskih rastlin. Največji delež izolatov (68,1%)

smo imeli izoliranih iz jablan, zato je raznolikost teh sevov tudi največja in je predstavljena ločeno v točki 4.3.9.6. Tudi pri ostalih gostiteljskih rastlinah, kjer smo imeli izoliranih po več ko dva seva, lahko vidimo, da se razlikujejo po večih izvedenih testih (preglednica 30). Izolati pripadajo različnim skupinam LOPAT, se razlikujejo po sintezi toksinov, restrikcijskih profilih, prstnih odtisih DNA, pridobljenih z BOX-PCR, ter sposobnosti povzročati bolezenska znamenja na izvedenih testih patogenosti. Tako se je npr. pri šestih izolatih iz panešpelj vsak prstni odtis DNA, pridobljen z BOX-PCR, razvrstil v svojo skupino BOX. Podobno raznolikost prstnih odtisov DNA opazimo tudi pri ostalih gostiteljskih rastlinah. Z analizo večjega števila sevov iz teh gostiteljskih rastlin je pričakovati, da bi bila raznolikost sevov še večja.

Preglednica 30: Primerjava rezultatov razvrstitve sevov v skupine LOPAT in BOX, testa toksinov, testov patogenosti, analize 16S rDNA RFLP pri sevih iz različnih gostiteljskih rastlin

Table 30: Comparison of results distribution of strains in LOPAT and BOX groups, toxin assay, pathogenicity tests and analysis of 16S rDNA RFLP in strains from different host plants

	Število sevov	HR negativni	HR pozitivni	LOPAT skupine										Toksini		TP plodovi		TP listi hruške		Tp fizol				Restrikcijski profil				BOX skupina						
				Ia	Ia ali Ib	Ia ali pekt Ia	Ib	II	III	IVa	Vb	Va ali Vb	Nedefinirani	negativni	pozitivni	inhibirajoči	negativni	pozitivni	sumljivi	negativni	pozitivni	sumljivi	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4		Rsa 1 Mnl 1	Rsa 1 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 3	Rsa 2 Mnl 4	
jablana	124	12	112	53	8	5	43	2	1		9	3	48	67	9	76	38	10	62	38	24	34	13		5		26	12	9					1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 27, 28, 30, 31, 32
hruška	13	2	11	8	2	1				1		1	4	6	3	5	5	3	6	6	1	5	1				2	2					3, 4, 6, 7, 8, 10, 19, 21, 23, 33	
kutina	10	1	9	7	1		1					1	3	7		3	4	3	1	8	1	4	3	1		1	2		1	1			4, 6, 8, 9, 22, 27	
panešpelja	6	1	5	2	2	1						1	2	3	1	5	1		4	2	2	3	1			3	1		1				1, 3, 4, 8, 19, 27	
marelica	5	1	4	4								1	2	3	2	2	3		2	2	1												6, 11, 29	
fižol	3		3	3								2	1	3		3			3								1						11, 12	
japonska kutina	3	2	1	1							2		1	2		2	1		2	1			1					1	2				8, 24, 33	
jerebika	3	2	1	1							1	1	2	1		3			2	1									2	1			6, 26, 27	
breskev	2		2	2									2			1		1		2		2					1						5, 6	
glog	2	2									1	1		2		2			2									2					25, 32	
ognjeni tm	2		2	1	1							1	1			2			2			1					1						3, 4	
radič	2	2									2			2		2			2														25	
fotinja	1		1	1									1					1								1	1						4	
krizantema	1	1									1	1				1			1														29	
skorš	1		1	1									1			1			1														6	
sliva	1		1	1									1			1			1			1											6	
vrtnica	1		1	1									1			1			1			1					1						14	
žito	1		1	1								1				1			1														2	

#### 4.3.9.6 Raznolikost sevov iz jablan

Največji delež sevov rodu *Pseudomonas* smo izolirali iz jablan (68,1%), zato smo posebej pogledali raznolikost teh sevov. Od 124 izoliranih sevov jih je bila 113 HR pozitivnih in 11 HR negativnih.

Pri primerjavi rezultatov pridobljenih z različnimi metodami (preglednica 31) je razvidno, da kažejo raznolikost pri vseh izvedenih testih. 43% izolatov je pripadalo skupini LOPAT

Ia in 35% skupini Ib. Samo izolate iz skupine LOPAT Ia smo lahko razvrstili v 9 različnih skupin BOX. Opazili smo, da je večina izolatov iz te skupine sposobna sintetizirati toksin siringopeptin ali siringomicin, razen izolatov, ki pripadajo skupinama BOX 3 in 1. Tudi seve iz skupine LOPAT Ib smo razvrstili v 7 skupin BOX pri tem da jih je največ razvrščenih v skupino BOX 19 (79%). Opazili smo da so bili sevi iz te skupine BOX negativni na vseh treh izvedenih testih patogenosti, pri tem, da jih je bilo skoraj polovica pozitivnih na testu sinteze toksinov. Le pri določenih sevih smo opazili šibko reakcijo tako na plodovih kakor na listih hruške, kjer pa bi lahko šlo tudi za hipersenzitivno reakcijo na negostiteljski rastlini.

Preglednica 31: Primerjava rezultatov analize BOX s skupinami LOPAT, testom toksinov, testi patogenosti in analizo 16S rDNA RFLP pri izolatih iz jablan

Table 31: Comparison of results of BOX analysis with LOPAT groups, toxin assay, pathogenicity tests and analysis of 16S rDNA RFLP in strains from apples

	BOX skupina	Število sevov	LOPAT skupine							Toksin			TP plodovi			TP listi hruške			Tp fižol				Restriksijski profil						
			Ia	Ia ali Ib	Ia ali pekt Ia	Ib	II	III	Vb	Nedefinirani	negativni	pozitivni	inhibirajoči	negativni	pozitivni	sumljivi	negativni	pozitivno	sumljivi	Tip 0	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	Rsa 1 Mnl 1	Rsa 1 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 2	Rsa 2 Mnl 4	
HR pozitivni izolati	1	3	1			2				3			3			1	2	2						2					
	3	23	12	7	1	3				20	2	1	22		1	17		6	14					13					
	4	5	4		1					1	4		1	3	1		4	1											
	6	21	19		2						21		0	19	2	1	17	3		6		5			7				
	7	3	2			1					3		1	2		1	2												
	8	7	5	1	1						7			6	1	1	6				4				3				
	10	7	7								7			7			7			3	2				2				
	13	1			1							1	1			1													
	15	2			1				1	1	1		2			1		1											
	16	1			1					1			1			1													
	17	1				1				1					1		1												
	18	2	2								1	1	1	1	1	0		1	1		1								
	19	35				34	1			15	18	2	32		3	26		9	13					10					
20	1					1			1			1			1				1				1						
21	1	1							1			1			1				1										
HR negativni izolati	27	1						1	1			1			1														
	28	1						1			1	1	1		0		1												
	30	6					6		3	3		6			6										6				
	31	1					1		1			1			1										1				
	32	2					2		2			1	1	1	2											2			

Iz jablan smo izolirali tudi bakterijo *P. viridiflava*, kar smo potrdili tudi z analizo BOX-PCR. Sev je bil tudi pozitiven na testu patogenosti na listih hrušk.

#### **4.3.9.7 Raznolikost sevov v posameznih vzorcih**

Pri 34 vzorcih smo izolirali in analizirali več sevov iz posameznega vzorca in sicer pri 25 vzorcih smo izolirali po dva seva, pri 6 vzorcih po 3, pri 2 vzorcih po 4 in pri enem vzorcu 6 sevov. Seve smo med seboj primerjali z analizo BOX, ker je bila metoda z najvišjim diskriminatornim indeksom med izvedenimi metodami (preglednica 29). Pri 15 vzorcih so bili vsi sevi izolirani iz posameznega vzorca uvrščeni v isto skupino BOX. Pri primerjavi rezultatov ostalih testov smo ugotovili, da še kljub enaki skupini BOX, nekateri razlikujejo po sposobnosti tvorbe levana. Pri določenih sevih smo opazili rahla odstopanja pri testih patogenosti in sicer variacijo med pozitivnim ter sumljivim rezultatom in pa sumljivim in negativnim rezultatom. Take razlike so verjetno v večini posledica variabilnosti pri izvedbi fenotipskih testov. Pri preostalih 19 vzorcih smo izolirali po dva ali več izolatov iz različnih skupin BOX. Pri določenih vzorcih smo izolirali tako HR negativne in HR pozitivne seve, pri določenih vzorcih pa smo izolirali več HR pozitivnih sevov z različnimi prstnimi odtisi DNA.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEP

### 5.1 RAZVOJ METODE PCR V REALNEM ČASU ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI *E. amylovora*

Ugotavljanje prisotnosti bakterije *E. amylovora* je navadno pri vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji relativno enostavno, saj bakterija zelo dobro raste na gojiščih in je v večini vzorcev prisotna v velikem številu. Problem pri ugotavljanju prisotnosti nastane, če so bolezenska znamenja zelo napredujoča, zastarana ali pa je število bakterij zelo nizko, kakor je to pri rastlinah z latentno okužbo. Te rastline lahko pomenijo pomemben vir prenašanja bolezni na neokužena področja.

Zadnjih nekaj let se v diagnostiki tako humanih kakor rastlinskih povzročiteljev bolezni uveljavlja metoda PCR v realnem času, ki omogoča hitrejšo, bolj občutljivo, ponovljivo in bolj zanesljivo odkrivanje povzročiteljev bolezni ob zmanjšani možnosti navzkrižnih kontaminacij, boljšo možnost za avtomatizacijo in podajanja ne le kvalitativnih temveč tudi kvantitativnih rezultatov (Mackay, 2004; Bustin in Mueller, 2005).

Rezultati so pokazali, da nova amplikona, razvita na kromosomski DNA bakterije *E. amylovora*, pokrivata širok spekter izolatov, saj smo dobili pozitiven signal pri več kot 200 testiranih sevih bakterije *E. amylovora* iz različnih geografskih območjih. Več kot 140 sevov bakterije *E. amylovora* ter 20 sorodnih bakterij smo še dodatno testirali v okviru projekta Euphresco ERWINDECT, kjer smo prav tako uspešno potrdili bakterijo. Z amplikonom Ams smo zaznali najširši spekter sevov bakterije *E. amylovora*. S plazmidnim amplikonom smo zgrešili seve brez plazmida pEA29. Kljub temu, da so taki sevi v naravi redki, ima to vpliv na ugotavljanje prisotnosti bakterije, saj z uporabo detekcijskih metod s tarčo na plazmidu pEA29 pri teh sevih dobimo lažno negativen rezultat. Z amplikonom ITS nismo zaznali seva *E. amylovora* iz *Rubusa*. To dodatno podkrepi domnevo, da naj ti sevi ne bi imeli dodatnega 139bp dolgega zaporedja na koncu 16S-23S rRNA ITS regije (McGhee in sod., 2002).

Zanimivi so rezultati pri sevih iz rodu *Erwinia* iz japonskega otoka Hokkaido. Negativni signal, ki smo ga opazili pri amplikonu Ams je v skladu s prejšnjimi ugotovitvami, da ti sevi nimajo regije *ams* (Kim in sod., 2001). S pozitivnim signalom z amplikonom ITS pa lahko le potrdimo domnevo, da imajo ti sevi nekakšen vmesni status med bakterijama *E. amylovora* in *E. pyrifoliae* in kombinacija obeh reakcij nam da dodatno možnost njihove identifikacije.

Negativen signal z obema amplikonoma smo dobili tudi pri sevih iz rodu *Erwinia*, izoliranih iz nekrotičnih cvetov hrušk v Španiji, ter pri *E. billingiae*, kjer so Roselló in sod.

(2002) in Powney in sod. (2008) že dobili nespecifično pomnoževanje s različnimi reakcijami PCR za ugotavljanje prisotnosti bakterije *E. amylovora*. Čeprav sta si gena *amsC* in *cpsC* bakterije *E. amylovora* in *E. pyrifoliae* na aminokislinskem nivoju podobna 94% (Kim in sod., 2002), smo pri načrtovanju uspeli razviti začetna oligonukleotida in sondo na tistem delu regije *ams*, ki je bil dovolj različen (slika 16), da nismo dobili nespecifičnega pomnoževanja pri bakteriji *E. pyrifoliae* (preglednica 12).

Pri pomnoževanju sevov bakterije *E. amylovora* (preglednica 11) in ostalih bakterij iz preglednice 12 s kemijo SYBR Green smo ugotovili, da se pri vseh testiranih sevih *E. amylovora* talilna temperatura produktov ujema. Pri testiranju ostalih sorodnih sevov pa smo ugotovili, da se pri uporabi začetnih oligonukleotidov *Ams*, talilna temperatura produkta ujema pri bakterijah *E. amylovora*, sevih iz rodu *Erwinia* iz nekrotičnih cvetov ter *E. pyrifoliae*. Zato je za specifično zaznavanje te bakterije potrebna uporaba kemije Taqman.

Z vsemi tremi amplikoni (*Ams*, ITS in plazmidnim) smo uspeli zanesljivo ugotoviti prisotnost bakterije v suspenziji s koncentracijo  $1,8 \times 10^3$  celic/mL, kar ustreza manj kot štirim celicam na reakcijo in pomeni, da je občutljivost blizu ali enaka teoretični občutljivosti metode. Iz parametrov, ki opisujejo značilnosti reakcije PCR v realnem času (preglednica 13) smo ugotovili, da imamo pri vseh treh amplikonih dobro ponovljivost in učinkovitost pomnoževanja. Enako mejo občutljivosti ( $1,8 \times 10^3$  celic/mL) smo določili tudi pri vzorcih, kjer smo primerjali različne metode izolacije DNA (slika 19). Razlika med metodami je bila pri učinkovitosti pomnoževanja (preglednica 14), pri čemer z metodama DNeasy in QuickPick najbolj učinkovito odstranimo inhibitorje. Prva temelji na silikonskih kolonah in se je že v preteklosti izkazala kot zelo učinkovito (Dreo, 2007), pri drugi metodi pa se uporabljajo magnetni delci, na katere se veže DNA. Prednost slednje metode je tudi v tem, da je polavtomatska, saj proces vezave DNA na magnetne delce, čiščenje DNA ter raztapljanje poteka v avtomatskem sistemu KingFisher mL in je končan že v 30 min.

Pri primerjavi občutljivosti med amplikoni smo ugotovili, da je verjetnost določanja največja pri ITS ter najmanjša pri amplikonu *Ams* (sliki 20 in 21), saj je verjetnost določanja povezana s številom kopij tarče v genomu. Po podatkih McGhee in sod. (2002) ima *E. amylovora* sedem operonov za rRNA, vendar nima vsak operon tudi dodatne regije v dolžini 139bp, na kateri so bili razviti začetna oligonukleotida in sonda. McGhee in sod. (2002) so pri treh analiziranih sevih bakterije *E. amylovora* ugotovili, da je bilo število operonov z dodatno regijo med sevi različno, in sicer od 3 – 5. Bakterija ima tudi več kopij plazmida pEA29, na kateri temelji metoda PCR v realnem času, ki so jo razvili Salm in Gaider (2004). Kakšno je to število in kako variira med sevi ni znano. Znano pa je, da sta regija *ams* in s tem tudi gen *amsC* prisotna samo v eni kopiji, kar smo preverili z *in silico*

analizo naleganja začetnih oligonukleotidov in sonde na sekvenciran genom bakterije *E. amylovora*. Zato je ta amplikon najbolj primeren za kvantifikacijo bakterije.

Pri primerjavi občutljivosti in verjetnosti določanja uveljavljene metode vgnezdene reakcije PCR, ki pomnožuje del plazmida pE29 (Llop in sod., 2000), in metode PCR v realnem času s tremi amplikoni (Ams, ITS in plazmid) vidimo, da je v določenih primerih občutljivost vgnezdene reakcije PCR primerljiva s PCR v realnem času, vendar v določenih vzorcih z višjo koncentracijo ( $1,8 \times 10^4$  celic/mL) bakterije *E. amylovora* nismo zaznali. Poleg tega smo ugotovili, da je verjetnost zaznavanja bakterije *E. amylovora* z vgnezdeno reakcijo PCR manjša kakor pri PCR v realnem času pri vseh testiranih koncentracijah (preglednica 15). Prednost reakcije PCR v realnem času z amplikonoma Ams in ITS, pred vgnezdenim PCR in PCR v realnem času s tarčo na plazmidu je v tem, da zaznamo tudi bakterije brez plazmida pEA29.

Metodo PCR v realnem času z amplikonom Ams od leta 2007 uspešno uporabljamo tudi v diagnostične namene in sicer pri dodatnem testiranju vzorcev z izraženimi bolezenskimi znamenji. Vzorce, kjer opazimo sumljiva bolezenska znamenja, bakterije *E. amylovora* na gojiščih pa ne uspemo izolirati, dodatno testiramo s PCR v realnem času. Do sedaj smo bakterijo zaznali v dodatnih 9 vzorcih od skupno 49 testiranih vzorcev. Ker smo pri takih vzorcih naknadno izvedli še reakcijo PCR v realnem času z amplikonom ITS in plazmidnim amplikonom smo zmanjšali možnost morebitnega nespecifičnega pomnoževanja. Na ta način lahko utemeljeno opozorimo na prisotnost bakterije, ter na ponovne preglede v naslednji rastni sezoni.

## **5.2 UPORABA METODE PCR V REALNEM ČASU ZA SPREMLJANJE KONCENTRACIJE *E. amylovora* V OBOGATITVENIH GOJIŠČIH**

Po protokolu EPPO za testiranje bakterije *E. amylovora* (EPPO, 2004) je za vzorce brez bolezenskih znamenj ali za vzorce z izraženimi bolezenskimi znamenji (napredujoče nekroze, tretirane vzorce z bakrom ali antibiotiki) predvidena obogatitev v tekočem gojišču CCT in King B. Ta metoda je bila tudi preizkušena v 10 evropskih laboratorijih (Lopez in sod., 2006), vendar je o praktični uporabi zelo malo poročil. Zato smo v vzorce brez bolezenskih znamenj dodali bakterijo *E. amylovora* v mejni koncentraciji ( $\approx 10^3$  celic/mL) in spremljali spremembe v koncentraciji bakterije. Pri tem se je metoda PCR v realnem času, s katero lahko kvantificiramo bakterijo, izkazala kot zelo koristna. Pri vseh vzorcih smo po obogatitvi opazili povečanje koncentracije bakterij, kar pomeni, da se je bakterija v vseh primerih namnožila. Na podlagi vrednosti Ct vzorcev in vrednosti Ct standardne krivulje z znanimi koncentracijami bakterije *E. amylovora* smo lahko tudi približno ocenili

koncentracijo bakterije v vzorcih. Razpon koncentracij po obogatitvi je bil od  $10^5$  celic/mL do  $10^9$  celic/mL. Ko smo za vse te vzorce izvedli izolacijo bakterije *E. amylovora* na gojiščih CCT smo ugotovili, da bakterijo kljub sorazmerno visoki koncentraciji v nekaterih vzorcih, težko izoliramo. Opazili smo preraščanje plošč z drugimi bakterijami. Tudi dodatne redčitve obogatene vzorca, v nekaterih primerih niso pripomogle k izolaciji bakterije *E. amylovora*. Izolacija je bila predvsem uspešna pri vzorcih s koncentracijo nad  $10^7$  celic/mL. Pri tem smo opazili, da je uspešnost izolacije na trdnih gojiščih CCT skoraj dvakrat večja po obogatitvi v tekočih gojiščih King B kot po obogatitvi v tekočih gojiščih CCT, čeprav se ocenjene koncentracije niso bistveno razlikovale (slika 22). Razlog za slabšo izolacijo smo dokazali pri poskusu vpliva zamrzovanja pri  $-20$  °C obogatene suspenzije *E. amylovora* v gojišču CCT (slika 23), kjer je z vsakim zamrzovanjem pri  $-20$  °C zrastle manjše število bakterije *E. amylovora*. Takega negativnega učinka zamrzovanja obogatene suspenzije *E. amylovora* v obogatitvah King B na število celic nismo opazili. Dokončno smo negativen vpliv zamrzovanja CCT obogatitev dokazali pri vzorcih (slika 24). Tako se je samo zaradi enkratnega zamrzovanja pri  $-20$  °C uspešnost izolacije na ploščah CCT iz obogatitev CCT zmanjšala za skoraj polovico (iz 42% na 22,6%), zato je za večjo uspešnost izolacije bakterije *E. amylovora* iz obogatitev CCT priporočljivo, da se vzorce nanese na plošče CCT takoj po 72 urni inkubaciji.

Metodo spremljanja koncentracije bakterije *E. amylovora* v postopku obogatitve smo preizkusili tudi na 4 vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji, ki smo jih določili kot pozitivne samo s PCR v realnem času. Pri vseh smo ugotovili, da se vrednosti Ct pred in po obogatitvi niso razlikovale, kar pomeni da se bakterija ni namnožila in verjetno ni živa in zato tudi ni presenetljivo, da je na gojiščih nismo izolirati.

Na podlagi naših rezultatov lahko rečemo, da trenutna metodologija obogatitve bakterije v tekočih gojiščih po protokolu EPPO ni dovolj zanesljiva. Pokazali smo, da četudi je bila bakterija prisotna v vzorcih in se je razmnoževala, je v več kot v polovici takih vzorcev (večinoma s koncentracijami bakterije nižjimi kot  $10^7$  celic/mL) nismo mogli izolirati in dokončno potrditi. Čeprav je o fiziološkem stanju bakterije v latentnih vzorcih zelo malo znanega pa lahko domnevamo, da bi bile koncentracije po obogatitvi manjše v primerjavi z našim sevom, ki je bil prilagojen rasti na umetnih gojiščih. Podobno bi verjetno veljalo tudi, če bi bila potrebna reaktivacija iz stanja VBNC. Pri teh vzorcih domnevamo, da bi bila uspešnost izolacije še neprimerno slabša. V takih primerih nam uporaba kvantifikacije pred in po obogatitvi ne da samo informacije o prisotnosti patogene bakterije ampak tudi o možnosti rasti na gojiščih. Pri tem lahko tudi ocenimo koncentracijo in prilagodimo nanos na gojišča. Z uporabo več amplikonov, ki imajo tarčo na treh zelo različnih regijah, zmanjšamo možnost navzkrižne reaktivnosti in povečamo zanesljivost diagnoze, čeprav bakterije ne moremo izolirati v čisti kulturi.



### 5.3 RAZISKAVE BAKTERIJ IZ RODU *PSEUDOMONAS*

Raziskave raznolikosti bakterij iz rodu *Pseudomonas* so se raziskovalci lotili z različnimi pristopi in nameni. Ugotavljanje genetske raznolikosti bakterije *Pseudomonas syringae* z različnimi rep-PCR so tako izvedli Gilbert in sod. (2009), ki so analizirali seve izolirane iz belgijskih nasadov hrušk, češenj, višenj in sliv. Tudi Natalini in sod. (2006) so analizirali seve iz hrušk, ki so jih izolirali iz enega nasada. Rezultate so primerjali s predhodno raziskavo Scortichini in sod. (2003), ki so analizirali seve *P. syringae* pv. *syringae* iz različnih olesenelih in zelnatih rastlin izoliranih iz različnih področjih sveta. Tudi primerjava sevov z rep-PCR izoliranih iz koščičarjev so bile izvedene (Weingart in Völksch, 1997; Vicente in Roberts, 2007). Manj pa je podatkov o raznolikosti sevov izoliranih iz jablan ter okrasnih rastlinah iz družine rožnic ter raznolikost sevov izoliranih na širšem področju neke države.

Tako smo v raziskavo bakterij iz rodu *Pseudomonas* vključili seve iz različnih gostiteljskih rastlin iz družine rožnic, kjer so prevladovali sevi izolirani iz jablan. Sevi so bili izolirani iz vzorcev, ki so bili nabrani na različnih lokacijah v Sloveniji (slika 12 in 13). Z pridobljenimi rezultati smo pokazali, da je raznolikost bakterij iz tega rodu v Sloveniji velika. S tem smo tudi potrdili našo hipotezo. Izbrani izolati so se med seboj razlikovali v profilih LOPAT. Opazili smo tudi profile LOPAT, ki odstopajo od uveljavljenih skupin, kar potrjuje, da je raznolikost sevov v naravi večja, kot jo predvidevajo uveljavljene skupine LOPAT. Med HR pozitivnimi sevi rodu *Pseudomonas* smo opazili, da se le ti razlikujejo v sposobnosti sinteze toksinov, po profilu dobljenih z restrikcijo produkta pomnoževanja 16S rDNA z encimoma *RsaI* in *MnII*, v patogenosti na plodovih in listih hrušk ter na strokih fižola. Največjo raznolikost med sevi pa smo opazili pri analizi prstnih odtisov DNA pridobljenih z BOX-PCR, kar potrjuje tudi izračunan diskriminatorski indeks (preglednica 29).

Naše rezultate prstnih odtisov DNA pridobljenih z BOX-PCR smo primerjali z raziskavo Scortichini in sod. (2003), ki so opazovali kako se prstni odtisi DNA pridobljeni z BOX-PCR razlikujejo med sevi *P. syringae* pv. *syringae* izoliranih iz različnih olesenelih in zelnatih rastlinah. Njihove ugotovitve se ujemajo z našimi, saj so različne prstne odtise DNA opazili pri sevih, ki so bili izolirani iz iste rastline, pri sevih iz iste lokacije in tudi pri sevih iz istih gostiteljskih rastlin. Z našimi rezultati se ujemajo tudi ugotovitve, da imajo lahko izolati iz različnih gostiteljskih rastlin enak prstni odtis DNA. Njihove ugotovitve, da so sevi z določenimi prstnimi odtisi DNA bolj virulentni ter sposobni povzročati bolezenska znamenja na več gostiteljskih rastlinah, se skladajo z našimi rezultati, saj je iz preglednice 28 razvidno, da so na vseh treh testih patogenosti v večini pozitivni sevi iz skupin BOX 6, 8 in 10. Tudi večina sevov iz skupine BOX 7 je bilo sposobnih povzročati

bolezenska znamenja na listih in plodovih hrušk, vendar ti sevi niso bili testirani na strokih fižola.

Večino izbranih sevov smo izolirali iz rastlin jablan. Raznolikost le teh je bila velika (preglednica 31). Seve smo uvrstili v različne skupine LOPAT in velik delež sevov (35%) je pripadala skupini Ib, kamor uvrščamo levan negativne seve *P. syringae*. Od opisanih patovarjev na jablanah je levan negativen le patovar *papulans*. Pri dveh sevih iz te skupine (496 D10 in NIB Z 766), ki sta bila tudi negativna na prisotnost toksinov, se prstni odtisi DNA pridobljeni z BOX-PCR razvrščajo s kontrolno bakterijo *P. syringae* pv. *papulans*. Za potrditev ali gre res za ta patovar bi bilo potrebno narediti še dodatne biokemijske analize in izvedba testa patogenosti na plodovih jablan.

Glede na znano raznolikost sevov iz vrste *Pseudomonas syringae* je taksonomija in identifikacija teh bakterij še posebej težavna. Čeprav so pri vrsti *P. syringae* uvedli sistem patovarjev, ki naj bi pomagal rastlinskim bakteriologom pri identifikaciji povzročiteljev bolezni na rastlinah in omogočil uvedbo uradne nomenklature, pa se ta koncept z leti raziskav in ugotavljanju raznolikosti sevov, vsaj pri patovarju *syringae*, ni izkazal kot učinkovit (Scortichini in sod., 2003). Osnovna definicija tega patovarja je, da so vanj uvrščeni sevi, ki imajo isti krog gostiteljskih rastlin kakor sevi, ki so izolirani iz španskega bezga (*Syringa vulgaris*) (Young in sod., 1991). Že mnoge študije so pokazale, da je veliko sevov, ki niso patogeni na španskem bezgu, vendar so jih na podlagi ostalih značilnosti uvrstili v ta patovar. Gilbert in sod. (2009) so ugotovili, da imata lahko dva seva s popolnoma enakim prstnim odtisom DNA pridobljenim z REP, BOX, ERIC in IS-50 PCR, različno patogenost na španskem bezgu. Tudi pri naših sevih analiziranih z BOX-PCR smo opazili, da seva kljub enakemu prstnemu odtisu DNA nista imela enakih rezultatov pri testih patogenosti. Tako imajo sevi iz patovarja *syringae* med sabo le malo skupnih značilnosti, družila naj bi jih le prisotnost gena *syrB*, ki je vpleten v sintezo toksina siringomicina in patogenost na plodovih limon (Kennelly in sod., 2007; Scortichini in sod., 2003).

Sposobnost sinteze siringomicina in siringopeptina, ki je značilna predvsem za seve iz patovarja *syringae* in še nekatere druge patovarje (preglednica 3) smo testirali s testom inhibicije rasti glive *R. pilimanae*. Pri tem testu smo pri določenih sevih opazili, da cona inhibicije ni bila bistra, ampak so se še videli obrisi gliv. Po posvetu z avtorjem izvedbe tega testa (Bultreys, osebna komunikacija) to lahko pomeni, da je produkcija toksina zakasnjena ali pa glivo inhibira druga snov, ki ni siringomicin in siringopeptin. Za dokončno potrditev ali ima sev genski zapis za sintezo toksinov siringopeptina ali siringomicina, bi bilo smiselno v prihodnje izvesti analizo PCR, s katero bi dokazali zapis za gen *syrD*, ki je vključen v izločanje obeh toksinov. Pri testiranju kontrolnih bakterij *P. syringae* smo inhibicijo glive opazili pri vseh treh patovarjih *syringae*, pri patovarju *aptata*, *lapsa*, *glycinea* in enemu sevu *phaseolicola*. Za patovar *aptata* je znano, da dela

siringomicin (preglednica 3), za *lapsa* pa tega podatka ni. Presenetljivo je, da je pri dveh ponovitvah testa referenčni sev NIB Z 688 (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) inhibiral glivo. Glede na identiteto, bi sev lahko sintetiziral fazeolotoksin, ki pa nima učinka na inhibicijo glive *R. pilimanae*. Ker nimamo podatkov o izvoru tega seva je vprašljivo ali je ta sev dejansko *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Inhibicijo (popolno ali šibkejšo) smo opazili tudi med nekaterimi ostalimi bakterijami iz rodu *Pseudomonas* (priloga 10), kar pa tudi ni presenetljivo, saj je znano, da lahko glivo inhibirajo tudi druge substance (Greco in Scortichini, 2004; Catara in sod., 2007), zato je potrebna pozornost pri interpretaciji rezultata testa pri drugih vrstah bakterij kot je *P. syringae*.

Pri primerjavi rezultatov toksinov in testov patogenosti na fižolu, listih ter plodovih hrušk smo potrdili trditev, da so sevi ki tvorijo toksine praviloma patogeni (Bender in sod, 1999). Kakor je razvidno iz preglednice 25 in slike 35 so povzročali napredujoča bolezenska znamenja skoraj izključno sevi, ki so tvorili toksin, z nekaj izjemami. Rezultati se ujemajo tudi z nedavno študijo Gilbert in sod. (2010), kjer so opazili, da sevi *P. syringae* pv. *syringae*, ki niso tvorili toksina, tudi niso bili patogeni na listih hruške in le 1 sev (od 11 testiranih) je povzročal nekroze na plodovih hrušk. Za te seve je bil bolj primeren test patogenosti na cvetovih hruške, saj je nekrozo povzročilo 45,5% toksin negativnih sevov. Delež toksin pozitivnih sevov, ki so bili patogeni na listih hruške je bil v njihovem primeru 78%, pri nas pa 54%, delež toksin pozitivnih sevov na plodovih hrušk pa je bil pri njih 40% in pri nas 50%. Največji delež toksin pozitivnih sevov je povzročalo bolezenska znamenja na plodovih češenj.

S primerjavo naših rezultatov testov patogenosti na plodovih in listih hrušk ter na stročjem fižolu smo ugotovili, da je bil pri listih večji delež tistih, ki so povzročili le lokalno reakcijo in niso bili patogeni na plodovih. Razlog je lahko, da so ti sevi zelo šibko virulentni in je test patogenosti na listih hruške bolj občutljiv test, kar so opazili tudi že Gilbert in sod. (2009). Lahko pa gre tudi za preobčutljivostno reakcijo na nekompatibilnem gostitelju ali avirulenten sev na homolognem gostitelju (Yessad in sod., 1994).

Pri testu patogenosti na stročjem fižolu smo opazili, da so se pri našem poskusu bolezenska znamenja razvijala počasneje kakor jih navajajo v literaturi (Cheng in sod., 1989). Pri 6 sevih iz treh vzorcev (dve jablani, kutina) smo opazili bolezenska znamenja, ki bi bila lahko značilna tudi za seve *P. syringae* pv. *syringae*, ki povzročajo BSS (angl. bacterial brown spot) na fižolu. Pri teh se najprej razvijejo vodni madeži, ki obstanejo vsaj 4 dni, za razliko od ostalih sevov *P. syringae* pv. *syringae*, kjer so lahko vodni madeži opazni 1 – 2 dni potem pa postanejo rjave nekroze. Pri naših sevih smo opazili vodne madeže še po 9 dnevih opazovanja, vendar so se v celem poizkusu razvijala bolezenska znamenja zelo počasi. Po 4 dneh, ko naj bi se po Cheng in sod., (1989) test že končal, so se pri nas bolezenska znamenja šele dobro začela razvijati. Poleg tega smo opazili, da pri dveh nacepljenih strokih bolezenska znamenja na obeh niso bila vedno enaka. Lahko je prišlo do

pojava vodnih madežev samo na enem stroku. Za dokončno potrditev ali ti sevi res lahko povzročajo BBS na fižolu, bi lahko inokulirali rastline fižola ali pa naredili test patogenosti na strokih različnih sort stročjega fižola, saj le ti tudi vplivajo na rezultat testa (Cheng in sod., 1989). Načeloma velja domneva, da sevi *P. syringae* pv. *syringae* iz fižola kažejo specifičnost do gostitelja, saj naj bi le ti sevi povzročali na strokih fižola tip bolezenskih znamenj BBS (Cheng in sod., 1989). Opisanih je nekaj najdb tudi drugih sevov, ki pa so jih izolirali predvsem iz stročnic in dva seva iz hruške (Yessad-Carreau in sod., 1994), jablane (Scortichini in sod., 2003), ter sev iz navadne grašice (*Vicia sativa*, L.), ki pa lahko izdeluje tudi fazeolotoksin (Tourte in Manceou, 1995). Scortichini in sod. (2003) so pri analizi BOX-PCR sevov *P. syringae* pv. *syringae* iz različnih gostiteljev ugotovili, da se pri sevih izoliranih iz fižola prstni odtisi DNA razlikujejo od prstnih odtisov DNA iz drugih gostiteljskih rastlin. Pri nas se ta ugotovitev ne ujema, saj ima kontrolna bakterija NCPB 2684 iz fižola izolirana leta 1973 na Novi Zelandiji praktično identičen prstni odtis DNA z našimi sevi, ki so bili izolirani iz zelo različnih gostiteljskih rastlin kot so breskev, hruška, jablana, jerebika, kutina, marelica, skorš, in sliva.

Glede na raznolikost vrste *P. syringae* je identifikacija sevov do patovarjev navadno težavna in vključuje večje število biokemijskih in hranilnih testov, kar pa nam vedno ne da zadostnih informacij. Najbolj problematično je določanje patovarjev, ki so lahko prisotni na istih rastlinah, kot sta patovar *syringae* in *phaseolicola* na fižolu, *syringae* in *morsprunorum* na koščičarjih, patovar *syringae* in *papulans* na jablanah.

Metoda BOX-PCR, ki se je izkazala kot metoda, ki nam pokaže največjo raznolikost med analiziranimi sevi, je lahko primerna tudi za identifikacijo določenih patovarjev. V kombinaciji z izvedenimi testi LOPAT, biokemijskimi testi ter BOX-PCR smo tri seve iz fižola (NIB Z 100, NIB Z 102 in NIB Z 504) identificirali kot patovar *phaseolicola*. Tudi za sev iz marelice (NIB Z 941) po vseh izvedenih testih uvrstimo v patovar *morsprunorum*, kar dodatno potrjuje negativna hidroliza arbutina in prstni odtis DNA dobljen z BOX-PCR, ki se razvršča z sevi iz genske skupine 2, kamor so Marques in sod. (2008) ta patovar tudi uvrstili. Izolat iz žita (NIB Z 854) se razporeja s kontrolnimi bakterijami patovarjev iz trav in žit (patovarji *pori*, *striaefaciens* in *coronafaciens*). S kombinacijo testov LOPAT in analize BOX smo seva NIB Z 646 iz kutine in NIB Z 1164 iz jablane identificirali kot *P. viridiflava*. Pri izolatu NIB Z 646, kjer smo izvedli tudi restrikcijo PCR produkta pomnoževanja 16S rDNA z encimoma *RsaI* in *MnII*, se je restrikcijski profil v veliki meri ujema z *in silico* analizo kontrolne bakterije *P. viridiflava*. Na podlagi profila LOPAT bi lahko tudi sev NIB Z 1159 identificirali kot vrsto *P. viridiflava*, vendar je v tem primeru analiza BOX-PCR pokazala, da se je sev razporedil v skupino s sevi, ki smo jih identificirali kot *P. syringae*. Da lahko pri patovarju *syringae* profili LOPAT odstopajo od pričakovanega so ugotovili tudi Scheck in sod. (1997) kjer so izolirali seve, ki so bili patogeni na španskem bezgu ter pozitivni pri hibridizaciji s *syrB* in *syrD* sondo, vendar

niso imeli tipičnega profila z LOPAT in GATT testi (G – utekočinjenje želatine, A – hidroliza eskulina T – Tirozinazna aktivnost T – test uporabe tartrata).

Za identifikacijo bakterijskih vrst je primerna tudi analiza profila maščobnih kislin, vendar ne razlikuje med različnimi *Pseudomonas syringae* patovarji (Höfte in de Vos, 2006). Med sevi, ki smo jih testirali z analizo FAP, smo večino identificirali do bakterijske vrste (slika 25). Samo do rodu *Pseudomonas* je sistem identificiral sev NIB Z 538 izoliran iz jerebike. Ta je HR pozitiven in sodi v skupino LOPAT Ia ali Ib, ker smo pri ponovitvah testa tvorbe levana dobili različne rezultate. Izolat je inhibiral glivo *R. pilimanae*, in je bil patogen na listih hruške, ter imel enak restriksijski profil PCR produkta pomnožene 16S rDNA z encimom *RsaI* kot HR negativne bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Pri analizi BOX-PCR se razvršča s sevi iz skupine 6, vendar se vseeno profil razlikuje od ostalih sevov v tej skupini. Ali gre za poseben sev iz patovarja *syringae* ali pa za drugo bakterijsko vrsto z izvedenimi testi nismo uspeli definirati.

Pri izvedbi testov smo za določeno število sevov teste izvedli dvakrat ali tudi večkrat. Pri testih LOPAT smo opazili, da se rezultati tvorbe levana in pektinolitičnosti na rezinah krompirja med ponovitvami pri določenih sevih razlikujejo. Ker smo želeli ugotoviti ali se ti sevi razlikujejo od ostalih sevov tudi na podlagi katerega drugega testa, smo pri analizah uvedli dve dodatni skupini LOPAT pri HR pozitivnih (Ia ali Ib, Ia ali pektinolitični Ia) in eno dodatno skupino pri HR negativnih sevih (Va ali Vb). Pri testu toksinov z indikatorsko glivo *R. pilimanae* smo 26 sevov analizirali dvakrat. Od tega se pri šestih vzorcih rezultat ni ujema. Razlog je lahko v tem, da sta bila poskusa časovno ločena tri leta, kar pomeni, da so bili sevi pri vsakem poskusu nacepljeni na novo iz kroglic MicroBank ali pa je takšna ponovljivost lastnost tega testa. Teste patogenosti smo izvedli samo enkrat pri tem, da smo test izvedli na 5 listih, 3 – 4 plodovih z 4 vbodi ter na dveh strokih fižola s skupno 6 – 8 vbodov. Glede na predhodne raziskave, kjer so ponavljali teste patogenosti je bila ponovljivost dobra (Yessad in sod., 1994; Gilbert in sod., 2010), predvsem če ugotavljamo rezultate le kot pozitivne ali negativne in ne ugotavljamo velikost nekroz. Pri nekaterih izolatih smo ponovili tudi analizo BOX – PCR. Ponovljivost je bila dobra čeprav je pri določenih sevih prišlo do drugačnega razporejanja v skupine, vendar le znotraj bolj sorodnih skupin npr. 6, 7 in 8. Za samo izvedbo testa je zelo pomembna optimizacija in standardna izvedba metode, kjer je potrebno paziti na več dejavnikov: enaka agaroz, pufer, čas elektroforeze, volumen nanesen na elektroforezo, barvanje z EtBr, slikanje itd. Stead in sod. (2003) so ugotovili, da najzanesljivejšo identifikacijo dosežemo s primerjavo neznanega seva s kontrolnimi bakterijami na istem gelu. Prav zaradi slabše ponovljivosti med geli pri večih ponovitvah so Brusetti in sod. (2008) uporabili BOX-PCR z začetnim oligonukleotidom, ki je bil označen s fluorescentnim barvilom. Po PCR je sledila avtomatska kapilarna elektroforeza, ki je dala precej večjo ponovljivost in ločljivost. Na tak način bi lahko dobili še bolj zanesljive in ponovljive rezultate.

Metode, ki smo jih uporabili za ugotavljanje raznolikosti in identifikacijo bakterij rodu *Pseudomonas* so temeljile na različnih bioloških principih. Največjo raznolikost sevov smo opazili pri primerjavih prstnih odtisov DNA pridobljenih z BOX-PCR. Pri analizi združenih podatkov dobljenih iz večih repetitivnih metod (REP-PCR, ERIC-PCR, IS50-PCR, itd) pričakujemo, da bi bila raznolikost sevov še večja.

## 5.4 SKLEPI

V doktoratu smo preučevali bakterije, ki povzročajo ožig na rastlinah iz družine rožnic. V prvem delu smo se osredotočili na razvoj metode PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti bakterije *E. amylovora*. Pokazali smo, da sta amplikona Ams in ITS, ki sta bila razvita na kromosomski DNA, specifična in dovolj občutljiva za ugotavljanje te bakterije tako v vzorcih z bolezenskimi znamenjih kakor tudi pri latentnem testiranju.

Z novo metodo smo ocenili sposobnost odstranjevanja inhibitorjev pri treh različnih metodah izolacije nukleinskih kislin. Pri tem smo uvedli pol avtomatsko metodo z kompletom QuickPick™ SML Plant DNA in sistemom KingFisher® mL, ki omogoča zelo kratek čas izolacije.

Metoda je bila preizkušena kot dodaten presejalni test pri vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji, kjer bakterije *E. amylovora* nismo izolirali na gojiščih. V teh primerih gre lahko za neviabilno bakterijo v vzorcu ali pa so bolezenska znamenja posledica drugega vzroka. V 18% takih vzorcev smo bakterijo *E. amylovora* s to metodo zaznali. Z tremi različnimi amplikoni zmanjšamo možnost navzkrižne reaktivnosti z drugimi bakterijami. Metoda pa je tudi uporabna kot identifikacijski test pri izoliranih sevih *E. amylovora*.

Zmožnost kvantifikacije z metodo PCR v realnem času smo izkoristili za spremljanje koncentracije bakterije *E. amylovora* v latentnih vzorcih. Bakterija se je namnožila v razponu od  $10^5$  celic/mL –  $10^9$  celic/mL. Ugotovili smo, da je bakterijo zelo težko iz takih vzorcev tudi izolirati, kljub velikim koncentracijam bakterije v vzorcu. Pri tem smo tudi ugotovili negativen učinek zamrzovanja obogatitev CCT pred nanosom na plošče CCT. Zato je priporočljivo takoj po inkubaciji obogatene ekstrakte takoj nanesti na trdna gojišča CCT.

Podobna bolezenska znamenja, ki jih povzroča bakterija *E. amylovora* lahko povzročajo tudi bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Ker ni veliko podatkov o prisotnosti in raznolikosti teh bakterij na rastlinah v Sloveniji smo večje število sevov iz različnih gostiteljskih rastlin tudi analizirali z različnimi metodami. Metoda z največjim diskriminatornim indeksom, ki smo jo uporabili je bila BOX – PCR, kjer smo ugotovili, da imajo lahko enak prstni odtis

DNA sevi iz različnih gostiteljskih rastlin, ali pa imajo lahko sevi ene gostiteljske rastline zelo različne prstne odtise DNA. Posebej smo prikazali raznolikost sevov izoliranih iz jablan.

Na podlagi restrikcijske analize PCR produkta pomnoževanja 16S rDNA z encimom *RsaI* smo v večini lahko ločili med HR pozitivnimi in HR negativnimi bakterijami rodu *Pseudomonas*. Pri HR pozitivnih sevih rodu *Pseudomonas* z restrikcijskim tipom Rsa 1 smo opazili dva različna Mnl restrikcijska tipa. Pri tem so bili na izvedenih testih patogenosti v večini pozitivni le sevi z restrikcijskim tipom Mnl 2.

Opazili smo povezavo med določenimi skupinami BOX in sposobnostjo sinteze toksinov saj so bili v določene skupine BOX uvrščeni sevi, ki so bili v večini sposobni sinteze toksinov, pri tem da smo imeli skupine BOX, kamor so bili uvrščeni sevi, ki te sposobnosti niso imeli. V povezavi s sposobnostjo sinteze toksinov smo potrdili ugotovitve prejšnjih raziskovalcev, da je za patogenost sevov zelo pomembna sposobnost sinteze toksina.

Z metodo BOX-PCR v kombinaciji z LOPAT testi smo uspešno razvrstili večino izoliranih sevov v vrste in patovarje. Izolirali smo seve iz različnih patovarjev iz vrste *P. syringae*. Tako smo poleg sevov iz patovarja *syringae* izolirali še seve, ki smo jih uvrstili v patovar *phaseolicola* ter *morsprunorum*. Iz vzorca jablane in kutine pa smo izolirali tudi bakterijo *P. viridiflava*.

Poleg HR pozitivnih bakterij iz rodu *Pseudomonas* smo izolirali in analizirali tudi HR negativne bakterije. Nekateri med njimi so bili sposobni močne inhibicije rasti bakterije *E. amylovora*, kar je pomembno pri diagnostiki bakterije *E. amylovora*, saj lahko ovirajo izolacijo te bakterije na gojiščih. Takšni sevi so potencialno primerni za uporabo kot biokontrolni agensi.

## 6 POVZETEK (SUMMARY)

### 6.1 POVZETEK

*Erwinia amylovora* je bakterija, ki povzroča bolezen hrušev ožig, ki prizadene rastline iz družine *Rosaceae*. Bolezenska znamenja, ki jih povzroča se lahko zamenjujejo tudi z ostalimi patogenimi bakterijami, predvsem z bakterijo *Pseudomonas syringae*. Ugotavljanje prisotnosti bakterije iz vzorca z izraženimi bolezenskimi znamenji je navadno enostavna, saj je bakterija prisotna v velikem številu. Problemi nastanejo pri vzorcih, kjer so nekroze napredujoče, pri vzorcih tretiranih z antibakterijskimi sredstvi ali pri vzorcih brez izraženih bolezenskih znamenj, kjer je koncentracija bakterije navadno nizka. V teh primerih je potrebna uporaba občutljivih in specifičnih metod.

Z razvojem molekularnih tehnik za določanje mikroorganizmov so se tudi za ugotavljanje prisotnosti bakterije *E. amylovora* pojavile različne metode PCR, ki temeljijo na pomnoževanju kromosomske DNA (Bereswill in sod., 1995; Guilford in sod., 1996; Maes in sod., 1996; Obradovic in sod., 2007), ali plazmida pEA29 (Bereswill in sod., 1992, McManus & Jones, 1995, Llop in sod., 2000), za katerega se je dolgo mislilo, da je prisoten v vseh sevih. Nedavno pa so v Španiji (Llop in sod., 2006) in nato tudi na drugih geografskih območjih (Llop in sod., 2008) odkrili seve, ki so bili brez tega plazmida, pri tem da so bili ti sevi še vedno virulentni. Z molekularnimi tehnikami s tarčo na plazmidu pEA29 tako lahko dobimo lažno negativen rezultat. Tudi PCR v realnem času za ugotavljanje prisotnosti *E. amylovora* sta bila razvita že dva amplikona, vendar sta oba amplikona nalegala na plazmid pEA29. Potrebo po PCR v realnem času za zanesljivo ugotavljanje prisotnosti tega patogena s tarčo na kromosomski DNA so poleg nas opazili tudi drugi raziskovalci in zato so se skoraj hkrati pojavila še dva amplikona na kromosomski DNA (Lehman in sod., 2008; Mohammadi in sod., 2009).

Za razvoj PCR v realnem času smo izbrali dve regiji. Prva je na operonu *ams*, ki je pomemben za sintezo amilovorana, to je polisaharid, ki je edinstven za to bakterijo. Poleg tega je zelo pomemben za virulenco te bakterije. Amplikon smo razvili na genu *amsC*, znotraj že obstoječe regije, kjer so Bereswill in sod (1995) razvili začetne oligonukleotide za klasično reakcijo PCR. Druga regija, ki smo jo izbrali je intergenska regija med 16S in 23S rDNA. To je področje, ki se ga pogosto uporablja za razvoj molekularnih tehnik, saj je regija zelo specifična za posamezne vrste bakterij. Amplikon smo razvili na 139bp dolgi regiji, ki pa naj bi bila prisotna samo pri sevih izoliranih iz rastlin iz poddružine *Pomoideae* in ne pri sevih, ki okužujejo rastline iz *Rubusa* (Mcghee in sod., 2002).

Po veljavnih standardih je vsako na novo razvito metodo, ki jo želimo uporabljati v diagnostične metode potrebno primerno validirati, kar vključuje preizkus specifičnosti in občutljivosti ter preizkus na resničnih vzorcih. Tako smo specifičnost metode preverili na



preko 200 sevih bakterije *E. amylovora* z različnimi značilnostmi in iz različnih geografskih področjih. Na morebitno nespecifično pomnoževanje smo metodo preverjali pri različnih sorodnih bakterijah, biokontrolnih agensih, bakterijah, ki so prisotne na istih gostiteljskih rastlinah, simptomatičnih ekstraktih. Rezultati so se ujemali z pričakovanimi, saj smo z amplikonom Ams dobili pozitivno pomnoževanje pri vseh sevih *E. amylovora*, z amplikonom ITS pa pri vseh sevih razen iz *Rubusa*. Medtem ko pri ostalih sorodnih bakterijah nismo opazili nespecifičnega pomnoževanja pa smo z amplikonom ITS dobili pozitivne rezultate tudi pri sevih iz rodu *Erwinia* iz Hokkaida, kar dokazuje da imajo ti sevi nekakšen vmesni status med bakterijama *E. amylovora* in *E. pyrifoliae*.

Občutljivost nove metode smo preverjali tako na redčitveni vrsti suspenzije bakterije *E. amylovora* kakor tudi pri simptomatičnih ekstraktih z dodano znano koncentracijo bakterije v kombinaciji z različnimi metodami izolacije nukleinskih kislin. Ugotovili smo, da je občutljivost metode PCR v realnem času pri testiranju suspenzije blizu teoretične meje občutljivosti te metode, saj smo z metodo zanesljivo določili koncentracijo  $1,8 \times 10^3$  celic/mL ( $\approx 4$  celice na reakcijo). Pri primerjavi različnih ekstrakcijskih metod smo ugotovili, da najnižje vrednosti Ct dobimo pri DNeasy in QuickPick ekstrakcijski metodi. Ti dve metodi sta bili tudi najuspešnejši pri odstranjevanju inhibitorjev, kar smo ugotovili z izračunom učinkovitosti reakcij. Mediana verjetnosti določanja pri simptomatičnih vzorcih s koncentracijo  $1,8 \times 10^3$  *E. amylovora* celic/mL v kombinaciji z QuickPick izolacijo je bila pri vseh treh amplikonih 100%. Pri koncentraciji  $1,8 \times 10^2$  *E. amylovora* celic/mL pa je bila največja verjetnost določanja z amplikonom ITS, kar je bilo tudi pričakovano, glede na znano prisotnost večjega števila tarč na genomu. V primerjavi z uveljavljeno vgnezdno PCR (Llop in sod., 2000) smo ugotovili, da je nova metoda, bolj občutljiva, zanesljiva in tudi bolj primerja za hkratno analiziranje večjega števila vzorcev.

Metodo smo v letih od 2007 - 2009 uspešno uporabili za testiranje vzorcev z izraženimi bolezenskimi znamenji in tudi latentnih vzorcev ter za potrjevanje izoliranih sevov. Z metodo povečamo zanesljivost testiranja, kadar bakterije ne moremo izolirati na gojiščih. Morebitno navzkrižno reaktivnost pa zmanjšamo z uporabo različnih amplikonov v reakciji PCR v realnem času.

Metoda PCR v realnem času je primerna tudi za spremljanje koncentracije bakterije v postopku obogatitve v gojišču CCT in King B. Na tak način ugotovimo živost celic in sposobnost razmnoževanja. Kljub temu, da se je v našem poizkusu bakterija v vseh primerih namnožila (od  $10^5$  –  $10^9$  celic/mL) smo jo uspeli izolirati le v majhnem deležu na ploščah CCT po obogatitvi. Ugotovili smo tudi negativen učinek zamrzovanja obogatitev CCT pred nanosom na plošče CCT.

Bakterije rodu *Pseudomonas* so v naravi pogoste in prisotne na rastlinah, v zemlji, vodah in tudi v ozračju. Njihova vloga v življenju rastlin je zelo raznolika, nekatere sodelujejo pri

obrambi pred škodljivci, izboljšujejo rast, druge povzročajo bolezni. Na sadnem drevju jih najpogosteje opisujemo kot povzročitelje bolezni, ki povzročajo manjšo škodo, v primerjavi z *E. amylovora*. Navadno zmanjšajo kvaliteto plodov, čeprav v povezavi z zmrzaljo lahko povzročijo tudi odpadanje cvetov in s tem občutno zmanjšanje pridelka ali oslabijo drevesa s povzročanjem razjed na vejah in deblih. Taksonomija teh bakterij je zelo težavna, saj je raznolikost izredno velika. Pri vrsti *Pseudomonas syringae* so s tem namenom uvedli sistem patovarjev, kjer so želeli na tak način ločiti bakterije znotraj vrste glede na gostiteljske rastline, kjer povzroča bolezenska znamenja. Določeni patovarji imajo zelo ozek krog gostiteljskih rastlin na katerih povzročajo bolezenska znamenja, lahko pa seve iz enega patovarja najdemo na zelo različnih gostiteljskih rastlinah, tak primer je patovar *syringae*.

Med našimi izolati smo večina izolatov uvrstili v vrsto *P. syringae* in glede na gostiteljske rastline iz katerih so bili izolirani ter izvedenih testih jih večina sodi v patovar *syringae*. Raznolikost sevov bakterije *Pseudomonas syringae* na različnih gostiteljskih rastlinah so raziskovali že različni raziskovalci (Little in sod., 1998; Scortichini in sod., 2003; Gilbert in sod., 2009). Zelo pogosta metoda ugotavljanje raznolikosti teh sevov so metode repetitivnih PCR. Iz analiz pridobljenih prstnih odtisov DNA so nekateri raziskovalci prišli do zaključka, da imajo sevi iz istih gostiteljskih rastlin bolj podobne prstne odtise DNA v primerjavi s sevi iz drugih gostiteljskih rastlin (Sundin in sod., 1994; Little in sod., 1998). Nekateri drugi avtorji (Scortichini in sod., 2003) so dobili nasprotujoče podatke in so prav tako kot pri naši raziskavi dobili iz istih gostiteljskih rastlin zelo različne prstne odtise DNA hkrati pa so dobili enak prstni odtis iz sevov iz različnih gostiteljskih rastlin. Po do sedaj znani literaturi (Cheng in sod., 1989) se sevi *P. syringae* pv. *syringae* iz fižola razlikujejo od ostalih *P. syringae* pv. *syringae* sevov iz drugih gostiteljskih rastlin. Razlikovali naj bi se tako po bolezenskih znamenjih, ki jih povzročajo na fižolu kakor tudi po analizah prstnih odtisov DNA. Naše ugotovitve se s tem ne skladajo, saj smo iz dveh vzorcev jablan in vzorca kutine izolirali seve, ki so na strokih fižola povzročali bolezenska znamenja podobna kakor kontrolna bakterija izolirana iz fižola. Poleg tega so imeli ti sevi med seboj tudi zelo podoben prstni odtis DNA.

Pokazali smo tudi veliko raznolikost sevov iz jablan. Poleg večine sevov iz skupine LOPAT Ia, jih je bila kar 35% uvrščena v skupino LOPAT Ib kar ni značilno za patovar *syringae*. Nekateri med njimi inhibirajo rast glive *R. pilimanae*, vendar na testih patogenosti tako na plodovih hrušk in listih ter fižolu ne povzročajo bolezenskih znamenj. Iz enega vzorca jablane in kutine smo izolirali tudi bakterijo *P. viridiflava*. To je patogena bakterija, ki so jo že izolirali iz zelo različnih gostiteljskih rastlin, kot so paradižnik, fižol, kivi, melone, krizanteme, jajčevci, blitva in solata. Bakterija je pogosto na rastlinah prisotna kot epifit. Ali so bila bolezenska znamenja, ki smo jih opazili pri vzorcu jablane in kutine povzročena s to bakterijo nismo dokazali, sta pa bila oba seva pozitivna pri testu patogenosti na listih hrušk.

Ugotovili smo, da so na izvedenih testih patogenosti bili praviloma pozitivni sevi, ki so bili sposobni sinteze toksina, kar se ujema tudi z že izvedenimi študijami (Bender in sod., 1999; Gilbert in sod., 2010). Na podlagi restrikcijske analize 16S rDNA, ki je bila izvedena na omejenem številu izolatov, je večina HR pozitivnih sevov imela drugačen profil od HR negativnih sevov. Pri sevih, ki so imeli restrikcijski profil Rsa 1 smo opazili dva različna restrikcijska profila Mnl. Sevi z restrikcijskim profilom Mnl 2 so bili bolj patogeni na plodovih in listih hrušk ter tudi na testu patogenosti na fižolu kot sevi z restrikcijskim profilom Mnl 1.

Poleg sevov *Pseudomonas syringae* smo okarakterizirali tudi 26 HR negativnih sevov. Večina jih je bila izolirana v letu 2003, v kasnejših letih HR negativnih sevov nismo več shranjevali. Med temi sevi smo opazili tudi, da nekateri inhibirajo rast bakterije *E. amylovora*, kar ima lahko vpliv na izolacijo te bakterije na gojiščih in bi jih lahko potencialno uporabili za biološko kontrolo.

## 6.2 SUMMARY

*Erwinia amylovora* causes fireblight on rosaceous host plants. Symptoms could be confused with other bacterial diseases especially with the symptoms caused by *Pseudomonas syringae*. The detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic samples is usually straightforward as bacteria are present in large numbers and grow well on artificial media. Reliable diagnosis, however, can be difficult when bacteria are hindered in their growth on artificial media or their numbers are low due to abundant tissue necrosis, samples treated with pesticides or bactericidal compounds, and symptomless samples. For such samples a sensitive and specific method of detection is needed.

With the development of molecular methods for microbial detection, different PCR methods for *E. amylovora* detection became available. Some methods have target on chromosomal DNA (Bereswill *et al.*, 1995; Guilford *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 1996; Obradovic *et al.*, 2007) and others on plasmid pEA29 ((Bereswill *et al.*, 1992, McManus & Jones, 1995, Llop *et al.*, 2000). Recently, strains lacking the pEA29 plasmid were found in Spain (Llop *et al.*, 2006) and in various other geographical areas (Llop *et al.*, 2008). They were still virulent, so using a method targeting plasmid pEA29 could cause a false negative result. Real time PCRs for detection of *E. amylovora* were also already developed but both target plasmid pEA29. There was a general need to develop a sensitive method targeting chromosomal DNA and besides our amplicons, two other targeting chromosomal DNA became available (Lehman *et al.*, 2008; Mohammadi *et al.*, 2009).

Two regions of chromosomal DNA were selected as targets for the design of primers and TaqMan probes: The first was on *ams* operon involved in the synthesis of the capsular polysaccharide amylovoran, which is unique to *E. amylovora*. Amplicon was designed on *amsC* gene, internal to the target sequence of the primers designed by Bereswill *et al.* (1995). The second amplicon was designed on 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ITS). The 16S-23S ITS regions are extremely variable in size and sequence, even within closely related taxonomic groups and have been proven useful in detecting many bacterial species. The assay targets a 139 bp sequence present on some rRNA operons (McGhee *et al.*, 2002). In the original study this sequence was present only in *Erwinia amylovora* strains from fruit trees and not in the strains from *Rubus* spp. (McGhee *et al.*, 2002).

For using new detection methods in a diagnostic laboratory the methods should be properly validated, which includes specificity, sensitivity and testing on real samples. The specificity of newly designed amplicons was tested in over 200 *E. amylovora* strains of different geographic origins and characteristics, in other bacteria pathogenic to rosaceous plants, related bacteria, DNA from biocontrol agents, isolates from necrotic tissue and plant DNA extracted from samples of different hosts with blight symptoms. Amplification matched our expectations as all *E. amylovora* strains gave positive signals when amplified with real-time PCR targeting the *amsC* sequence, while ITS amplicon gave positive signals with all *E. amylovora* strains except the strain from *Rubus*. While no non-specific amplifications were observed, the ITS assay gave a clear positive signal with *Erwinia* spp. strains from Hokkaido, possibly reflecting their intermediate taxonomic status.

The sensitivity of the method was tested on serial dilution of *E. amylovora* in water as well as in spiked symptomatic samples extracted with different DNA- extraction methods. With both amplicons  $1.8 \times 10^3$  *E. amylovora* cells/mL ( $\approx 4$  cells per reaction) were reliably detected in water suspension showing that sensitivity of all the assays is close to/equal to the theoretical sensitivity of the method. DNA – extraction method influenced Ct values and amplification efficiency, with the DNeasy and QuickPick extraction performing best. With those two methods we were also able to remove inhibitory substances from samples, which is clearly indicated with calculated efficiency. The median detection probability in symptomatic samples with *E. amylovora* concentration of  $1.8 \times 10^3$  cells/mL in combination with QuickPick DNA-extraction methods was 100% with all three amplicons. On the other hand, detection was most probable with the ITS amplicon concentration of  $1.8 \times 10^2$  cells/mL since the target sequence is present in a higher number of copies in the genome. Compared to the widely used nested-PCR, the new method is more sensitive and reliable and suitable for high-throughput analysis.

The new method was successfully used in 2007, 2008 and 2009 for testing not only symptomatic but also latently infected samples and for confirmation of isolated strains. With this method we have increased the testing reliability of those samples where, for

some reason, we cannot isolate bacteria. Potential cross-reactivity in some samples is minimised by using several amplicons in real-time PCR reaction.

The real-time PCR method has also proven useful when estimating bacterial concentration during the enrichment process in CCT and King's B media, which gives us information about the viability of bacteria. Although the bacteria multiplied in all samples from concentration  $10^5$  to  $10^9$  cell/mL we were only able to isolate it in a few cases. We have also observed a negative effect of freezing of CCT enrichment before striking it on CCT plates. However this was not the case with KB enrichment.

Bacteria from genus *Pseudomonas* are widely present on plants, in soil, waters and also in the atmosphere. Some of them can participate in plant defence against pests and help to improve plant growth, while others are pathogenic. Pathogenic bacteria from genus *Pseudomonas* can often be found on fruit trees, where they can, in most cases, cause milder symptoms, usually by decreasing the quality of fruits. However, under some conditions, for example, in frost they induce flower loss, which can significantly decrease the crop. In addition, they can also cause extensive necrosis on trunk and branches, which can weaken the trees. Bacteria from this genus are very diverse, therefore, the taxonomic identification is very difficult. For *P. syringae* species the division in pathovars was established in order to help distinguish strains according to the host plant. Most of the pathovars appear to be relatively narrow host range strains, except for those classified as pathovar *syringae*.

Most of our isolated strains were identified as *P. syringae* pv. *syringae*. The diversity of *P. syringae* strains has already been studied by a few researchers (Little et al., 1998; Scortichini et al., 2003; Gilbert et al., 2009). The most common method used was repetitive PCR, which indicated that strains from the same plant species have similar fingerprints compared to strains from several different plant species (Sundin in sod.; Little et al., 1998). On the other hand, Scortichini et al. (2003) obtained data that contradicted previous researches since they noticed that strains from one plant species can have different fingerprints and strains isolated from different hosts can have identical profiles. During our research we obtained similar results to those of Scortichini et al. (2003). On the other hand, according to Cheng et al. (1989), *P. syringae* pv. *syringae* from beans have different DNA fingerprints than *P. syringae* pv. *syringae* from other host plants. They also cause different symptoms on host plants. However, our results show that strains isolated from quince and apple trees can cause similar symptoms on bean pods to the reference strains originally isolated from bean plants. Moreover, all strains had a very similar DNA fingerprint.

Also a great diversity of strains from apple trees was shown. Besides the majority of strains belonging to the LOPAT group Ia, 35% of strains was classified as LOPAT group Ib, which is not very typical for pv. *syringae*. Some of them can inhibit the growth of fungus *R. pilimanae*, but they do not cause symptoms on pear fruits, leaves or bean pods. Out of

two samples we also isolated *P. viridiflava*, which can be found on tomato, kiwi, melon and several other plants. Since this bacterium is often present on plant leaves as epiphyte, we cannot be certain that the symptoms were actually the consequence of *P. viridiflava* infection, although both strains were positive on pathogenicity test on pear leaves.

Similarly to Bender *et al.* (1999) and Gilbert *et al.* (2010), we have also noticed that most of the strains positive in pathogenicity tests, were also able to produce toxin. Our 16S rDNA restriction analysis showed that most of the HR positive strains had different profiles than HR negative strains. Strains that had Rsa 1 restriction profile had two different Mnl 2 restriction profiles. Strains with Mnl 2 caused stronger symptoms on pear fruits and leaves as well as in the pathogenicity test on bean p.

Besides *P. syringae* pv. *syringae*, we have also characterized 26 non-pathogenic strains. Most of them were isolated in 2003 since in the following years HR negative strains were not stored for further analysis. In some of those strains we have observed inhibitory properties against *E. amylovora*, which can have a negative effect on *E. amylovora* isolation from plant samples.

## 7 VIRI

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Meyers E.W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Bashan Y., de Bashan L.E. 2002. Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemo-thermal seed treatment. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 821-829.
- Baldwin C.H., Goodman R.N. 1963. Prevalence of *Erwinia amylovora* in apple buds as detected by phage typing. *Phytopathology*, 53: 1299-1303
- Bazzi C., Merighi M., Zhang Y., Jock S., Geider K., Lopez M.M. 1999. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in southern Europe by PFGE analysis. *Acta Horticulturae*, 489: 197-200
- Beer S.V., Kim J.H., Zumoff C. H., Gustafson H.L., Momol T., Tanii T. Tamura T. 1996. Characterization of bacteria that cause "bacterial shoot blight of pear" in Japan. *Acta Horticulturae*, 411: 179-181
- Bellemann P., Geider K. 1992. Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *Journal of general microbiology*, 138: 290-296.
- Bender C. L., Stone H. E., Sims J. J., Cooksey D. A. 1987. Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. tomato Tn5 mutants defective in coronatine production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30: 272-283.
- Bender C.L., Alarcón-Chaidez F., Gross D.C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63: 266-292
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3522-3526.
- Bereswill S., Bugert P., Volksch B., Ullrich M., Bender C.L., Geider K. 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2924-2930.
- Bereswill S., Bugert P., Bruchmüller I., Geider K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2636-2642.

- Bianciotto V., Bandi C., Minerdi D., Sironi M., Tichy V. H., Bonfante P. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 8: 3005-3010
- Billing E., Crosse J.E., Garrett C.M.E. 1960. Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pear. *Plant Pathology*, 9: 19-25
- Bonn W.G. 1979. Fire blight bacteria in symptomless dormant apple and pear buds. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1: 61-62
- Bonn W.G., van der Zwet T, 2000. Distribution and economic importance of Fire Blight. V: Fire Blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. Vanneste J.L. (ur). Wallingford, UK: CABI Publishing, 37-53.
- Botha W.J., Serfontein S., Greyling M.M., Berger D.K. 2001. Detection of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cuttings using a nested polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 50: 515-526.
- Braun-Kiewnick A., Sands D.C. 2001. Gram-negative bacteria. *Pseudomonas*. V: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria Schaad N.W., Jones J.B. Chun W. (ur.) Tretja izdaja, APS Press, 84-120
- Brusetti L., Malkhazova I., Gtari M., Tamagnini I., Borin S., Merabishvili M., Chanishvili N., Mora D., Cappitelli F., Daffonchio D. 2008. Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BMC Microbiology*, 8: 220
- Bugert P., Geider K. 1995. Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Molecular Microbiology*, 15: 917-933.
- Bultreys A., Gheysen I. 1999. Biological and molecular detection of toxic lipopeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and environmental microbiology*, 65: 1904-1909
- Burr TJ. 1982. Blister spot of Apples. NY food and Life Sciences Bulletin. No. 95.
- Burr TJ in Katz BH. H. 1984. Overwintering and distribution pattern of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* and pv. *syringae* in apple buds. *Plant Disease* 68: 383-385.
- Bustin S.A. 2005. Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5: 493-498
- Bustin S.A., Mueller R. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109: 365-379
- Calzolari A., Peddes P., Mazzucchi U., Mori P., Garzena C. 1982. Occurrence of *Erwinia amylovora* in buds of asymptomatic apple plants in commerce. *Phytopathology*, 103: 156-162



- Catara V. 2007. *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? *Molecular plant pathology*, 8: 233-244
- Cheng G.Y., Legard D.E., Hunter J.E., Burr T.J. 1989. Modified bean pod assay to detect strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that cause bacterial brown spot of snap bean. *Plant disease*, 73: 419-423
- De Bellis P, Schena L, Cariddi C, 2007. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 11-22.
- Denny T. P. 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 173–197.
- Dreo T. 2007. Razvoj detekcijskih metod bakterijskega ožiga vinske trte (*Xylophilus ampelinus*) in laboratorijska potrditev njene prisotnosti v Sloveniji. Doktorska disertacija
- Dye D.W., Bradbury J.F., Goto M., Hayward A.C., Lelliot R.A., Schroth M.N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59: 153-168.
- Egger, S., Holliger, E., Silvestri, G., Szalatnay, D., Felder, B., Gersbach, K., Hollenstein, R., Müller, U. Feuerbrandanfälligkeit von Kernobstsorten. Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW.  
[http://www.db-acw.admin.ch/pubs/wa\\_arb\\_07\\_pub\\_10320\\_d.pdf](http://www.db-acw.admin.ch/pubs/wa_arb_07_pub_10320_d.pdf) (10.3.2010)
- Ellison S.L.R., English C.A., Burns M.J., Keer J.T. 2006. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 6, 6: 33  
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6750-6-33.pdf> (februar 2010): 11 str. (10.3.2010)
- European Plant Protection Organization, 1992. EPPO Standards PM 3/40 *Erwinia amylovora*. Sampling and test methods. *EPPO Bulletin*, 22: 225-231.
- European Plant Protection Organization, 2004. Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/20, *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*, 34:159-171.
- European Plant Protection Organization, 2006. Distribution maps of quarantine pests for Europe. *Erwinia amylovora*.  
[http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia\\_amylovora/ERWIAM\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_amylovora/ERWIAM_map.htm)
- Gardan L., Bollet C., Abu Giorrah M., Grimont P. A. D., Grimont F. 1992. DNA relatedness among pathovar stains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse

- (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. International journal of systematic Bacteriology, 42: 606-612.
- Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F., Grimont P.A.D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutin and Dowson 1959). International journal of systematic Bacteriology, 49: 469-478
- Ge Q., van der Zwet T. 1996. Persistence and recovery of endophytic *Erwinia amylovora* in apparently healthy apple tissues. Acta horticulturae, 411: 29-31
- Gilbert V., Legros F., Maraite H., Bultreys A. 2009. Genetic analyses of *Pseudomonas syringae* isolates from Belgian fruit orchards reveal genetic variability and isolate-host relationships within the pathovar *syringae* and help identify both races of the pathovar *morsprunorum*. European journal of plant pathology, 124: 199-218
- Gilbert V., Planchon V., Legros F., Maraite H., Bultreys A. 2010. Pathogenicity and aggressiveness in populations of *Pseudomonas syringae* from Belgian fruit orchards. European journal of plant pathology, 126: 263-277
- Ginzinger D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Experimental Hematology, 30: 503-512
- Glickmann E., Gardan L., Jacquet S., Hussain S., Elasri M., Petit A., Dessaux Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. Molecular Plant Microbe Interactions, 11: 156-162.
- Gopalan S., He S. Y. 1996. Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. Plant disease, 80: 604-609.
- Gorris M.T., Cambra M., Llop P., López M.M., Lecomte P., Chartier R., Paulin J.P. 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. Acta Horticulturae, 411: 41-45.
- Gowda S.S., Goodman R.N. 1970. Movement and persistence of *Erwinia amylovora* in shoot, stem and root apple. Plant Disease Reporter, 54: 576-580
- Greco M., Scortichini M., 2004. Phytotoxic and biocidal metabolites produced in culture by *Pseudomonas avellanae*. Journal of Plant Pathology, 86: 296.
- Grimont P.A.D., Vancanneyt M., Lefevre M., Vandemeulebroecke K., Vauterin L., Brosch R., Kersters K., Grimont F. 1996. Ability of the biolog and biotype-100 systems to reveal the taxonomic diversity of the Pseudomonads. Systematic and Applied Microbiology, 19: 510-527.
- Gross M., Rudolph K. 1987. Demonstration of levan and alginate in bean plants (*Phaseolus vulgaris*) infected by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Journal of Phytopathology, 120: 9-19.

- Guilford P.J., Taylor R.K., Clark R.G., Hale C.N., Forster R.L.S. 1996. PCR based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 411: 53-56.
- Gurtler V., Stanisich V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S- 23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-16.
- Heimann M.F., Worf G.L. 1985. Fire blight of raspberry caused by *Erwinia amylovora* in Wisconsin. *Plant disease*, 69: 360
- Hirano S., Upper C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 624-653.
- Höfte M., De Vos P. 2006. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. V: Plant – Associated Bacteria. Gnanamanickam S.S. (ur.). Nizozemska, Springer: 507-533
- Hunter P.R., Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: and application of Simson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*, 26: 2465-2466
- Iacobellis N.S., Lavermicocca P., Grgurina I., Simmaco M., Ballio A. 1992. Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiological and molecular plant pathology*, 40: 107-116
- Introduction to quantitative PCR methods and application guide: 70200-00/Revision 084001. 2004. La Jolla, USA, Stratagene: 48 str.
- Jayaweera K., Flanagan P., 1982. Investigation of biogenic ice nuclei in the Arctic atmosphere. *Geophysical Research Letters*, 9: 94–97.
- Janse J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and applied microbiology*, 14: 335-345
- Janse J.D. 2005. *Phytobacteriology: principles and practice*. CABI Publishing: 241 str.
- Janse J.D. 2010. Diagnostic methods for phytopathogenic bacteria of stone fruits and nuts in COST 873. *OEPP/EPPO Bulletin*, 40: 68-85
- Jock S., Geider K. 2004. Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and *hrpN* genes. *Environmental Microbiology*, 6: 480–490
- Keil H.L., van der Zwet T. 1972. Recovery of *Erwinia amylovora* from symptomless stems and shoots of Jonathan apple and Bartlett pear trees. *Phytopathology*, 62: 39-42
- Kennelly M.M., Cazorla F.M., De Vicente A., Ramos C., Sundin G.W. 2007. *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees. Progress toward understanding and control. *Plant disease*, 91: 4-17

- Kerkoud M., Manceau C., Paulin J.P. 2002. Rapid diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, the causal agent of blister spot of apple, by polymerase chain reaction using specifically designed hrpL gene primers. *Phytopathology*, 92:1077-1083
- Kerstens K., Ludwig W. Vancanneyt M., De Vos P., Gillis M., Schleifer K.H. 1996. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 465-477.
- Kim J.H., Zumoff C.H., Gustafson H.L., Tani A., Laby R.J., Aldwinckle H.S., Beer S.V. 1996. Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different hosts and geographical areas. *Acta Horticulturae*, 411: 183-185
- Kim W.S., Garden L., Rhim S.L., Geider K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 899-906
- Kim W.S., Hildebrand M., Jock S., Geider K. 2001. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 147: 2951-2959
- Kim, W.S., Schollmeyer M., Nimtz M., Wray V., Geider K. 2002. Genetics of biosynthesis and structure of the capsular exopolysaccharide from the Asian pear pathogen *Erwinia pyrifoliae*. *Microbiology*, 148:4015-4024.
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of laboratory and clinical medicine*, 44: 301-307.
- Knapič M. 2010. Fitosanitarna uprava Republike Slovenije.  
[http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Erwinia/Erwinia2010/skupnaodl\\_26\\_marec.jpg](http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Erwinia/Erwinia2010/skupnaodl_26_marec.jpg) (5.5.2010)
- Kong H., Patterson C.D., Zhang W., Takikawa Y., Suzuki A., Lydon J. 2004. A PCR protocol for the identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on genes required for tagetitoxin production. *Biological control*, 30: 83-89.
- Kritzman G. 1993. A chemi-thermal treatment for control of seed-borne bacterial pathogens of tomato. *Phytoparasitica*, 21: 101-109.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 95-125
- Laby R.J., Beer S.V. 1992. Hybridization and functional complementation of the hrp gene cluster from *Erwinia amylovora* strain Ea321 with DNA of the other bacteria. *Molecular Plant – Microbe Interactions*, 5: 412-419

- Lavermicocca P., Iacobellis N.S., Simmaco M., Graniti A. 1997. Biological properties and spectrum of activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiological and molecular plant pathology*, 50: 129-140
- Lehman S.M., Kin W.S., Castle A.J., Svircev A.M. 2008. Duplex Real-time polymerase chain reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms.
- Lelliott R.A., Billing E. Hayward A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29: 470-489.
- Lešnik M., Knapič V., Orešek E., Ravnikar M., Jerman Cvelbar J., Potočnik A., Seljak G., Miklavc J., Viršček Marn M. 2008. Obvladovanje hruševega ožiga (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.).  
[http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Erwinia/strategija/OBVLADOVANJE\\_julij\\_08.pdf](http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Erwinia/strategija/OBVLADOVANJE_julij_08.pdf) (10.3.2010)
- Li X., DeBoer S.H. 1995. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology*, 85: 837-842.
- Lim C.K. Cooksey D.A. 1993. Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology*, 175: 4492-4498.
- Little E.L., Bostock R.M., Kirkpatrick B.C. 1998. Genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from stone fruits in California. *Applied and environmental microbiology*, 64: 3818-3823
- Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C., López M.M. 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23-31.
- Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., López M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in symptomless plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2071-2078.
- Llop P., Donat V., Rodriguez M., Cabrefiga J., Ruz L., Palomo J.L., Montesinos E., López M.M. 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96: 900-907.
- Llop P., López M.M., Cabrefiga J., Ruz L., Montesinos E. 2008. Study of the virulence in wild-type strains of *Erwinia amylovora* devoid of the plasmid pEA29. *Acta Horticulturae*, 793: 145-148.

- López M.M., Llop P., Gorris M.T., Peñalver J., Donat V., Cambra M., Keck M. 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 704: 99-106.
- Loreti S., Gallelli A. 2002. Rapid and specific detection of virulent *Pseudomonas avellanae* strains by PCR amplification. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 237-244.
- Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., De Bruijn F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60: 2286-2295
- Lupski J. R., Weinstock G. M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *The Journal of Bacteriology*, 174: 4525-4529.
- Lydon J., Patterson C.D. 2001. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 166-170
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10: 190-212
- Maes M., Garbeva P., Crepel C., 1996. Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant pathology*, 45: 1139-1149.
- Manceau C., Horvais A. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-rrestriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Applied and environmental microbiology*, 63: 498-505
- Martinec T., Kocur M. 1964. A taxonomic study of *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow in *sod*. 1920. *International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy*, 14: 5-14
- Marques A.S.A., Marchaisson A., Gardan L., Samson R. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* – *P. viridiflava* group. *Genetics and molecular biology*, 31: 106-115
- Matsuura T., Shinohara H., Inoue Y., Azegami K., Tsushima S., Tsukamoto T., Mizuno A. 2007. *Erwinia* isolates from the bacterial shoot blight of pear in Japan are closely related to *Erwinia pyrifoliae* based on phylogenetic analyses of *gyrB* and *rpoD* genes. *Journal of General Plant Pathology*, 73: 53-58
- Maxson-Stein K., McGhee G.C., Smith J.J., Jones A.L., Sudin G.W. 2003. Genetic analysis of a pathogenic *Erwinia* sp. isolate from pear in Japan. *Phytopathology*, 93: 1393-1399

- McGhee G.C., Schnabel E.L., Maxson-Stein K., Jones B., Stromberg V.K., Lacy G.H., Jones A.L. 2002. Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6182-6192.
- McManus P.S., Jones A.L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridizations. *Phytopathology*, 85: 618-623.
- McManus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., Jones A.L. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 443-465.
- Menggad M., Laurent J. 1998. Mutations in *ams* genes of *Erwinia amylovora* affect the interaction with host plants. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 313-322.
- Mittal S. M., Davis K. R. 1995. Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 165-171
- Mizuno A., Sato S., Kawai A., Nishiyama K. 2000. Taxonomic position of the causal pathogen of bacterial shoot blight of pear. *Journal of General Plant Pathology*, 66: 48-58
- Mohammadi M., Moltman E., Zeller W., Geider K. 2009. Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with real-time PCR. *European journal of plant pathology*, 124: 293-302
- Mohan S.K., Thomson S.V. 1996. An outbreak of fire blight in plums. *Acta Horticulturae*, 411: 73-76.
- Momol M.T., Norelli J.L., Piccioni D.E., Momol E.A., Gustafson H.L. 1998. Internal movement of *erwinia amylovora* through symptomless apple scion tissues into the rootstock. *Plant disease*, 82: 646-650
- Moragrega C., Llorente I., Manceau C., Montesinos E. 2003. Susceptibility of european pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays. *European journal of plant pathology*, 109: 319-326
- Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR® Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, 24: 954-962
- Norelli J. 2003. USDA, Appalachian Fruit Research Station.  
[http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease\\_descriptions/fire\\_blight\\_disease\\_cycle.htm](http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/fire_blight_disease_cycle.htm) (10.3.2010)
- Obradovic D., Balaz J., Kevresan S. 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by Novel Chromosomal Polymerase Chain Reaction Primers. *Microbiology*, 76: 748-756

- Ordax M., Marco-Noales E., López M.M., Biosca E.G. 2006. Survival Strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: Induction of the Viable-but-Nonculturable State. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3482-3488.
- Pajk P. Knapič V. 2004. Epifitocija hruševega ožiga v Sloveniji. 2004. V: Hrušev ožig, *Erwinia amylovora*, Knapič V., Jankovič I (ur), Alex založništvo, 49-57
- Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopoulou R., Doudoroff M. 1973. Nucleic acid omologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23: 333-339.
- Pastrik K.H., Elphinstone J.G., Pukall R. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 831-842.
- Patil S. S., Hayward A. C., Emmons R. 1974. An ultraviolet-induced nontoxigenic mutant of *Pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. *Phytopathology*, 64: 590-595.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29: 2002-2007.
- Powney R., Plummer K., Luck J., Rodoni B., Beer S.V. 2008. Evaluation of PCR-based protocols for the detection of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 793:
- Prosen D., Hatziloukas E., Schaad N.W., Panopoulos N.J. 1993. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology*, 83: 965-970.
- Rademaker J.L.W., Louws F.J., De Bruijn F.J. 1998. Characterization of diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Molecular microbial ecology manual* 3.4.3:1-27.
- Rademaker J.L.W., De Bruijn F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-pcr genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. V: Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. (ur). *DNA markers: protocols, applications, and overviews*. J. New York, N.Y: Wiley and Sons; 151-171
- Rasmussen R. 2001. Quantification on the LightCycler instrument. V: Meuer S., Wittwer C., Nakagawara K. (eds.) *Rapid cycle real-time PCR: Methods and Applications*. Heidelberg, Nemčija, Springer: 21-34
- Rhim S.L., Voelkisch B., Gardan L., Pulin J.P., Langlotz C., Kim W.S., Geider K. 1999. *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, cause a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathology* 48: 514-520



- Rico A., Lopez R., Asensio C., A izpun M.T., A sensio-S-Manzanera M.C., Murillo J. 2003. Non-toxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. *Phytopathology*, 93: 1553-1559.
- Rodoni B., Gillings M., Kinsella M., Gardner R., Geider K., Merriman P. 1999. Detection of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight, in the Royal Botanic Gardens, Melbourne, Australia. *Acta Horticulturae*, 489: 169-170
- Roine E., Wei W., Yuan J., Nurmiaho-Lassila E.-L., Kalkkinen N., Romantschuk M., He Y. S. 1997. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94: 3459–3464.
- Rosello M., Garcia V.S., Tarin A., Llop P., Gorris M.T., Donat V., Chartier R., Paulin J.P., Gardan L., Peñalver J., López M.M. 2002. Characterization of an *Erwinia* sp. isolated from necrotic pear blossoms in Valencia, Spain. *Acta Horticulturae*, 590: 139-142
- Salm H, Geider K, 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant pathology*, 53: 602-610.
- Sands D.C., Langhans V.E., Scharen A.L., de Smet G. 1982. The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. *Hungarian Meteorological Service*, 86: 148–152.
- Schaad N.W., Cheong S.S., Tamaki S., Hatziloukas E., Panopoulos N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in been seed extracts. *Phytopathology*, 85: 243- 248.
- Schaad N.W., Vidaver A.K., Lacy G.H., Rudolph K., Jones J.B. 2000. Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomonads* and *Xanthomonads* and recommendations. *Phytopathology*, 90: 208-213
- Scheck H.J., Canfield M.L., Pscheidt J.W., Moore L.W. 1997. Rapid evaluation of pathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a lilac tissue culture bioassay and syringomycin DNA probes. *Plant disease*, 81: 905-910
- Scortichini M., Marchesi U., Dettori M.T., Rossi M.P. 2003. Genetic diversity, presence of the *syxB* gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. *Plant pathology*, 52: 277-286
- Sebahia M., Bocsanczy A. M., Biehl B. S., Quail M. A., Perna N. T., Glasner J. D., DeClerck G. A., Cartinhour S., Schneider D. J., Bentley S. D., Parkhill J., Beer S. V. 2010. Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen *Erwinia amylovora* Strain ATCC 49946. *Journal of Bacteriology*, 192: 2020-2021

- Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H., Arch, S.A. 1988. European Handbook of Plant Diseases. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Smits T.H., Rezzonico F., Kamber T., Blom J., Goesmann A., Frey J.E., Duffy B. 2010. Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Molecular plant-microbe interactions*, 23: 384 - 393
- Sorensen K.N., Kim K.H., Takemoto J.Y. 1998. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. *Applied and environmental microbiology*, 64: 226-230
- Stead D.E., Simpkins S.A., Weller S.A., Hennessy J., Aspin A., Stanford H., Smith N.C., Elphinstone J.G. 2003. Classification and identification of plant pathogenic *Pseudomonas* species by REP-PCR derived Fingerprint. V: *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Iacobellis N.S. (ur.), Nizozemska, Kluwer Academic Publishers, 411-420
- Steinberger E.M., Beer S.V. 1988. Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1: 135-144.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Metraux J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- Sundin G.W., Demezas D.H., Bender C.L. 1994. Genetic and plasmid diversity within natural populations of *Pseudomonas syringae* with various exposures to copper and streptomycin bactericides. *Applied and environmental microbiology*, 60: 4421-4431
- Tanii A., Tamura O., Ozaki M. 1981. Causal pathogen of fire blight like symptoms of pear. *Annual phytopathology society of Japan*, 47: 102
- Tanii A. 1983. Fire blight like symptoms of pear and causal pathogen. *Proceedings of the 12th Plant Bacterial Disease Workshop*. Niigata, Japan
- Takahashi Y., Omura T., Hibino H., Sato, M. 1996. Detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *atropurpurea* by PCR amplification of specific fragments from an indigenous plasmid. *Plant Disease*, 80: 783- 788.
- Thomson S.V. 2000. Epidemiology of Fire Blight. V: Fire Blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. Vanneste J.L. (ur). Wallingford, UK: CABI Publishing: 9-36
- Tourte C., Manceou C. 1995. A strain of *Pseudomonas syringae* which does not belong to pathovar phaseolicola produces phaseolotoxin. *European journal of plant pathology*, 101: 483-490

- Ullrich M., Bereswill S., Volksch B., Fritsche W., Geider K. 1993. Molecular characterization of field isolates of *Pseudomonas syringa* pv. *glycinea* differing in coronatine production. *Journal of General Microbiology*, 139, 1927-1937
- Vallad G.E., Goodman R.M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44: 1920-1934.
- Van der Zwet T., Wells J.M. 1993. Application of fatty acid class analysis for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 338: 233
- Vanneste J.L., Eden-Green S. 2000. Migration of *Erwinia amylovora* in host plant tissues. V: Fire Blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. Vanneste J.L. (ur). Wallingford, UK: CABI Publishing: 73-83
- Vanneste J.L., Lex S., Vermeulen M., Berger F. 2001. Isolation of *Erwinia amylovora* from blighted plums (*Prunus domestica*) and potato roses (*Rosa rugosa*). *Acta Horticulturae*, 590: 89-94
- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F. J., Lupski J. R.. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40
- Vicente J.G., Roberts S.J. 2007. Discrimination of *Pseudomonas syringae* isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. *European Journal of plant pathology*, 117: 383-392
- Walker N.J. 2002. A technique whose time has come. *Science*, 296: 557-559
- Weingart H., Völksch B. 1997. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* pathovars using ERIC-, REP-, and IS50-PCR. *Journal of phytopathology*, 145: 339-345
- Widmer F., Seidler R.J., Gillevet P.M., Watrud L.S., DiGiovanni G.D. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2545-2553.
- Wilcox W. F., Department of Plant Pathology, NYS Agricultural Experiment Station at Geneva, Cornell University  
<http://www.nysipm.cornell.edu/factsheets/treefruit/diseases/fb/fb.asp>
- Wilhelm J., Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 4: 1120-1128
- Wiseman G. 2002. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International*, 85: 792-796

- Yessad S., Manceau C., Luisetti J. 1992. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant disease*, 76: 370-373
- Yessad – Cerreau S., Manceau C., Luisetti J. 1994. Occurrence of specific reactions induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean pods, lilac and pear plants. *Plant Pathology*, 43: 528-536
- Young J.M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of Applied Biology*, 118: 283-298
- Young J.M., Saddler G.S., Takikawa Y., De Boer S.H., Vauterin L., Gardan L., Gvozdyak R.I., Stead D.E. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. *Review of Plant Pathology*, 75: 721–763
- Yu J., Peñaloza-Vazquez A., Chakrabarty A.M., Bender C.L. 1999. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Molecular Microbiology*, 33: 712-720.
- Xu G.-W., Gross D. C. 1988. Evaluation of the role of syringomycin in plant pathogenesis by using Tn5 mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* defective in syringomycin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 1345–1353.
- Zaccardelli M., Spasiano A., Bazzi C., Merighi M. 2005. Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZ*(Pst). *European Journal of Plant Pathology*, 111: 85-90.
- Zhang Y., Bereswill S., Geider K. 1996. Differentiation of *Erwinia amylovora* by PCR and PFGE analyses. *Phytopathology*, 86: S12
- Zhao Y.F., Damicone J.P., Bender C.L. 2002. Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. *Plant Disease*, 86: 883-888.

## ZAHVALA

Doktorsko delo pod katerim sem podpisana, še zdaleč ne bi bilo tako, če ob ustvarjanju in pisanju le tega ne bi sodelovala pisana družčina več ljudi. Res sem pod delo podpisana sama in sem vanj vložila ogromno truda in časa, a na tem mestu se zahvaljujem vsem, ki so mi pri ustvarjanju stali ob strani in mi pomagali s človeško in strokovno podporo. Pa grem po vrsti.

Najprej zahvala moji dolgoletni mentorici prof. dr. Maji Ravnikar. Maja hvala za vse usmerjanje, nasvete, strokovne pripombe, ki jih je bilo na najini skupni poti od preddiplomskega obdobja do danes ogromno. Hvala za tvojo strokovnost in tudi osebnost. Ne govorim tu le o doktorskem delu, pač pa o celotnem sodelovanju odkar sem na NIB-u. Ogromno sem se uspela od tebe naučiti na vseh področjih in vedno mi je bilo v veselje praviti kako dobro »šefico« imam.

Zahvala gre tudi somentorci prof. dr. Maji Rupnik, katera me je popeljala v svet Pseudomonasov. Zahvaljujem se tudi preostalima članoma komisije za pregled in oceno doktorskega dela, prof. dr. Marini Dermastia in prof. dr. Gorazdu Avguštinu.

Pa smo pri mojih bakteriologih. Lidiya, Špela, Jana in Aleš, brez vaše pozitivne naravnosti bi bilo seveda vse nemogoče. Najlepša hvala za vso pomoč, ki ste mi jo brez kančka težke volje izkazovali ob izvajanju poizkusov, kljub temu da ste imeli dovolj svojega dela. Uživam ob delu z vami, rada sem v vaši družbi in rada kofetkam ter debatiram z vami. Zlati ste.

Posebej se zahvaljujem Tanja tebi, ker si mi s svojo strokovnostjo odprla svet rastlinske bakteriologije. Ogromno sem se naučila od tebe.

Ogromna zahvala gre seveda mojim najdražjim, možu, ki me je seveda podpiral in bodril pri delu, ter v času najbolj intenzivnega ustvarjanja moral biti toliko več s hčerkicama, saj je skušal uspešno nadomestiti moj manjko. Moji damici sta imeli vso pozornost očija, a so včasih le zajokale in hotele mamico, ki je bila zatopljena v delo na računalniku. Tudi njima hvala, da niso izsiljevale preveč pozornosti.

Za tem gre nedvomno velika hvala staršem, ki me podpirajo in spodbujajo že od mojih prvih korakov. Vsak starš si želi uspešnega otroka, otroka, ki gre po pravi poti in je v življenju srečen tako na osebni kot profesionalni poti. Hvala vama za usmerjanje in centriranje na moji poti, ki je nedvomno prava.

PRILOGA 1 : Sestava gojišč uporabljenih v raziskavi

ANNEX 1: Composition of media used for experiments

### **King B gojišče**

Proteozni pepton (Difco No.3/Oxoid, L85)	20 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,5 g/L
Glicerol (Difco glicerol 228220)	15 mL (≈ 18,9 g)/L
Agar (Oxoid No. 3)	15 g/L

pH = 7,0 - 7,2

### **SNA gojišče**

Nutrient broth (Difco 0003)	8 g/L
NaCl	8 g/L
Saharoza	50 g/L
Agar (Oxoid No. 1)	15 g/L

pH = 7,0 - 7,2

### **CCT gojišče**

saharoza	100 g/L
sorbitol (Sigma S-0900)	10 g/L
Niaproof (Sigma N-1404)	1,2 mL/L
Kristal violet (0,1% v absolutnem etanolu)	2 mL/L
Nutrient broth (Difco 0003)	8 g/L
Agar (Oxoid No. 1)	15 g/L

pH = 7,0 - 7,2

Po avtoklaviranju dodamo:

Talijev nitrat (1% raztopina)	2 mL/L
Cikloheksimid	50 mg/L

### **NA gojišče**

Nutrient broth (Difco 0003)	8 g/L
Agar (Difco)	15 g/L

pH = 7,2 – 7,4

se nadaljuje

nadaljevanje

PRILOGA 1 : Sestava gojišč uporabljenih v raziskavi

ANNEX 1: Composition of media used for experiments

**TSBA gojišče**

Trypticase Soy Broth	30 g/L
Agar Granulated	15 g/L

pH = 7,2 -7,4

**PGNaCl gojišče**

Pepton (Bacto pepton, Difco)	5 g/L
Glukoza (Kemika 0705007)	10 g/L
NaCl	5 g/L
Agar (Difco)	11 g/L

**Medium 2 agar**

Kvasni ekstrakt (Oxoid L21)	2 g/L
Pepton (Difco Bacto 211677)	5 g/L
NaCl	5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Riedel - ...)	0.45 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck 1.06586)	0,96 g/L
Agar (Oxoid No. 1)	8 g/L

pH = 7 (umerjamo z NaOH)

**MYA2 (malt 2% yeast extract)**

Malt extract (Biolife)	20 g/L
Yeast extract (Oxoid L21)	1 g/L
Agar (Oxoid No. 1)	20 g/L

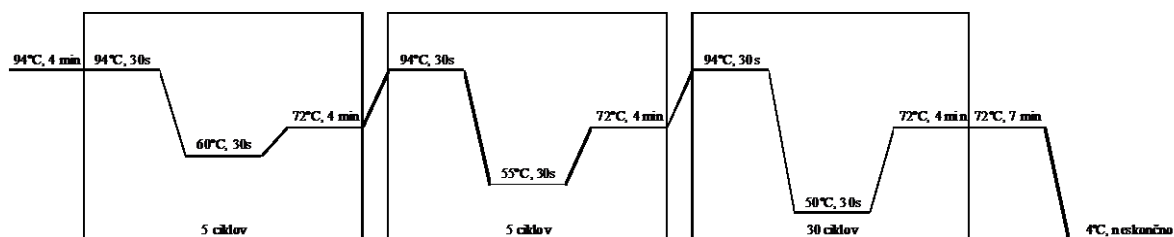
PRILOGA 2 : Priprava reakcijskih mešanic za polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnožene 16S rDNA ter pogoji pomnoževanja v reakciji PCR

ANNEX 2 : Reaction mixes for restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA and PCR program of amplification

### Reakcijska mešanica za reakcijo PCR:

Sestavina	μL za 1 vzorec
voda	35,875
10 x PCR pufer (Applied Biosystem)	5
MgCl <sub>2</sub>	3
dNTP miks (10mM)	4
27 fevb (10 μM)	0,5
1495 revb (10 μM)	0,5
AmpliTaq (5 U/μL, Applied Biosystem)	0,125
Vzorec	1

### Program pomnoževanja:



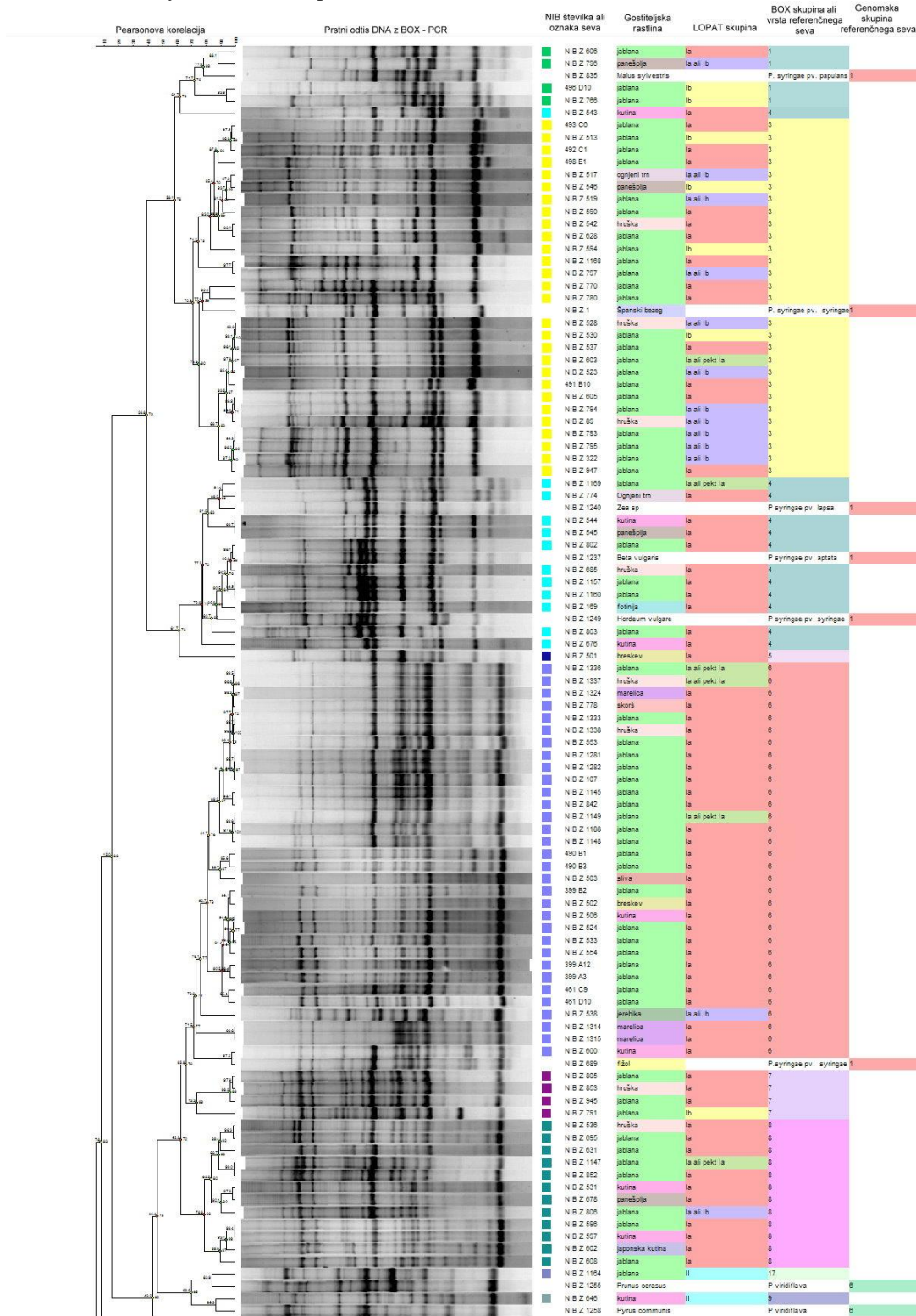
### Restrikcijska mešanica:

Sestavina	μL za 1 vzorec
voda	8
Pufer G (encim <i>MnII</i> ); pufer Y+/Tanga (encim <i>RsaI</i> )	2
encim	1 U
PCR produkt	10



PRILOGA 3: Dendrogram primerjave prstnih odtisov DNA HR pozitivnih bakterij rodu *Pseudomonas* in kontrolnih bakterij, dobljenih z BOX-PCR. Dendrogram je narejen s programskim paketom Bionumerics; za izdelavo matrike podobnosti je bila uporabljena Pearsonova korelacija

ANNEX 3. Dendrogram obtained by comparison of BOX-PCR fingerprinting patterns from HR positive bacteria from genus *Pseudomonas* and used reference strains. Dendrogram was produced with Bionumerics software; similarity matrix based upon Pearson correlation

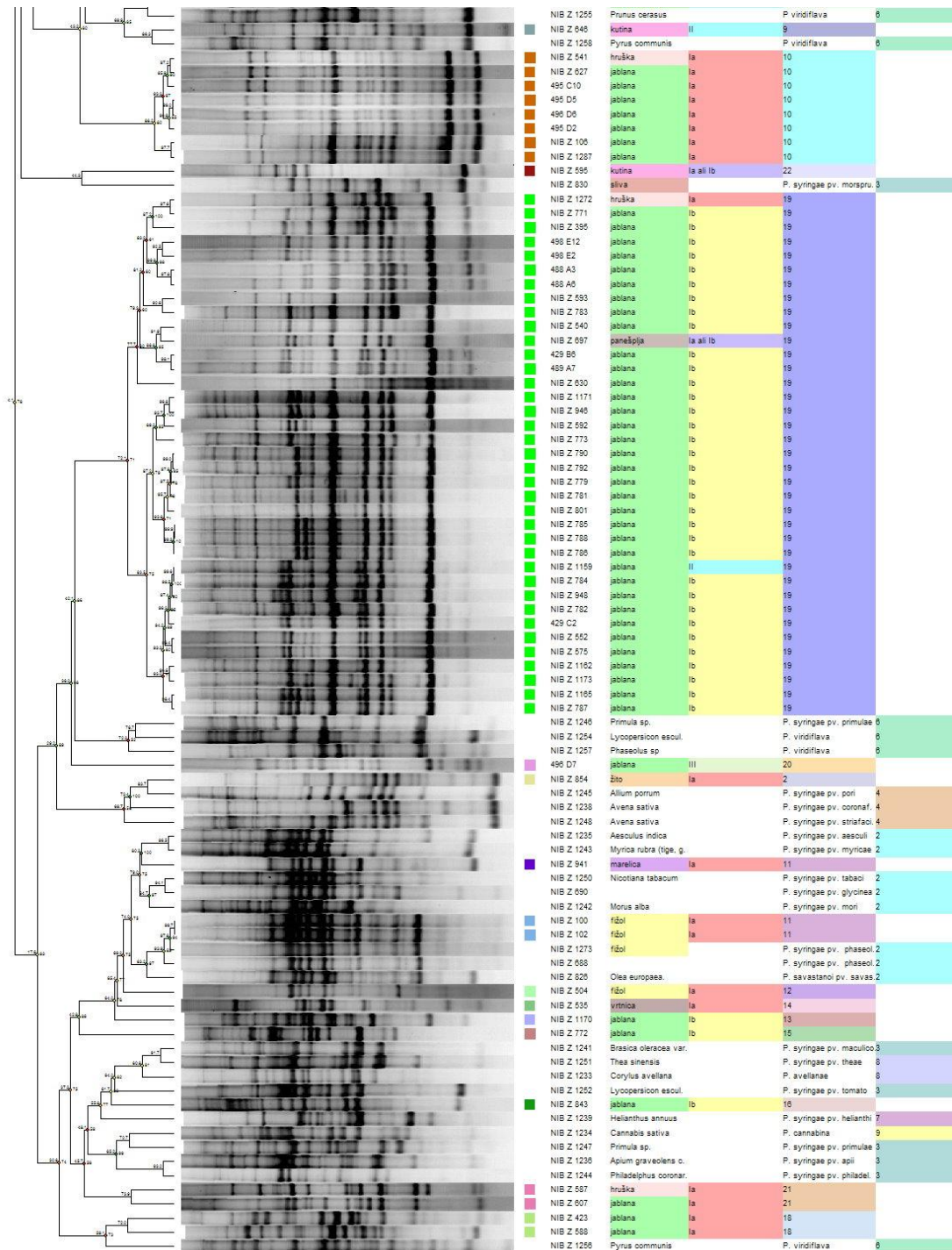


se nadaljuje

nadaljevanje

PRILOGA 3: Dendrogram primerjave prstnih odtisov DNA HR pozitivnih bakterij rodu *Pseudomonas* in kontrolnih bakterij, dobljenih z BOX-PCR. Dendrogram je narejen s programskim paketom Bionumerics; za izdelavo matrike podobnosti je bila uporabljena Pearsonova korelacija

ANNEX 3. Dendrogram obtained by comparison of BOX-PCR fingerprinting patterns from HR positive bacteria from genus *Pseudomonas* and used reference strains. Dendrogram was produced with Bionumerics software; similarity matrix based upon Pearson correlation



## Priloge na CD mediju:

PRILOGA 4: Program KingFisher mL sistema za izolacijo nukleinskih kislin

ANNEX 4: Program of KingFisher mL system for DNA extraction

PRILOGA 5: Rezultati PCR v realnem času pri pomnoževanju suspenzije *E. amylovora* v vodi v treh ločenih reakcijah

ANNEX 5: Results of amplification using real time PCR of *E. amylovora* in water suspension in three different reactions

PRILOGA 6: Rezultati reakcij PCR v realnem času pri pomnoževanju ekstraktov z dodano suspenzije *E. amylovora* v koncentraciji od  $1,8 \times 10^5$  –  $1,8 \times 10^2$  celic/mL pri različnih načinih izolacije DNA

ANNEX 6: Results of amplification using real time PCR of spiked extracts with concentrations  $1,8 \times 10^5$  –  $1,8 \times 10^2$  *E. amylovora* cells/mL isolated with different DNA extraction methods

PRILOGA 7: Rezultati reakcij PCR v realnem času pri pomnoževanju ekstraktov iz različnih gostiteljskih rastlin, z dodano suspenzijo *E. amylovora* v koncentraciji  $1,8 \times 10^4$  –  $1,8 \times 10^2$  celic/mL. Vključeni so tudi rezultati pomnoževanja ekstraktov brez dodane bakterije *E. amylovora*.

ANNEX 7: Results of amplification using real time PCR of spiked extracts from different hosts with concentrations  $1,8 \times 10^5$  –  $1,8 \times 10^2$  *E. amylovora* cells/mL. The results of amplification of non-spiked extracts are included.

PRILOGA 8: Povprečne vrednosti Ct vzorcev pred obogatitvijo v King B in CCT gojišču pri amplikonu Ams, ITS in plazmidnem amplikonu

ANNEX 8: The average Ct values of samples before enrichment in CCT and King's B media obtained with Ams, ITS and plasmid amplicons

PRILOGA 9: Koncentracija bakterije *E. amylovora* po obogatitvi v CCT in King B gojišču, kvantificirana na podlagi rezultatov PCR v realnem času. Prikazana je tudi uspešnost izolacije bakterije *E. amylovora* iz obogatitev na ploščah CCT

ANNEX 9: Concentration of *E. amylovora* after enrichment in CCT and King's B media quantitated using real time PCR. Also successfulness of isolation *E. amylovora* from enrichments in CCT is shown.

PRILOGA 10: Rezultati analiz izoliranih in kontrolnih bakterij uporabljeni v študiji diverzitete bakterij rodu *Pseudomonas*

ANNEX 10: Results of analysis isolated and reference strains used in research of bacteria from genus *Pseudomonas* diversity

PRILOGA 11: *In-silico* analiza restrikcije pomnožene 16S rDNA z encimoma *RsaI* in *MnII* pri različnih bakterijah rodu *Pseudomonas*

ANNEX 11: *In-silico* analysis of restriction with *RsaI* in *MnII* enzymes in different bacteria from genus *Pseudomonas*