

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Klára Nekolová**

Fytopatogenní bakterie: bakteriofágová terapie bakteriálních onemocnění rostlin

Phytopathogenic bacteria: bacteriophage therapy of bacterial plant diseases

**Bakalářská práce**

Školitel: RNDr. Petra Lišková, Ph.D.

Praha, 2025

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17.4.2025

Podpis

**Poděkování:**

Jako první bych chtěla poděkovat RNDr. Petře Liškové, Ph.D. za ochotu a trpělivost, kterou se mnou po celou dobu psaní práce měla. Vážím si veškerých jejích odborných rad, zkušeností a podpory, jež mi poskytla. Dále bych chtěla poděkovat svému partnerovi a rodině, že mi byli během celého studia a psaní bakalářské práce velkou oporou a vydrželi to se mnou.

## **Abstrakt**

Fytopatogenní bakterie jsou mikroorganismy napadající a způsobující onemocnění u rostlin. Každoročně významně snižují produkci zemědělských plodin po celém světě. Jednou z nových možností boje proti bakteriálním chorobám rostlin se jeví bakteriofágová terapie. Bakteriofágy, jako viry infikující bakterie, mohou účinně potlačovat růst a projevy těchto bakterií. Mnoho studií svými experimenty in vitro i in vivo potvrzují úspěšnost při kontrole rostlinných chorob. Nicméně přes všechny úspěchy má tato terapie i mnoho úskalí, které je nutné vyřešit, např. způsob aplikace či ochrana před UV zářením. Do budoucna je nutné najít řešení pro tyto problémy, a ještě lépe pochopit samotné bakteriofágy a jejich interakce s fytopatogenními bakteriemi. A nakonec to nejdůležitější potvrdit bezpečnost této terapie pro okolní svět.

**Klíčová slova:** fytopatogenní bakterie, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, bakteriofág, bakteriofágová terapie

## **Abstract**

Phytopathogenic bacteria are microorganisms that attack and cause diseases in plants. Every year, they significantly reduce the production of agricultural crops around the world. Bacteriophage therapy appears to be one of the new options for combating bacterial plant diseases. Bacteriophages, as viruses that infect bacteria, can effectively suppress the growth and symptoms of these bacteria. Many studies confirm their success in controlling plant diseases with their *in vitro* and *in vivo* experiments. However, despite all the achievements, this therapy also has many pitfalls that need to be resolved, such as the method of application or protection from UV radiation. In the future, it is necessary to find solutions to these problems and to better understand the phages themselves and their interactions with phytopathogenic bacteria. And finally, most importantly, to confirm the safety of this therapy for the surrounding world.

**Key words:** phytopathogenic bacteria, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, bacteriophage, bacteriophage therapy

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Fytopatogenní bakterie</b> .....	<b>2</b>
2.1 Základní charakteristika.....	2
2.2 Vybraní zástupci a onemocnění.....	2
2.2.1 Pseudomonas syringae (PS).....	2
2.2.2 Ralstonia solanacearum (RS).....	3
2.2.3 Erwinia amylovora (EA).....	4
2.3 Cyklus bakteriální choroby.....	5
2.4 Mechanismy patogenity.....	9
2.4.1 Sekreční systém typu III (T3SS).....	9
2.4.2 Exopolysacharidy amylovoran a levan.....	10
2.4.3 Fytotoxiny P. syringae.....	11
2.4.4 Ledová nukleární aktivita.....	11
2.5 Metody ochrany rostlin.....	12
<b>3 Bakteriofágy</b> .....	<b>13</b>
3.1 Životní cyklus bakteriofága.....	14
3.2 Objev bakteriofágů a bakteriofágové (fágové) terapie.....	15
<b>4 Bakteriofágová terapie (BT)</b> .....	<b>16</b>
4.1 Fágový lyzátní ve fágové terapii.....	17
4.2 Endolyziny a jejich využití.....	18
4.3 Perzistence fágů v přírodě a jejich ochrana.....	19
4.3.1 Ochrana před UV zářením.....	19
4.3.2 Fágový nosič a jeho využití.....	19
4.3.3 Půdní aplikace.....	20
4.4 Kombinace fágů s jinými kontrolními činidly.....	20
4.5 Komerčně prodávané prostředky s fágy a právní ošetření.....	21
<b>5 Bakteriofágová terapie u vybraných onemocnění</b> .....	<b>21</b>
5.1 BT proti bakteriálnímu vadnutí.....	21
5.2 BT u onemocnění způsobených pathovary P. syringae.....	24
5.3 BT proti bakteriální spále.....	24
<b>6 Závěr</b> .....	<b>27</b>
<b>7 Seznam citované literatury</b> .....	<b>28</b>

## Seznam použitých zkratk

ZKRATKA	ČESKÝ NÁZEV	ANGLICKÝ NÁZEV
ASM	acibenzolar-S-methyl	acibenzolar-S-methyl
BT	bakteriofágová terapie	bacteriophage therapy
CFU	jednotky tvořící kolonie	colony-forming unit
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina	double-stranded DNA
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina	double-stranded RNA
EA	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina	ethylenediaminetetraacetic acid
EPS	exopolysacharid	exopolysaccharide
gDNA	genomová DNA	genomic DNA
HR	hypersenzitivní reakce	hypersensitive response
HR	hypersenzitivní reakce	hypersensitive response
<i>hrc/Hrc</i>	gen/protein hypersenzitivní reakce a konzervované složky	hypersensitive response and conserved gene/protein
<i>hrp/Hrp</i>	gen/protein hypersenzitivní reakce a patogenity	hypersensitive response and pathogenicity gene/protein
<i>hrpB</i>	pozitivní regulátor genů pro T3SS	positive regulator of gene for T3SS
IM	vnitřní membrána	inner membrane
LPS	lipopolysacharid	lipopolysaccharide
MOI	multiplicita infekce	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA	messenger RNA
OM	vnější membrána	outer membrane
operon <i>ams</i>	operon zodpovědný za syntézu amylovoranu	operon responsible for amylovoran synthesis

<i>phcA</i>	regulátor genů souvisejících s virulencí	virulence gene regulator
<i>Pin2</i>	gen kódující inhibitor proteáz	proteinase inhibitor II
<i>PR1b</i>	gen pro obranný protein proti patogenům	pathogenesis-related gene 1b
PS	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
Psg	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PST	polysacharidové transportéry	polysaccharide transporters
pv.	pathovar	pathovar
<i>rfbX</i>	gen polysacharidových transportérů	gene of polysaccharide transporters
RNA	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
ROS	reaktivní formy kyslíku	reactive oxygen species
RS	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
SAR	systémová získaná rezistence	systemic acquired resistance
ssDNA	jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina	single-stranded DNA
ssRNA	jednořetězcová ribonukleová kyselina	single-stranded RNA
<i>sylA-E</i>	klastr genů zodpovědný za syntézu syringomycinu	gene cluster responsible for syringomycin synthesis
T3SS	sekreční systém typu III	type III secretion system
UV záření	ultrafialové záření	ultraviolet radiation

# 1 Úvod

Fytopatogenní bakterie jsou jednobuněčné organismy napadající rostliny. Tyto bakterie tvoří početnou a rozmanitou skupinu, z čehož vyplývá opravdu rozsáhlé množství onemocnění, které způsobují. Choroby napadající zejména zemědělské plodiny mohou mít katastrofální dopady na ekonomiku po celém světě. Růst populace na Zemi zvyšuje nároky na produkci zemědělství. Nárůst produkce zvyšuje spotřebu antimikrobiálních látek jakožto ochrany proti fytopatogenům. Problém nastává uvědomíme-li si, že množství těchto látek je současně polutanty. A to může být do budoucna velkou hrozbou. Nešetrnost a toxicita těchto látek k okolnímu prostředí a organismům, akumulace kontrolních činidel v půdě a vodě vede společnost, ve spojení s možností vzniku rezistence fytopatogenů vůči antibiotikům, k vytvoření ekologicky šetrných variant kontrolních činidel.

Jednou z těchto variant mohou být bakteriofágy. Fágy jsou viry infikující pouze bakterie. Jakožto přírodní entity mají spoustu vlastností splňující nároky na hledanou šetrnost. Bakteriofágová terapie byla objevena již na počátku 20. století, nicméně příchod antibiotik ji zcela převálcoval. V současnosti je fágová terapie předmětem mnoha studií a testů v léčbě lidí, zvířat i rostlin.

Cílem této bakalářské práce je přiblížit svět fytopatogenních bakterií a ukázat, jak velkou hrozbu jsou. Představit a na příkladech demonstrovat příchod nové slibně vyhlížející metody kontroly těchto bakterií. Jelikož fytopatogenních bakterií je opravdu hodně a informací o nich taky, vybrala jsem z mého pohledu tři významné bakterie, na které se zaměřuji jak při popisu samotných fytopatogenních bakterií, tak v problematice spojené s bakteriofágovou terapií. Jsou to tyto bakterie: *Pseudomonas syringae* a její pathovary, *Ralstonia solanacearum* a *Erwinia amylovora*.

V první části se věnuji čistě fytopatogenním bakteriím, ve zbytku práce představuji bakteriofágy a jejich potenciál a problémy ve fágové terapii u rostlin. Na závěr práce přibližují studie a využití fágů pro kontrolu již zmíněných třech bakterií.

## 2 Fytopatogenní bakterie

### 2.1 Základní charakteristika

Fytopatogenní bakterie jsou jednobuněčné prokaryotické organismy, které infikují rostliny a způsobují množství různých onemocnění. Hniloba, vadnutí, nekróza, či hyperplazie jsou jen jedny z mnoha symptomů, co můžeme na rostlinách pozorovat. Fytopatogenní bakterie dokážou zdevastovat celá pole úrody, proto jsou velkou hrozbou pro zemědělskou produkci po celém světě.

Některé bakterie se specializují pouze na jeden typ plodiny (monofágní) např. *Clavibacter michiganensis*, způsobující měkkou hnilobu u brambor. Avšak množství bakterií dokáže infikovat vícero druhů rostlin (polyfágní), příkladem je *Ralstonia solanacearum*, která způsobuje vadnutí u mnoha jedno i dvouděložných plodin. V neposlední řadě existuje i několik druhů bakterií, u nichž lze pozorovat schopnost napadat jak rostlinné, tak živočišné buňky např. buňky hmyzu, jako bakterie *Dickeya dadantii* (\*van der Wolf and De Boer, 2015).

### 2.2 Vybraní zástupci a onemocnění

Existuje nesmírné množství fytopatogenní bakterií, mající významnou roli v zemědělství i ekonomice po celém světě. Mezi ty nejvýznamnější se řadí *Pseudomonas syringae* (její pathovary způsobují množství onemocnění, např: bakteriální skvrnitost na rajčeti či bakteriální rakovinu u kiwi), *Ralstonia solanacearum* (bakteriální vadnutí), *Erwinia amylovora* (bakteriální spála růžovitých), *Agrobacterium Tumefaciens* (tvorba nádorů), *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (bakteriální plíseň) a mnohé další. Já se ve své práci zaměřím především na charakteristiku a problematiku prvních tří zmíněných.

#### 2.2.1 *Pseudomonas syringae* (PS)

*Pseudomonas syringae* je hemibiotrofní, polyfágní gramnegativní bakterie s aerobním metabolismem. Má tyčinkovitý tvar s minimálně jedním polárním bičíkem. Lze u ní pozorovat dvě propojené životní fáze související s osídlením rostliny: epifytickou, kdy se nachází na povrchu především nadzemních částí rostlin (souhrnně nazývané jako fylosféra), a endofytickou, kdy bakterie proniká do rostlinných tkání (Feltn *et al.*, 2024). Při příznivých okolních podmínkách (déšť, vítr, vysoká vlhkost) dokáže přežívat na povrchu rostlin i v půdě. Do rostlin vstupuje jejich přirozenými otvory (průduchy, hydatody...), nebo poraněními.

*P. syringae* je extracelulární patogen, který po penetraci do rostliny žije v mezibuněčném prostoru zvaném apoplast (Kornienko *et al.*, 2022).

Typickou vlastností PS je nukleační aktivita ledu, což vede k poškození rostlinných tkání mrazem. Tento proces může způsobit uvolňování živin a vody z rostliny, nebo tvorbu poranění sloužících jako vstupy pro bakterii. Za nukleační aktivitu ledu je zodpovědný specifický protein ukotvený na vnější membráně bakterií. Ten umožňuje předčasnou nukleaci podchlazené vody (Lee *et al.*, 2023).

Poprvé byla tato patogenní bakterie popsána v roce 1902. Od té doby bylo popsáno více než 60 pathovarů<sup>1</sup>, napadající různé rostlinné druhy, např. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Gomila *et al.*, 2017).

Pro ukázkou zde zmíním onemocnění bakteriální skvrnitost na rajčeti, způsobenou *P. syringae* pv. *tomato*. Je to velmi běžná nemoc, jež ovlivňuje světovou produkci rajčat. Symptomy můžeme na rostlině pozorovat především na listech a plodech. Na listech (mladých i starších) se typicky tvoří tmavě hnědé až černé skvrny, které jsou obklopeny žlutým okrajem. Spojením těchto skvrn může vést až ke vzniku nekrózy a významnému poškození. U plodů pozorujeme drobné tečky, barva okrajů se liší zralostí, u nezralého plodu budou okraje zelené, na zralém barva přejde do žluté (El-Fatah *et al.*, 2023).

### 2.2.2 *Ralstonia solanacearum* (RS)

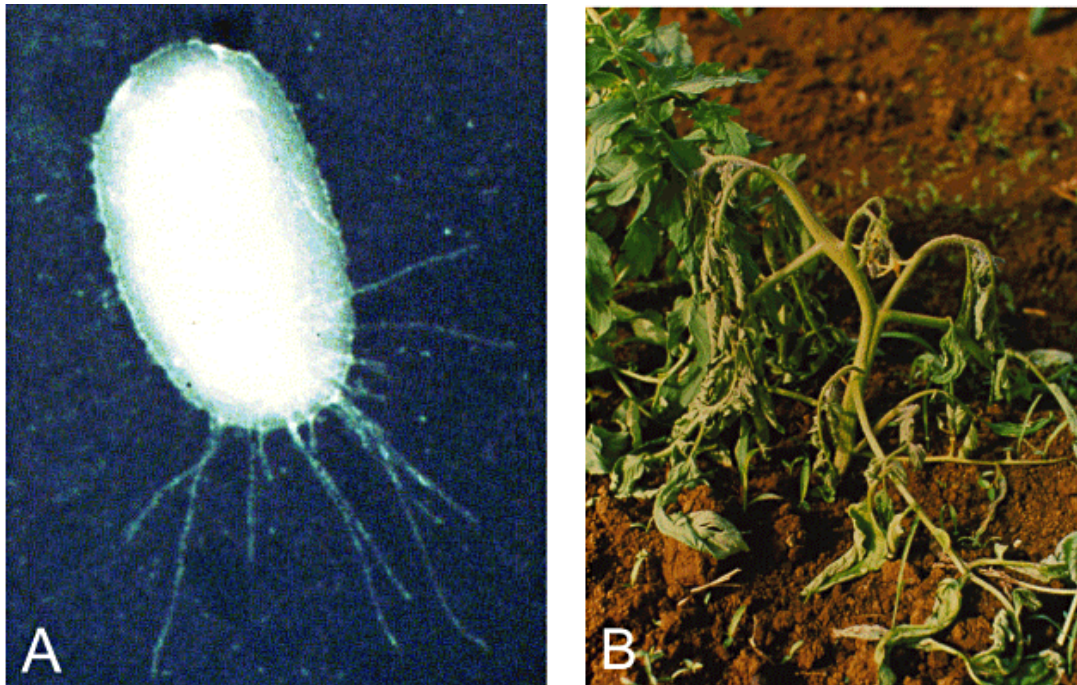
*Ralstonia solanacearum* je půdní, polyfágní, gramnegativní bakterie s aerobním metabolismem, způsobující bakteriální vadnutí (Obr.1). Díky svazku polárních bičíků je pohyblivá. Poprvé byla popsána Erwinem Smithem v roce 1908 na tabáku. Byla zařazena mezi nejvýznamnější bakteriální rostlinné patogeny. Celosvětově způsobuje 15 až 55 % (v extrémech až 100 %) ztráty úrody. Dokáže napadnout přes 200 druhů rostlin, nebezpečná je především pro čeleď Solanaceae (rajče, brambor, či tabák) (Cai *et al.*, 2021). Byla rozdělena do 5 ras (podle rozsahu hostitele) a 6 biovarů (podle biochemických vlastností), nově používaným systémem je rozlišení podle přibližného výskytu v geografických oblastech na

---

<sup>1</sup> Pathovar (zkráceně pv.) je označení využívající se k odlišení bakterií v rámci jednoho druhu. Přičemž jednotlivé pathovary daného druhu se liší schopností infikovat různé druhy rostlin. Z taxonomického hlediska by se dalo říct, že pathovar se nachází mezi druhem a specifických kmenem bakterie.

4 fylotypy. Jakožto půdní bakterie se snadno šíří půdou, zvládá to ovšem i povrchovou a závlahovou vodou či zemědělským náčiním (Fujiwara *et al.*, 2011).

Daří se jí v horkém a vlhkém klimatu, odpovídající tropické a subtropické oblasti (Ingel *et al.*, 2022). Byl však identifikován kmen R3bv2, způsobující hnilobu brambor, který je schopen infekce i v chladných teplotách typických pro mírné klimatické pásmo (Clarke *et al.*, 2015).



**Obrázek 1** A – *Ralstonia solanacearum* (photograph J. Vasse);  
B – Symptomy bakteriálního vadnutí na rajčeti (převzato a upraveno: Mansfield *et al.*, 2012)

### 2.2.3 *Erwinia amylovora* (EA)

*E. amylovora* je tyčinkovitá, polyfágní, gramnegativní bakterie zodpovědná za onemocnění bakteriální spála růžovitých. Je to vůbec první fytopatogenní bakterie, která byla popsána v 2. pol. 19. století (Vanneste, 2000). Řadí se mezi psychrotrofní bakterie, kvůli své schopnosti růst při teplotách od 4 °C do 37 °C, s optimem 28 °C. Bylo však zjištěno, že pro rozvoj epidemie v polních podmínkách je nutná teplota nad 18 °C. Společně s touto teplotou jí vyhovuje teplé vlhké prostředí, déšť či velká rosa. Hlavním vstupem do hostitele jsou pro EA květy, nicméně dokáže využít i průduchy, nebo poranění vzniklá krupobitím, větrem, či

hmyzem (Santander and Biosca, 2017). Přenašeči bývá často hmyz, ale i déšť a vítr. Zajímavostí je, že byly vyvinuty předpovědi onemocnění, podle blížících se vhodných povětrnostních podmínek pro růst bakterie. Díky tomu mohou zemědělci provádět preventivní postřik chemikáliemi ještě před propuknutím nemoci (Borruso *et al.*, 2017).

Bakteriální spála růžovitých je onemocnění vyskytující se u hospodářsky významných ovocných stromů jako jsou jabloně a hrušně. Detekovat ji však můžeme i na okrasných rostlinách z čeledi Rosaceae. Je to velmi závažné onemocnění, schopné po propuknutí zdevastovat celoroční sklizeň a způsobit významné ekonomické ztráty. Onemocnění postihuje značnou část rostliny (mladé výhonky, listy, květy, plody a podnož rostliny) (Biosca *et al.*, 2024). Mezi symptomy spály se řadí nekróza květů, mladých výhonků (Obr.2), hniloba nezralých plodů, rakovina dřevitých pletiv a výskyt bakteriálního slizu (Borruso *et al.*, 2017). Typickým znakem jsou tzv. pastýřské hole (Obr.2), na koncích ohnuté uschlé výhonky (Zhao, Blumer and Sundin, 2005).

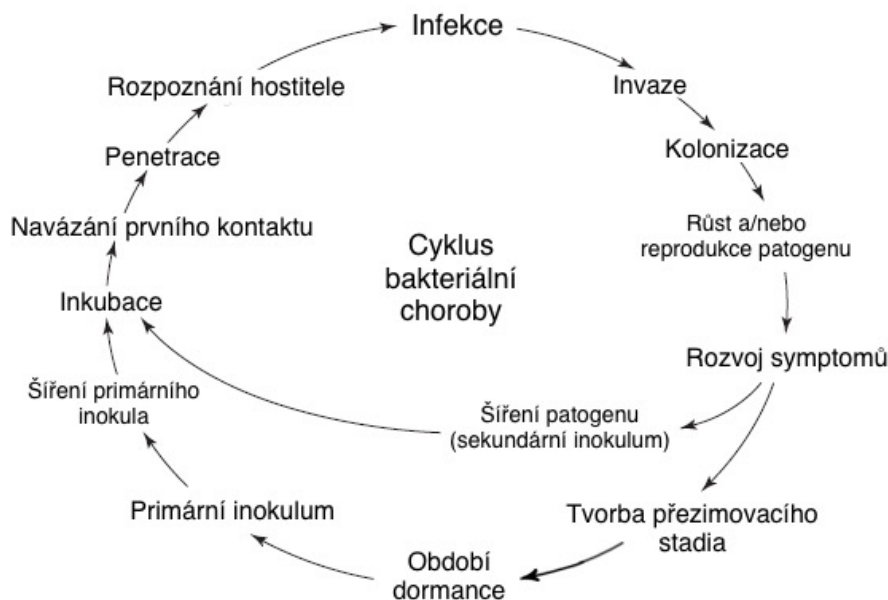


**Obrázek 2** Typické symptomy bakteriální spály růžovitých.

**A** – Nekróza mladého výhonku, připomínající spálení ohněm; **B** – Typický příznak spály tzv. pastýřský hůl (převzato a upraveno: Fontana *et al.*, 2022).

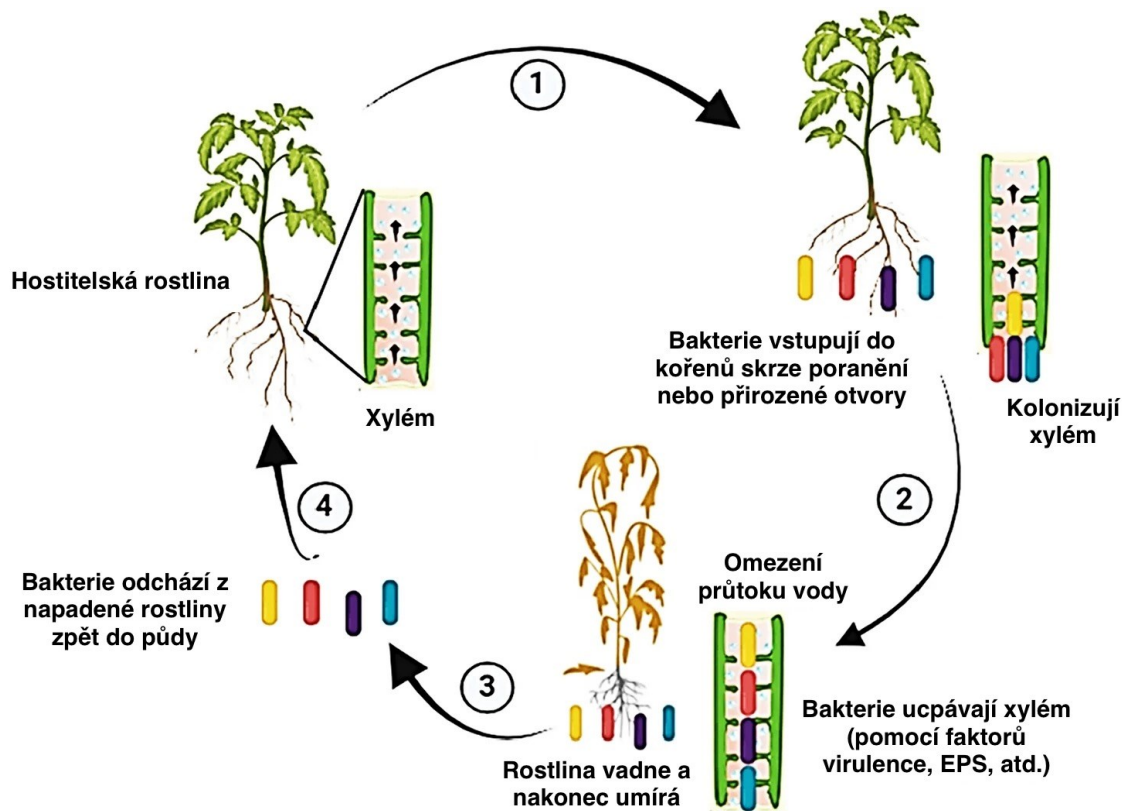
## 2.3 Cyklus bakteriální choroby

Tento cyklus popisuje životní stádia bakteriálních patogenů v rostlinách. Zahrnuje přežívání patogena, šíření a přenos, rozpoznání a první kontakt s hostitelem, penetrace, kolonizace a množení, a nakonec vznik a šíření infekce (Obr.3).



**Obrázek 3:** Cyklus bakteriální choroby (převzato a upraveno: Plantlet, 2019)

*R. solanacearum*, jakožto půdní bakterie, napadá rostliny skrze jejich kořenový systém. Přírozenými ranami na kořenech, vzniklých vlivem růstu postranních kořenů či prorůstání kořenů půdou, nebo nepřírozenými ranami, způsobenými např. lidskou činností, pronikají bakterie do hostitele. Kolonizuje xylém, kde se množí a šíří dál po rostlině. Vzrůstajícím počtem bakterií a jejich produkcí exopolysacharidu (EPS) dochází k zablokování xylémových cév, což snižuje příjem a transport vody z půdy (Caldwell, Kim and Iyer-Pascuzzi, 2017). Následující vadnutí, žloutnutí rostliny či zpomalení růstu je nevyhnutelným projevem bakteriálního vadnutí vedoucího často až k smrti rostliny. Po propuknutí nemoci *R. solanacearum* odchází zpět do půdy, kde přežívá, dokud nenajde dalšího vhodného hostitele (Ye *et al.*, 2022), (Obr.4).



**Obrázek 4** Cyklus bakteriální choroby bakterií *R. solanacearum* (převzato a upraveno: Yadav *et al.*, 2024)

K porovnání s ralstonií uvedu cyklus infekce bakterie *Pseudomonas syringae*. Jelikož PS obsahuje velké množství pathovarů pojí se s širokým spektrem infikovaných rostlin, a tím i s množstvím specifických onemocnění, např. rakovina či skvrnitost. Každý pathovar tak může mít své specifické mechanismy odvozené od různých virulentních faktorů. Můžeme však její koloběh života obecně shrnout.

Infekční cyklus, jak již bylo zmíněno, se dělí do epifytické a endofytické fáze. Kde se ovšem nachází bakterie mimo tento cyklus? *P. syringae* dokáže přežít a šířit se infikovanými semeny, půdou, vodou, deštěm a sněhem, nebo v zbytcích rostlin a plodin (Feltin *et al.*, 2024). Po usídlení na povrchu zdravé rostliny započne proces infekce hostitele. Ve fylosféře musí bakterie odolávat velkému množství nepříznivých podmínek (hladovění, abiotický stres...). Důležitou roli v adhezii k povrchu rostliny hrají složky buněčné stěny hlavně LPS, a také EPS.

Velikost bakteriální populace ve fylosféře hraje významnou roli v samotném vzniku onemocnění (Krishna *et al.*, 2022).

Vstup do hostitele často koreluje se silnými dešťovými a povětrnostními podmínkami, jimiž vznikají na rostlině poranění, které bakterie využije jako vstupní bránu. Penetrace přirozenými otvory, jako jsou průduchy, je typická pro *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000. Studie ukázaly, že *Pst* DC3000 využívají principu chemotaxe pro pohyb směrem k otevřeným průduchům (Santamaría-Hernando *et al.*, 2022). Jedním ze zajímavých způsobů průniku je také poranění způsobené mouchou rodu *Scaptomyza*. Samice této mouchy dokážou klást vajíčka do listů rostlin pomocí zubatého vejcovodu. Vzniklými vpichy vstupuje bakterie do rostliny. Byl také prokázán jistý pozitivní vztah mezi těmito organismy (Groen *et al.*, 2016).

Po vstupu do rostliny dochází ke kolonizaci rostlinného apoplastu, kde se bakterie dále množí a infikuje okolní tkáň, což vede ke vzniku onemocnění (Krishna *et al.*, 2022).

Jako poslední příklad uvedu bakteriální cyklus choroby u *Erwinia amylovora*. Tato bakterie se za okolních podmínek, zejména v létě, kdy jsou přítomné mladé rostoucí výhonky dokáže šířit velmi rychle po i mezi rostlinami. Po penetraci hostitelské rostliny se během několika dní rozšíří do celého květu a mladých výhonků. Za několik měsíců dokáže onemocnění infikovat celou rostlinu a stát se systémovým (Borruso *et al.*, 2017).

EA přezimuje v živých tkáních na okrajích rakovin z předešlého roku. K šíření dochází na jaře po dosažení ideálních okolních podmínek, kdy se na povrch infikovaných tkání začne vylučovat bakteriální sliz (Obr.5). Sliz obsahující bakterie s EPS je významným faktorem epidemie spály. Během infekce poslouží, jako primární a sekundární inokulum pro přenos spály. EA ve slizu je přenášena zejména pomocí hmyzu, větru či deště na povrch zdravých květních blizen, které kolonizuje. Při dostatečné vlhkosti může migrovat do květových nektárií, kde infikuje hostitele přirozenými otvory a způsobí spálu květů. Po infekci začínají bakteriální buňky putovat cévním systémem po celém stromě. Postupně napadají rostoucí výhonky a stonky, až se dostávají do hlavního kmene a podnože, což často vede k smrti stromu. Během infekce se mohou na povrchu výhonů, řapíků, listů či plodů objevovat další kapičky slizu sloužící v sekundárních cyklech infekce (Slack *et al.*, 2017).



**Obrázek 5** **A** – Bakteriální sliz na přezimující rakovině; **B** – Sliz na nezralém plodu jablka; **C** – moucha jako přenašeč na výhonku s kapkami slizu (zvýrazněné šipkami) (převzato a upraveno: Zeng, Puławska and Schachterle, 2021)

## 2.4 Mechanismy patogenity

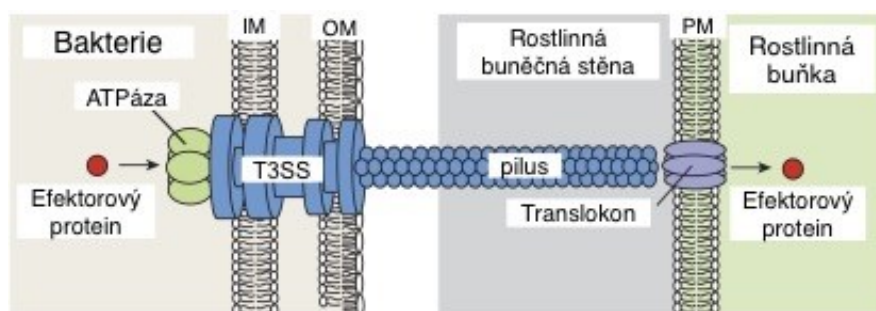
Fytopatogenní bakterie musí pro úspěšnou kolonizaci a vznik onemocnění v hostitelské rostlině být schopny překonat obranné mechanismy rostlin, zajistit si dostatek vody a živin pro růst a množení. Proto u nich nalezneme širokou sbírku mechanismů, které toto zajišťují. Od enzymů degradujících buněčnou stěnu rostlin, fytohormony, toxiny, exopolysacharidy (EPS), siderofory, Quorum sensing související s tvorbou biofilmu, až po sekreční systémy transportující efektorové molekuly do hostitelských buněk a mnohé další. V této kapitole uvedu jen několik významných mechanismů hrajících roli v patogenitě mnou popisovaných bakterií.

### 2.4.1 Sekreční systém typu III (T3SS)

T3SS je společným mechanismem všech tří uvedených bakterií *P. syringae*, *R. solanacearum* a *E. amylovora*. Je to evolučně konzervovaný systém využívaný gramnegativními fytopatogenními bakteriemi pro transport efektorových molekul přímo do cytosolu hostitelských buněk. Tyto efekторы ovlivňují cílové buňky mnoha způsoby: potlačují obranné a jiné signální dráhy, modifikují strukturu cytoskeletu, nebo manipulují s intracelulárním transportem (Dudnik and Dudler, 2014).

Celý komplex T3SS zabudovaný do vnitřní a vnější membrány bakterií se skládá z velkého, válcově tvarovaného makromolekulárního komplexu organizovaného do řady prstencových struktur s vnitřními prstenci, vnějšími prstenci a krčkovou strukturou. Do extracelulárního prostoru vyčnívá struktura podobná jehle – pilus, kterým dochází k samotnému exportu efektorů (Obr.6) (\*Vrancken *et al.*, 2013). T3SS rostlinných patogenních

bakterií je tvořen hlavně proteiny Hrc, kódovanými konzervovanými geny *hrc* a proteiny Hrp, kódovanými geny hypersenzitivní reakce a patogenity (*hrp*) (He *et al.*, 2023).



**Obrázek 6** Schématické znázornění struktury T3SS bakteriálních rostlinných patogenů (převzato a upraveno: \*Büttner and He, 2009)

U *Erwinia amylovora* se T3SS využívá v raných fázích invaze k potlačení obrany hostitele a zahájení patogeneze. Potvrzují to studie dokazující, že geny pro T3SS mají zvýšenou expresi během infekce na květních bliznách a bázi, a že jejich exprese se snižuje s pozdějšími fázemi choroby (Schachterle *et al.*, 2022).

#### 2.4.2 Exopolysacharidy amylovoran a levan

V této podkapitole bych chtěla zmínit něco k EPS u *E. amylovora*, kde můžeme pozorovat i další mechanismy patogenity a virulence, jako produkce sideroforu, LPS, motilita, tvorba biofilmu a v neposlední řadě již zmíněný T3SS systém.

Produkce EPS amylovoranu a levanu napomáhá bakterii obcházet imunitní systém hostitele, narušovat cévní systém rostliny, podporuje tvorbu biofilmu a růst bakteriální populace. Nedostatek levanu může také vést k pomalému rozvoji nemoci v rostlině (\*Vrancken *et al.*, 2013).

Amylovoran je hlavní složkou bakteriálního slizu. Je to heteropolymer, jehož monomerní podjednotky se skládají z jedné glukuronové kyseliny a čtyř galaktózových zbytků s pyruvátovými a acetátovými skupinami. Geny pro amylovoran se nacházejí v jednom dvanácti genovém *ams* operonu transkribovaném jako jedna mRNA. Kmeny *E. amylovora* postrádající tvorbu amylovoranu jsou nepatogenní.

Transport EPS přes bakteriální membrány zajišťuje rodina polysacharidových transportérů (PST), konkrétně proteiny podrodiny PST (1) (Klee *et al.*, 2020). Právě ve studii Sara Klee a spol. ukázali, že mutace v genu PST *rfbX* vede ke ztrátě produkce amylovoranu,

a tudíž k avirulenci. Také poukazují na možnost, že EPS a LPS proteiny mohou u bakterie EA koexistovat prostorově společně. Což by mohlo vysvětlit ztrátu produkce amylovoranu vlivem mutací v genech pro syntézu LPS proteinů.

### 2.4.3 Fytotoxiny *P. syringae*

U *P. syringae* nalezneme množství mechanismů napomáhající invazi hostitele. Kromě produkce fytotoxinů, využívá T3SS, tvorby biofilmů či produkce fytohormonů a sideroforů. PS produkuje několik typů fytotoxinů, např. koronatin, syringomycin, syringopeptin, tabtoxin či syringolin A.

Tyto toxiny dokážou ovlivnit závažnost onemocnění například tím, že vyvolají buněčnou smrt prospěšných bakterií na hostiteli a umožní jednodušší kolonizaci rostliny. Syringomycin a syringopeptin umožňuje tvorbu pórů v plazmatické membráně a vzniku cytolyzy. Tabtoxin inhibuje glutamin syntetázu (Saint-Vincent *et al.*, 2020).

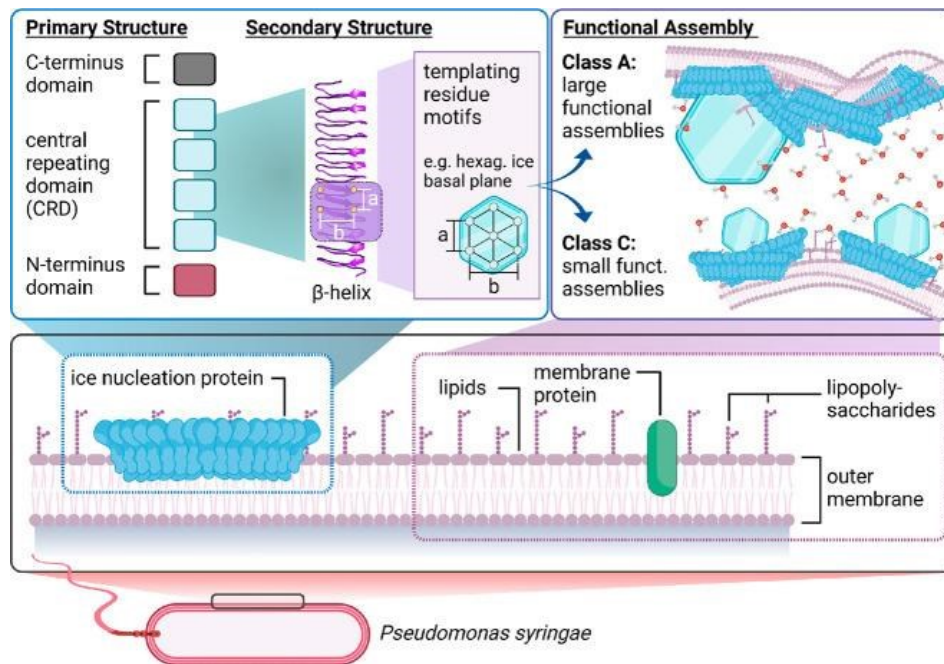
Makrolaktam syringolin A je inhibitorem eukaryotického proteazomu, jež je často nepostradatelnou částí rostlinných signálních drah. Studie dokazují, že dokáže potlačit obrannou signalizaci kyseliny salicylové a represí stomatální imunitu u fazolí a *Arabidopsis*. Syringolin A je produkt smíšené neribosomální peptidové syntetázy / polyketidové syntetázy kódované klastrem genů *sylA-E* určitých kmenů *P. syringae*. Narušení produkce tohoto fytotoxinu může vést ke snížení tvorby lézí u zmíněných fazolí (Dudnik and Dudler, 2014).

### 2.4.4 Ledová nukleační aktivita

Ledová nukleační aktivita byla poprvé popsána v 70. letech 20. století právě u bakterií *Pseudomonas*, od té doby byli objeveny i další bakterie s touto aktivitou, např. *Xanthomonas campestris*.

Za touto schopností stojí specifické led-nukleační proteiny nacházející se na vnější straně bakteriální buněčné stěny (Obr.7). Tvoří shluky podporující vznik uspořádání molekul vody, jenž ulehčí její fázový přechod mezi kapalným a pevným skupenstvím. *P. syringae* je tohoto procesu schopna už při teplotě  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ledová nukleační aktivita slouží k poškození rostlinných pletiv mrazem, což umožní uvolnění živin pro bakterie. Výtažky usmrcené PS se také využívají ve výrobku na umělé zasněžování Snomax (Lukas *et al.*, 2022).

Navíc je tato jejich schopnost spojována s ovlivňováním atmosférických procesů, jako je tvorba mraků a s nimi spojených srážek (dešťových, sněhových i krup), ve kterých byly nalezeny (de Araujo *et al.*, 2019).



**Obrázek 7** Struktury a mechanismus bakteriálních led-nukleačních proteinů ukotvených na vnější buněčné membráně *P. syringae*. Led-nukleační proteiny se skládají z N-konce, C-konce a centrální opakující se domény (převzato a upraveno: Lukas *et al.*, 2022).

## 2.5 Metody ochrany rostlin

Z mé prozatímní snahy přiblížit čtenáři fytopatogenní bakterie bych řekla, že je jasné, jak velký problém mohou tyto patogeny být. Široké spektrum chorob dokáže způsobit velké, často, řekla bych, pro někoho až nevyčísitelné škody jak v zemědělství, tak i v ekonomice po celém světě. Proto je opodstatněná stále trvající snaha vytvořit účinné, ale pro okolí šetrné metody ochrany rostlin.

Často prvotním úspěchem ochrany rostlin může být prevence. Dezinfekce nářadí a zemědělských strojů, prořezávání rostlin, obměna plodin na jednotlivých stanovištích, to vše může pomoci. Jednou z možností prevence proti patogenům je šlechtění rostlinných druhů již odolných vůči dané chorobě.

Jednou z typických ve světě využívaných možností je ochrana na chemické bázi, dnes běžně využívané baktericidy obsahující měď či antibiotika. Nad touto možností se vedou

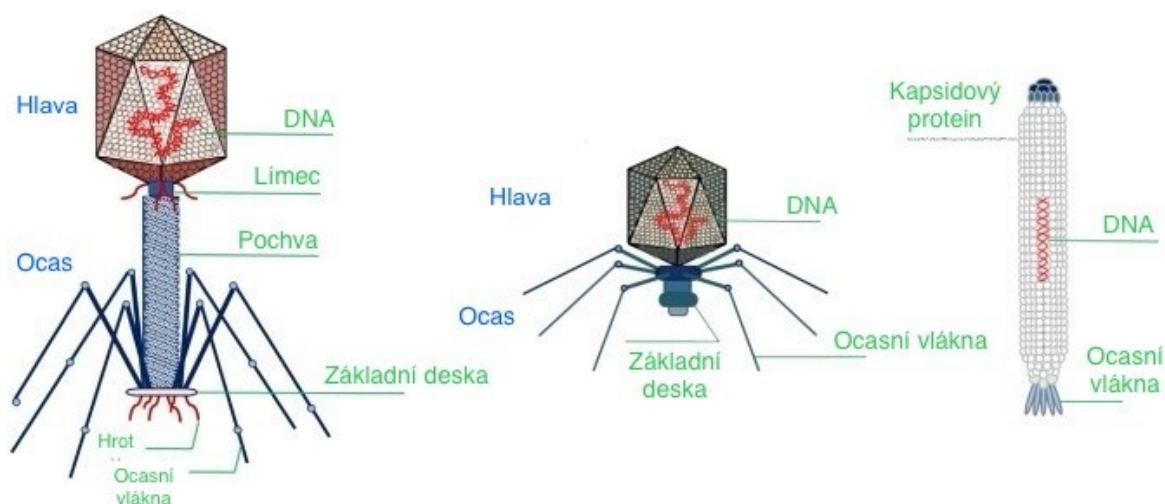
nestálé diskuze ve spojení se šetrností k životnímu prostředí. Sloučeniny obsahující měď mohou způsobovat fytotoxicitu, bioakumulaci v půdě a povrchové vodě, nebo mohou negativně ovlivňovat opylující hmyz a jiné organismy (\*Stefani *et al.*, 2021). Jak tyto sloučeniny, tak především používaná antibiotika, např. streptomycin, jsou také spojovány se vznikem rezistence v bakteriálních populacích. Se vzniklou rezistencí vůči antibiotikům se pojí obavy přenosu této rezistence u fytopatogenních bakterií na bakterie napadající zvířecí, a především lidský organismus (Taylor and Reeder, 2020).

Právě díky existujícím problémům v současné ochraně se naděje vkládají do biologické ochrany. Například využití antagonistických organismů, které aktivně konkurují, nebo přímo eliminují patogenní bakterie. Ve studii (Bashan and de-Bashan, 2002) ukázali možné využití bakterie *Azospirillum brasilense* jako biologické ochrany proti *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *A. brasilense* podporuje růst rostliny, za vlhkých podmínek je schopna na listech tvorby velkých populací. Ačkoliv nemá typické znaky pro využití v biologické ochraně, např. neprodukuje dostatečné množství antibakteriálních látek, a mechanismus kompetice a vytlačení není znám, v této studii dokázali, že při souběžném výskytu na jedné sazenici rajčete dochází téměř k eliminaci onemocnění a zlepšení růstu rostliny.

Dalším mechanismem využitelným v biologické ochraně jsou viry bakteriofágy, kterým se budu věnovat v dalších kapitolách.

### 3 Bakteriofágy

Bakteriofágy (fágy) jsou viry infikující bakterie a archea. Jsou nejzastoupenějším entitou na světě s odhadovaným počtem  $10^{31}$ . Najdeme je všude, kde jsou jejich hostitelé, ve vodě, půdě, vzduchu, ale i lidském či zvířecím těle (Aghaee *et al.*, 2021). Jejich objev na počátku 20. století je připisován dvěma mikrobiologům Frederiku Twortovi a Felixu d'Herelle. Jsou to velmi jednoduché organismy tvořené proteiny (60 %) a genetickou informací (40 %). Nejzastoupenější jsou ocasaté fágy s obecnou stavbou skládající se z ikosaedrické hlavy nesoucí genetickou informaci, ocasu obaleného v pochvě, základní desky s hroty a ocasními vlákny (Obr.8). Dále můžeme nalézt také vláknité fágy. Co se genetické informace týče, dokáže být fág poměrně variabilní, může mít genom v podobě dsDNA (nejčastější), ssDNA, dsRNA, nebo ssRNA (\*Ye *et al.*, 2019).

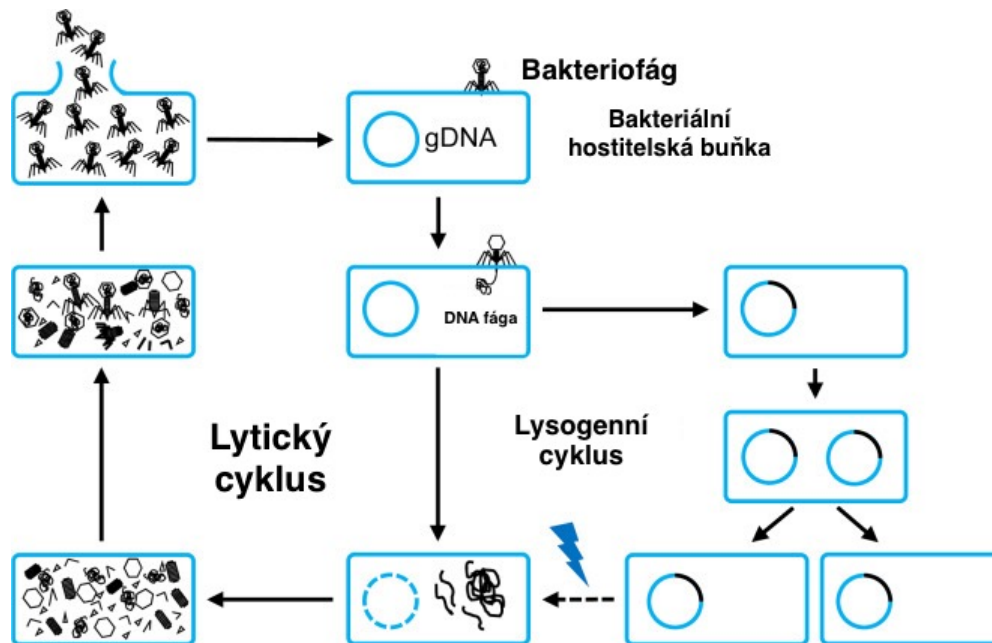


**Obrázek 8** Schematické znázornění stavby ocasatých a vláknitých bakteriofágů (převzato a upraveno: \*Ye *et al.*, 2019)

#### 3.1 Životní cyklus bakteriofága

U bakteriofágů můžeme rozlišit několik typů životních cyklů: lytický (virulentní), lyzogenní, pseudolyzogenní a chronický. Fágy s lytickým cyklem způsobují infekci (Obr.9), která vede k lýzi hostitelské bakterie. Lýze umožní uvolnění v bakterii nově vzniklých fágových částic do okolí. Lyzogenní cyklus (Obr.9) je proces, kdy se fágový genom inkorporuje do genomu bakterie a společně s ním se replikuje. Může také přetrvávat jako plasmid. V tomto stavu se nazývá profág. Existuje možnost přechodu bakteriofága s lyzogenního do lytického stavu, a to vlivem chemických nebo fyzikálních faktorů, např.

teplota nebo UV záření. Profágy mimo jiné mohou nést geny, které jsou užitečné pro hostitelskou bakterii, např. geny pro toxiny. Mohou také sloužit jako přenašeče genů (virulence) v horizontálním genetickém přenosu u bakterií (\*Buttimer *et al.*, 2017). Chronický cyklus je neletální stav, kdy bakteriofág způsobuje hostiteli dlouhodobou infekci. Dochází k neustálé tvorbě a uvolňování fágových částic, aniž by došlo ke smrti hostitelské buňky (\*Naureen *et al.*, 2020).



**Obrázek 9** Jednoduché schéma znázorňující průběh lytického a lysogenního cyklu fága; pozn. ikona blesku představuje působení chemických nebo fyzikálních faktorů na přechod fága z lysogenního do lytického cyklu (převzato a upraveno: \*Vu and Oh, 2020).

V životních cyklech všech bakteriofágů ovšem existují procesy, které jsou společné všem: adsorpce, penetrace, přenos genetického materiálu z kapsidy, exprese a replikace nukleových kyselin, sestavení virionů a jejich uvolnění a přenos. Adsorpce probíhá ve dvou fázích. Po prvotnímu kontaktu dojde k reverzibilnímu navázání na povrch hostitele. Je to moment, kdy se může celý proces zvrátit a k infekci nedojde. Jakmile dojde k ireverzibilní vazbě fága s buněčnou stěnou, stává se penetrovatelnou a dochází k přenosu nukleových kyselin dovnitř, zatímco kapsida zůstává na povrchu. Poté je genom začleněn do hostitelského genomu, nebo zůstává volně v cytoplazmě, dochází k jeho replikaci a sbalení do kapsid (\*Weinbauer, 2004).

### 3.2 Objev bakteriofágů a bakteriofágové (fágové) terapie

Jak jsem již zmínila objev bakteriofágů v roce 1915 je připisován anglickému mikrobiologovi Frederikovi Twortovi a Francouzi Felixu d'Herelle, jenž v roce 1917 poprvé připisuje této objevené antibakteriální látce virový původ a označení bakteriofág. K tomuto objevu dochází při detekci “neviditelných entit” ve filtrátu stolice pacientů s úplavicí. Rychle pochopil, jaký potenciál se v těchto antibakteriálních bakteriofázích skrývá a vrhnul se do výzkumu a testování. Pro ověření bezpečnosti své objevy “fágového léku” nejprve testoval na sobě a svých blízkých. Nakonec v roce 1919 prokázal funkčnost tohoto léku na pacientech trpících úplavicí v nemocnici Hôpital des Enfants-Malades v Paříži (\*Cisek *et al.*, 2017).

V následujících letech proběhlo množství studií a pokusů léčby mnoha onemocnění, např: stafylokokových infekcí, cholery či hojení povrchových ran. Objevily se i studie zaměřující se na ochranu rostlin, např. studie o využití fágů k prevenci měkké hniloby *Pectobacterium atrosepticum* a *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* na plátcích bramborové hlízy a mrkve (\*Buttimer *et al.*, 2017). S přibývajícými studii se ovšem začaly objevovat obavy o účinnost a bezpečnost spojenou s používáním této bakteriofágové terapie. Naráželo se na nedostatečné znalosti o samotných bakteriofázích, patogenitě bakterií, nebo o interakcích fág-hostitel. Konečnou ránu pro výzkum fágové terapie přinesl objev antibiotik sirem Alexandrem Flemingem. Pro své široké spektrum účinnosti, stabilitu a nenáročnost ve výrobě zastavila antibiotika výzkum fágové terapie, a to zejména v USA a západní Evropě. V bádání nepřestal pokračovat hlavně Sovětský svaz (\*Cisek *et al.*, 2017).

Avšak s desetiletími používání antibiotik začal narůstat také problém s rezistentními kmeny bakterií. Tento fakt je jedním z faktorů podněcující návracení vědců ke studiu biologické kontroly a zdokonalení bakteriofágové terapie nejen v lékařství, ale také potravinářství a zemědělství.

## 4 Bakteriofágová terapie (BT)

Biologická kontrola se jeví jako dobrá alternativa k využívaným chemickým sloučeninám nejen z důvodu problémům s multirezistentními kmeny bakterií, ale také z důvodu stále se zvětšující zátěže životního prostředí. Bakteriofágová terapie jako jedna z možností má jistě své výhody, avšak i množství zatím nevyřešených problémů spojených s využitím fágů, jako antimikrobiální látky. V současnosti už existuje mnoho studií potvrzující pozitivní využití fágů nejen v lékařství, ale i zemědělství, což se jeví jako slibný začátek.

Mým cílem v této kapitole není obsáhnout celé téma bakteriofágová terapie. Chtěla bych ve stručnosti charakterizovat BT, poté bych však ráda zmínila, z mého pohledu, zajímavé studie a problémy spojené s využitím BT v ochraně rostlin.

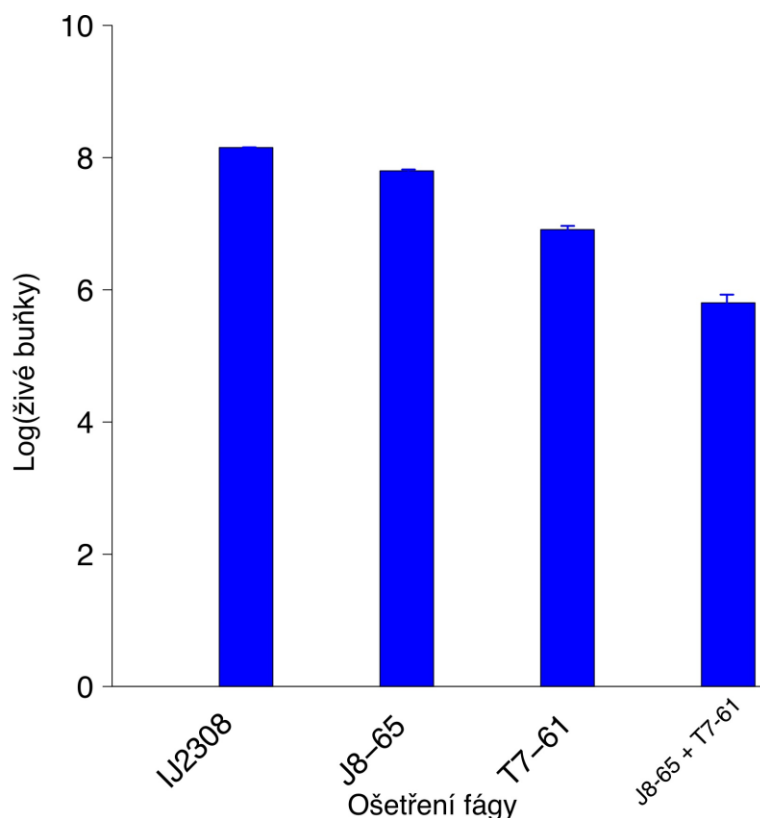
Bakteriofágovou terapií lze využít, jako plnohodnotnou ochranou látku, nebo v kombinaci s používanými antibiotiky (Gu *et al.*, 2012). Fágy jsou přírodními entitami, které napadají pouze své specifické hostitelské bakteriální druhy či kmeny, a nejsou tak hrozbou pro ostatní organismy v přírodě. Nejvýhodnější pro využití fága v BT je lytický životní cyklus (Gayder *et al.*, 2020). V případě BT lze využít aplikace fágového lyzátu nebo endolysinů, enzymů kódovaných fágy.

### 4.1 Fágový lyzát ve fágové terapii

Rozlišujeme monofágovou a polyfágovou terapii. Monofágová terapie znamená použití jen jednoho typu bakteriofága a pro řadu nevýhod, např. jednodušší vytvoření rezistence bakterie proti danému fágovi, se moc nevyužívá (\*Sabri *et al.*, 2021). Mnohem výhodnější je aplikace fágového koktejlu (polyfágová terapie). Směs většího počtu druhů bakteriofágů dokáže znesnadnit právě vznik fágové rezistence u bakterií a rozšířit okruh možných hostitelů. Fágový koktejl může napomoci kompenzovat omezení jednotlivých fágů a poskytnout širší nabídku možností k překonání bakteriálního obranného systému (Biosca *et al.*, 2024).

Ve studii (Schmerer, Molineux and Bull, 2014) se zaměřili na synergii, kdy jeden fág zvyšuje nebo zrychluje růst druhého fága. Roli v této synergii hrají fágové enzymy, jenž degradují extracelulární polysacharidy bakterií a umožňují fágům lepší přístup. Donorový fág produkuje a poskytuje výhodu fágu-akceptoru, přičemž oba fágy musí být schopny v malé míře zabít bakterie, ale ne tak dobře jako společně. Schmerer a spol. využili v experimentu fága T7 a necharakterizovaného divokého fága (J8-65), které použili na mukoidní *E. coli* (IJ2308). T7 vytváří rozšířené projasnění na IJ2308, pokud jeden z jeho plaků přeroste do halo nebo

plaku J8-65. Díky tomu bylo určeno, že donorem je fág J8-65 a akceptorem T7. Výsledky experimentu ukázali, že použití obou fágů současně vede k 10krát většímu zabíjení než u samotného T7 a téměř 100krát většímu než u samotného J8-65 (Obr.10).



**Obrázek 10** Kontrola *E. coli* IJ2308 využitím jednotlivých fágů a synergicky působící dvojicí fágů. Sloupec úplně vlevo znázorňuje počet nijak neošetřených živých buněk IJ2308 na destičce. Prostřední dva znázorňují počet živých IJ2308 po ošetření jednotlivými fágy. Sloupec nejvíce vpravo je po ošetření oběma fágy najednou. Data byla získána průtokovou cytometrií a zaznamenána před provedením statistiky. Chybové úsečky ukazují 1 standardní chybu, která je často příliš malá na to, aby byla viditelná (převzato a upraveno: Schmerer, Molineux and Bull, 2014).

## 4.2 Endolyziny a jejich využití

Endolyziny, enzymy kódované bakteriofágy, napomáhají degradaci peptidoglykanů v buněčné stěně bakterií, a tím uvolňování nově vzniklých fágů. Výhody jejich užití se v mnohém shodují s výhodami samotných fágů. Dokážou způsobit rychlou lýzi bakterie, mají vysokou specifitu hostitelských buněk, nejsou hrozbou pro ostatní organismy (Zhang *et al.*, 2022). Možnou nevýhodou se může jevit neúčinnost na gramnegativní bakterie, které mají vrstvu peptidoglykanů překrytou vnější membránou. Objevují se však už i možnosti překonání

této překážky, např. využití chelatačních činidel. Tato činidla vážou kationty, jimiž jsou stabilizované složky vnější membrány (LPS) a ovlivňují stabilitu a propustnost membrány. Například Ni a spol. využili chelatačního činidla EDTA, kdy kombinací EDTA s endolysinem LysPN09 efektivně redukovali fytopatogen *P. syringae* pv. *actinidiae*, způsobující rakovinu kiwi (Ni *et al.*, 2021).

Většina výzkumů se stočila směrem k potravinářství a možnosti využití endolysinů k ochraně potravin. Příkladem je využití endolyzinu LysSTG2 z bakteriofága STG2 pro kontrolu bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *P. putida* na potravinách, konkrétně balené vodě, kuřecím maso či lososovi (Zhang *et al.*, 2022).

### 4.3 Perzistence fágů v přírodě a jejich ochrana

Účinnost fágů při ochraně rostlin nezáleží jen na životním cyklu, nebo rozsahu hostitelských bakterií. Bakteriofágy, jakožto přírodní entity, jsou významně ovlivňovány i okolními podmínkami.

#### 4.3.1 Ochrana před UV zářením

Zejména ve fylosféře (nadzemní části rostliny) existuje mnoho faktorů ovlivňujících jejich přežití a dobu působení: změny teploty, pH, déšť, vlhkost-vysychání. Ačkoliv asi nejničivějším faktorem je sluneční UV záření. Tvorba pyrimidinových dimerů je typickým jevem poškození fágové DNA vlivem UV záření. Ve své studii Born a spol. uvedli, že existuje množství přírodních, snadno dostupných látek, jež jsou nezávadné pro fágy, a mohou, citují: “sloužit jako přírodní opalovací krémy pro fágy”. Testovali šťávy z mrkve, červené papriky a řepy, čistého karotenoidu astaxanthinu z řasy *Haematococcus pluvialis*, směs aromatických aminokyselin, nebo taky kasein či pepton. U všech těchto látek potvrdili pozitivní účinek ochrany Y2 fága napadající bakterii *E. amylovora* před UV zářením (Born *et al.*, 2015).

S možnostmi zvýšit perzistenci fágů ve fylosféře přišly i další studie. (Balogh *et al.*, 2003) prokázali, že lepší účinek má aplikace fágů večer. Taktéž testovali 3 různé formulace: 1. 0,5 % předželatinovaná kukuřičná mouka + 0,5 % sacharóza; 2. Cascrete, 0,5 % Cascrete NH-400 + 0,5 % sacharóza + 0,25 % předželatinovaná kukuřičná mouka; 3. odstředěné mléko, 0,75 % sušeného odstředěného mléka + 0,5 % sacharózy. Všechny zvýšili dobu přežití bakteriofágů na listech rajčete.

### 4.3.2 Fágový nosič a jeho využití

Další možností zvýšení odolnosti a šíření fágů je použití fágového nosiče. Jako vhodný nosič byla vyhodnocena epifytní bakterie *Pantoea agglomerans* běžně se vyskytující v sadech na površích jabloní a hrušní. Jako fágový nosič zvyšuje replikaci bakteriofágů a pomáhá přežití fágů před příchodem patogenu. Ve spojení s její schopností produkovat antibakteriální látky a konkurovat patogenní bakterii *E. amylovora* se jeví jako využitelný zdroj k ochraně stromů proti bakteriální spále (Gayder et al., 2020). Což potvrzuje studie, ve které došlo snížení rozvoji příznaků spály na květech stromů při aplikaci vybraných fágů, např. fág ΦEa2345-6, společně s nosičem *P. agglomerans* (Boulé et al., 2011). Pozitivních výsledků ve smyslu zvýšení perzistence fágů bylo také dosaženo aplikací atenuovaného mutanta *Xanthomonas perforans* na listy rajčat ještě před samotnou aplikací bakteriofágů (Iriarte et al., 2012). Ke zvýšení ochrany proti černé hnilobě na brokolici (původce: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) došlo v polních pokusech smícháním nepatogenních kmenů *Xanthomonas* sp. a fágem XcpSFC211 (Nagai et al., 2017).

### 4.3.3 Půdní aplikace

Úspěšnost BT rozhodně závisí také na načasování a způsobu aplikace fágů. Ve studii (Iriarte et al., 2012) mluví o tom, že půdní aplikace do blízkosti kořenů může také napomoci zvýšení perzistenci fágů. Podmínky v rhizosféře jsou méně náročné než v prostředí fylosféry. Prokázali rovněž schopnost fágů pohybovat se z kořenové zóny do nadzemních částí rostlin. Při experimentu s regulací bakteriálního vadnutí (původce: bakterie *R. solanacearum*) dosáhli nejlepšího výsledku při použití fágového koktejlu ΦRS5mix aplikovaného ihned po inokulaci. Bez jakéhokoliv účinku proběhl stejný pokus pouze s aplikací jednoho fága.

## 4.4 Kombinace fágů s jinými kontrolními činidly

Možnost kombinovat bakteriofágy s jinými kontrolními činidly je také předmětem mnoha výzkumů. Dosažení ještě účinnější kontroly fytopatogenů je pro tyto studie jistě dobrou motivací. Jednou ze zkoumaných kombinací je společná aplikace fágů s acibenzolar-S-methylem (ASM). ASM je látka používaná k aktivaci obrany rostlin. Je to analog kyseliny salicylové, což je důležitá signální látka spouštějící obranou funkci rostlin v rámci SAR (Lang, Gent and Schwartz, 2007). Ve studii Obradovič a spol. nejprve v rámci kontroly bakteriální skvrnitosti rajčat způsobené *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* aplikovali pouze ASM. Ten účinně potlačil symptomy onemocnění, nicméně po inokulaci

došlo také k pozorování nekrotických skvrn běžných pro hypersenzitivní reakci. Kombinací ASM a bakteriofágů došlo nejen k potlačení choroby, ale také zmizely viditelné projevy HR na rostlinách. Díky tomu se tako kombinace jeví jako možnou alternativou léčby bakteriální skvrnitosti u rajčat (Obradovic *et al.*, 2005). Jako slibnou variantu ochrany proti plísni na cibuli způsobenou *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* uvedli kombinaci bakteriofágů s ASM také ve studii (Lang, Gent and Schwartz, 2007).

Za určitou kombinaci biologických činidel by se dalo považovat i použití bakteriofágů ve spojení s bakterií *Pantoea agglomerans*. Tuto kombinaci jsem již zmiňovala v kontextu zvýšení perzistence a šíření bakteriofágů na rostlině (viz kapitola 3.3.2). Nicméně díky svým antibakteriálním účinkům proti patogenu *E. amylovora* se *P. agglomerans* využívá jako samostatné kontrolní činidlo proti bakteriální spále způsobené právě EA. Komerčně dostupné biopesticidy na bázi bakterií jsou např. Bloomtime (*Pantoea agglomerans* E325, USA), BlossomBless (*P. agglomerans* P10c, Nový Zéland) (Mikiciński *et al.*, 2016).

#### 4.5 Komerčně prodávané prostředky s fágy a právní ošetření

Komerční prodej bakteriofágových kontrolních přípravků je ve velkých začátcích. Jedním z volně dostupných je v USA přípravek AgriPhage patentovaný společností Omnilytics (\*Czajkowski, Roca and Matilla, 2025). Na internetových stránkách této společnosti se dočteme, že AgriPhage je nyní registrovaný pro ochranu rostlin, potravin a zvířat. Rostlinná onemocnění, které je schopen kontrolovat jsou bakteriální spála, rakovina rajčat a citrusů, bakteriální skvrnitost na rajčatech a paprikách a choroby na peckovinách a ořeších (AgriPhage® | *Bacterial Control for Crops, Food Safety & Animal Health*, 14.4.2025).

V Evropské unii v současné době není povoleno používat žádný přípravek na bázi bakteriofágů. Nicméně na schválení momentálně čekají dvě kontrolní činidla – bakteriofág proti *Erwinia amylovora* způsobující bakteriální spálu a bakteriofág účinný proti bakterii z čeledi *Enterobacteriaceae* působící měkkou hnilobu brambor (*EU Pesticides Database – Active substances*, 11.4.2025).

## 5 Bakteriofágová terapie u vybraných onemocnění

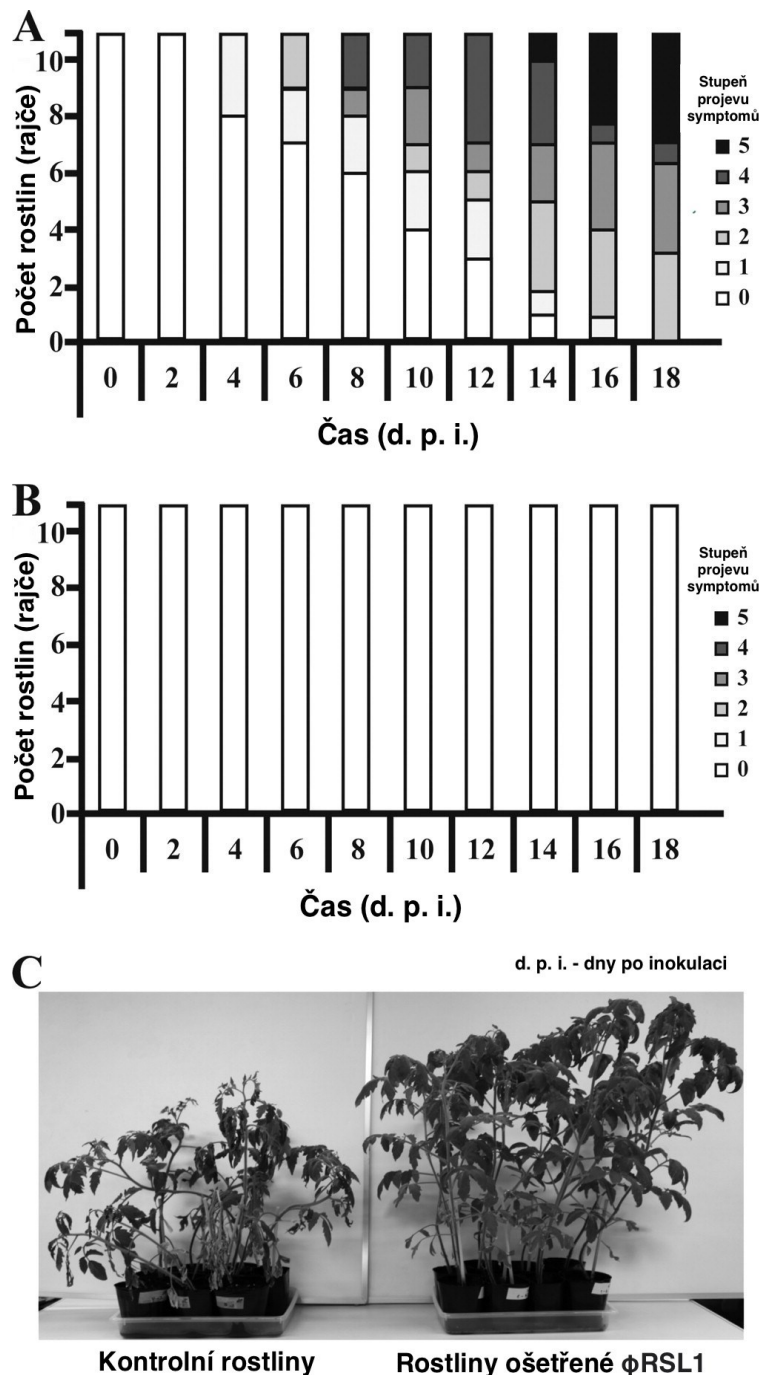
### 5.1 BT proti bakteriálnímu vadnutí

Bakteriální vadnutí je významné rostlinné onemocnění způsobující celosvětově velké ztráty. Možnost biologické kontroly této choroby pomocí bakteriofágů je zkoumána v mnoha studiích. Rozdělení do 5 ras, 5 biovarů a 4 fylotypů (viz kapitola 1.2.2) dělá z *R. solanacearum* poměrně heterogenní skupinu. To je jeden z problémů BT, protože některé fágy infikují pouze úzké spektrum hostitelů. Pro kontrolu bakteriálního vadnutí již bylo charakterizováno mnoho bakteriofágů. Předpokládá se, že pro účinnou kontrolu vadnutí je zapotřebí využití fágového koktejlu, obsahující fágy s širokým spektrem hostitelů (Fujiwara et al., 2011). V následujících řádcích ovšem zmíním studie navrhuující pro účinnou kontrolu bakteriálního vadnutí použití pouze jednoho unikátního fága.

Fujiwara a spol. ve své studii navrhují aplikaci jediného fága  $\phi$ RSL1 pro léčbu vadnutí. Bakteriofág  $\phi$ RSL1 je stabilní při vyšších teplotách (37–50 °C). Ošetřené rostliny rajčat tímto fágem nevykazovaly žádné příznaky vadnutí (Obr.11) a aktivní jedinci  $\phi$ RSL1 byli z kořenů rajčat odebrány ještě čtyři měsíce po aplikaci. Použití  $\phi$ RSL1 nevedlo k samotné lýzi bakteriálních buněk, ale pouze zablokování růstu a pohyby buněk v kořenech rostlin (Fujiwara et al., 2011). Studie (Umrao, Kumar and Kaistha, 2021) charakterizovala fága  $\phi$ sp1, který efektivně ničil vytvořený biofilm *R. solanacearum* (94,73 %) a inhiboval jeho tvorbu o 73,68 %. Fág  $\phi$ sp1 je schopen přežít v rozmezí pH 3–9 a v teplotách až do 55 °C, navíc je schopen infikovat bakterie při nízkém množství infekce (1,0 MOI). V testech na hlízách brambor a sazenicích rajčat výrazně snížil počet patogenů a projevy onemocnění. Bakteriofága RsPod1EGY, taktéž stabilního ve vysokých teplotách (do 60 °C), izolovali z půdy v Egyptě (Elhalag et al., 2018). Zjistili, že tento fág je vysoce specifický, schopný infikovat pouze jedinou variantu *R. solanacearum* na bramborách v Egyptě (fylotyp IIa sequevar 1, biovar 2 rasy 3). Právě pro svou stabilitu při vysokých teplotách a úspěšnosti při skleníkových testech, ve kterých po ošetření rostlin fágem RsPod1EGY nedošlo k projevu bakteriálního vadnutí, se jeví jako nadějná varianta pro ochranu brambor v polních podmínkách v Egyptě.

Poslední fág, kterého chci zmínit ve spojení s bakteriálním vadnutím, je vláknitý fág  $\phi$ RSM3. Infekce tímto fágem nevede ke smrti bakteriální buňky, podobně jako u již zmíněného fága  $\phi$ RSL1. Fág  $\phi$ RSM3 způsobuje ztrátu virulence hostitele potlačením některých hostitelských genů (např. *phcA* a *hrpB*) pomocí otevřeného čtecího rámce 15, který si kóduje. Navíc bakterie infikované fágem  $\phi$ RSM3 (při hustotě  $10^5$  CFU/ml a vyšší) dokázaly poskytnout

roślinám rajčat stoprocentní ochranu před dalším napadením virulentními *R. solanacearum*, a to již den po jejich inokulaci (Addy *et al.*, 2012).



**Obrázek 11** Prevence bakteriálního vadnutí pomocí fága φRSL1. Rajčata stará jeden měsíc byla ošetřena kohoutkovou vodou (graf A) nebo φRSL1 (graf B), a poté inokulována *R. solanacearum*. Symptomy vadnutí byly odstupňovány: 0 – žádné symptomy, 1 – vadnul pouze jeden řapík, 2 – 2–3 řapíky zvadly, 3 – téměř všechny až na 2–3 řapíky zvadly, 4 – všechny řapíky zvadly, 5 – rostlina umírá. Obrázek C znázorňuje vizuální pohled na kontrolní vodu ošetřené a fágem ošetřené rostliny 18 dní po inokulaci (převzato a upraveno: Fujiwara *et al.*, 2011).

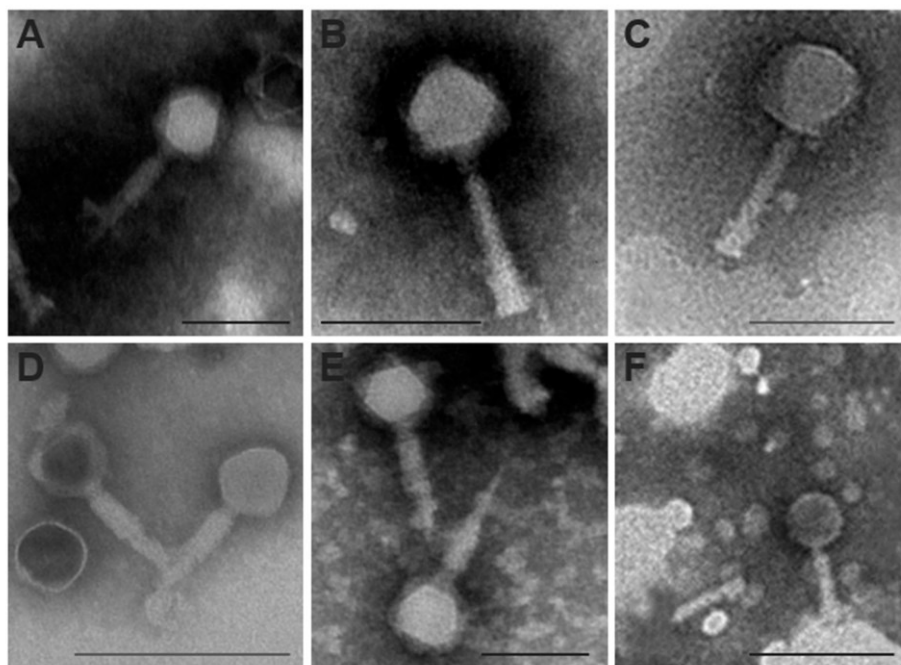
## 5.2 BT u onemocnění způsobených pathovary *P. syringae*

*Pseudomonas syringae* je bakteriální druh, který se bohatý na množství jednotlivých pathovarů. Já zde zmíním pouze několik z nich, společně s možnostmi jejich bakteriofágové kontroly. *P. syringae* pv. *garcae* (Psg) je bakterie způsobující bakteriální plíseň kávy, onemocnění způsobující v posledních letech problémy zejména v Brazílii. Právě zde byly izolovány z listů kávovníku fágy ph002F a ph004F. Pozitivní výsledky regulace Psg IBSBF-158 prokázaly po 10 hodinách inkubace (MOI 10) oba fágy, vysokou účinnost projevily taktéž po 12 hod. inkubace při použití fágového koktejlu. Oba fágy se jeví jako slibnou možností při ochraně kávovníků (Silva et al., 2023).

Od kávy se přesuneme k čaji. U bakteriofága LDT325 byla zjištěno, že může pomoci k ochraně čajovníků před plísní pupenů (původce *P. syringae*) také tím, že dokáže regulovat antioxidační systém rostlin. Ten slouží k obraně rostlin proti oxidačnímu stresu. Antioxidační enzymy udržují v bezpečných mezích výskyt reaktivních forem kyslíku (ROS), které mohou poškozovat lipidy, proteiny a DNA (Liu et al., 2025). Podobnou schopnost má i bakteriofág Medea1. Ten nejenže ve skleníkových testech snižoval počet bakterií *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) v rostlinách, ale také zvyšoval aktivitu obranného systému rostlin. Konkrétně podněcuje expresi genů *Pin2* a *PR1b*, které hrají roli v signální dráze kyseliny jasmonové a kyseliny salicylové (Skliros et al., 2023). Podobně jako již zmíněný fág  $\phi$ sp1 infikující *R. solanacearum* (Umrao, Kumar and Kaistha, 2021) dokáže fág Medea1 účinně ničit již vytvořený Pst biofilm, zejména 3 dny po inokulaci. Provedené testy ukazují, že zásadní vliv na tuto schopnost mají čas a MOI (Skliros et al., 2023).

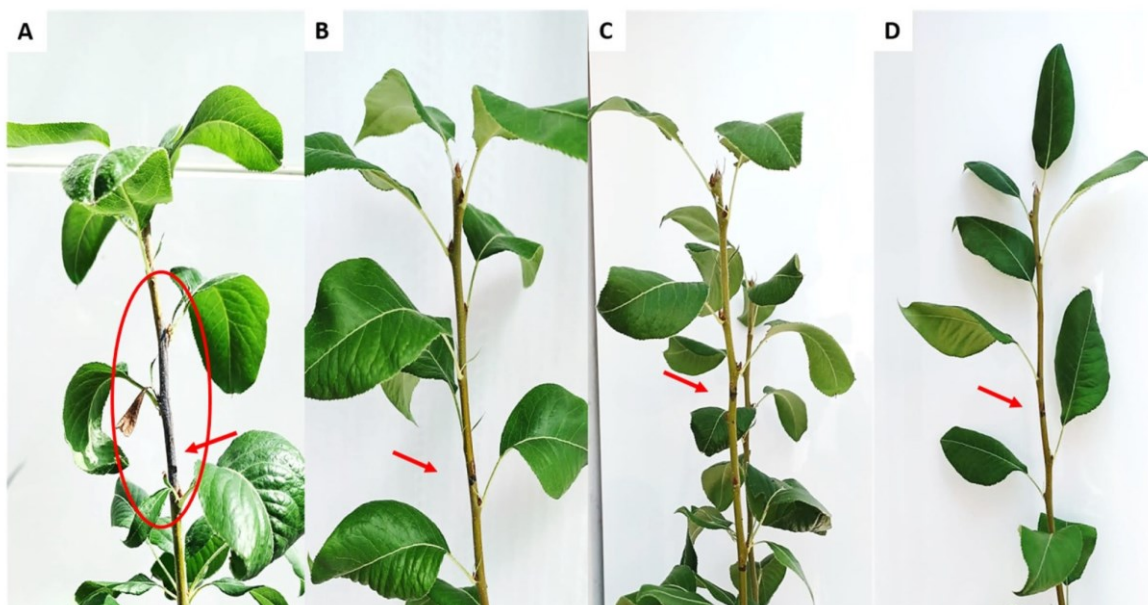
## 5.3 BT proti bakteriální spále

*Erwinia amylovora*, způsobující bakteriální spálu, je patogen devastující zejména sady plné jabloní a hrušní. Biosca a spol. se zaměřili na hledání fágů proti EA v zemích Středomoří. Vytvořili první fágový koktejl proti EA v Evropě, který je účinný v rostlinách. Jednotlivé fágy (Obr.12), nebo jejich kombinace dokázali při preventivní aplikaci na nezralé ovoce oddálit nástup a snížit symptomy bakteriální spály (Biosca et al., 2024).



**Obrázek 12** Znárodnění negativně obarvených bakteriofágů nalezených ve Středomoří pomocí transmisní elektronové mikrofotografie. A – fág  $\phi 6$  zvětšený 33000x; B – fág cp21 zvětšený 50000x; C – fág  $\phi 24$  zvětšený 45000x; D – fág  $\phi 25$  zvětšený 33000x; E – fág  $\phi 27$  zvětšený 33000x; F – fág  $\phi 28$  zvětšený 22000x. Měřítka znázorňují 100 nm v (A, B, C a E) a 200 nm v (D a F) (převzato a upraveno: Biosca et al., 2024).

Ve Středomoří zůstaneme, protože ve studii (Sabri *et al.*, 2022) izolovali v jižní Itálii soubor fágů pojmenovaných EP-IT22, u kterých taktěž potvrdili antibakteriální schopnost proti *E. amylovora*. Pomocí testu turbidity zjistili, že EP-IT22 dokáže lyzovat 94 % živých buněk EA za 20 hodin. Při aplikaci na rostliny (hrušně) bylo dosaženo pozitivních výsledků ochrany totožných s aplikací streptomycinu. Při pokusech nedošlo k rozvoji žádných symptomů spály. (Obr.13)



**Obrázek 13** Experiment znázorňující antibakteriální účinky fágů EP-IT22 proti *E. amylovora*. A – Hrušeň infikovaná *E. amylovora*; B – Hrušeň infikovaná EA a ošetřená fágů EP-IT22; C – Hrušeň infikovaná EA a ošetřená streptomycin sulfátem; D – Zdravá hrušeň ošetřená sterilní vodou. Šipky znázorňují místo inokulace. Červený ovál ukazuje symptomy bakteriální spály – nekróza stonku, popálení listů (převzato a upraveno: Sabri *et al.*, 2022).

Jako poslední zmíním studii o vláknitých fázích. Přestože naprostá většina mnou zmíněných studií se týkala ocasatých fágů, vláknití fágové mohou být také využity v bakteriofágové terapii, jak jsem nastínila u kontroly *R. solanacearum* fágem  $\phi$ RSM3 (Addy *et al.*, 2012). Izolace vláknitých fágů v severním Tunisku schopných napadat *E. amylovora* se povedla ve studii (Akremi *et al.*, 2020). Prokázali, že tyto bakteriofágové dokážou významně snižovat motilitu EA, což je pro EA důležitý faktor virulence. Není zcela jisté, jaký mechanismus to způsobuje. Nicméně existuje předpoklad, že by tyto vláknití fágové mohli působit na sRNA u EA, a tím ovlivňovat její schopnost regulovat virulenci. Potenciál těchto fágů v ochraně rostlin byl testován na plátcích hrušky. Monofágová terapie jednotlivými fágy příliš úspěšná nebyla, ale použití fágového koktejlu (PEar1, PEar2, PEar4 a PEar6) vedlo ke snížení příznaků.

Na závěr čtvrté kapitoly chci říct, že nelze zmínit všechny významné a zajímavé studie. Já vybrala tyto čistě z mého subjektivního pohledu. Na světě totiž čeká nespočet slibných bakteriofágů využitelných v BT, kteří čekají na svou chvíli. U některých z nich už známe jejich schopnost infikovat významné fytopatogeny a množství z nich již dokonce prochází testy na rostlinách.

## 6 Závěr

Cílem této práce bylo popsat fytopatogenní bakterie a představit novou možnost kontroly těchto bakterií – bakteriofágovou terapii.

Bakteriofágová terapie, jakožto potenciální možnost kontroly onemocnění v zemědělství, přichází na scénu z několika důvodů. Kvůli udržitelnosti a šetrnosti k životnímu prostředí do budoucna, ale také problému s přibývajícím kmeny rezistentních bakterií. Ačkoliv jistě stále nevíme mnoho informací o fungování fágů a jejich interakci s bakteriemi, spousta požadavků v hledání nových kontrolních činidel splňují. V následující tabulce jsem shrnula základní přínosy bakteriofágů, a zároveň seznam nedostatků a problému, které je nutné ve spojení využití fágů proti bakteriím řešit.

Výhodné vlastnosti	Nevýhodné vlastnosti
Přirozený výskyt v životním prostředí	Citlivost na okolní vlivy – teplota, vlhkost, pH, a především UV záření → nutná ochrana
Netoxicity, ekologická šetrnost k živ. prostředí	Krátká perzistence v prostředí
Nebyly objeveny žádné negativní účinky na eukaryotické buňky	Možnost inaktivace chemickými činidly (např. sloučeniny obsahující měď)
Přežívají a množí se pouze v přítomnosti hostitele	Horizontální přenos genetické informace – možnost přenosu prospěšných genů pro bakterie
Specifický rozsah hostitelů – cílený útok na daný bakteriální kmen	Úzký hostitelský rozsah
Schopnost inhibovat a ničit biofilm	Možnost vzniku rezistence bakterií vůči fágům → nicméně rezistentní mutace může ovlivnit virulenci bakterií

**Tabulka 1** Stručné shrnutí pozitivních a negativních vlastností bakteriofágů ve spojení s fágovou terapií.

I když ve světě existují země, kde se přípravky na bázi bakteriofágů volně prodávají, myslím, že k celosvětovému schválení a komercializaci produktů, používající fagy jako kontrolní činidlo, máme ještě daleko. Je nutné ještě zjistit a pochopit spousta informací o chování, a interakcích bakteriofágů a potvrdit jejich bezpečnost jako kontrolních činidel. Také musí projít procesem schvalování a ošetření z právního hlediska.

Nicméně existuje již mnoho studií potvrzujících schopnost fágů účinně potlačit onemocnění způsobené fytopatogenními bakteriemi v experimentech *in vitro* i *in vivo* přímo na rostlinách. Což může naznačovat slibné vyhlídky do budoucna.

## 7 Seznam citované literatury

\* označení sekundární citace (review)

Addy, H.S. *et al.* (2012) 'Utilization of filamentous phage  $\phi$ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*', *Plant Disease*, 96(8), pp. 1204–1209. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1023-RE>.

Aghaee, B.L. *et al.* (2021) 'Improving the inhibitory effect of phages against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a burn patient using a combination of phages and antibiotics', *Viruses*, 13(2), p. 334. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13020334>.

AgriPhage® | *Bacterial control for crops, food safety & animal health* (no date)  
AgriPhage™ for Crop Performance and Food Safety | *Biological Bacteriophages*. Available at: <https://agriphage.com/> (Accessed: 14 April 2025).

Akremiti, I. *et al.* (2020) 'First report of filamentous phages isolated from Tunisian orchards to control *Erwinia amylovora*', *Microorganisms*, 8(11), p. 1762. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111762>.

de Araujo, G.G. *et al.* (2019) 'Survival and ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* strains exposed to simulated high-altitude atmospheric conditions', *Scientific Reports*, 9, p. 7768. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44283-3>.

Balogh, B. *et al.* (2003) 'Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato', *Plant Disease*, 87(8), pp. 949–954. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.949>.

Bashan, Y. and de-Bashan, L.E. (2002) 'Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), pp. 2637–2643. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2637-2643.2002>.

Biosca, E.G. *et al.* (2024) 'First European *Erwinia amylovora* lytic bacteriophage cocktails effective in the host: Characterization and prospects for fire blight biocontrol', *Biology*, 13(3), p. 176. Available at: <https://doi.org/10.3390/biology13030176>.

Born, Y. *et al.* (2015) 'Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds', *Bacteriophage*, 5(4), p. e1074330. Available at: <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1074330>.

Borruso, L. *et al.* (2017) 'Conservation of *Erwinia amylovora* pathogenicity-relevant genes among *Erwinia* genomes', *Archives of Microbiology*, 199(10), pp. 1335–1344. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1409-7>.

Boulé, J. *et al.* (2011) 'Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(3), pp. 308–317. Available at:

<https://doi.org/10.1080/07060661.2011.588250>.

\*Buttimer, C. *et al.* (2017) ‘Bacteriophages and bacterial plant diseases’, *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 34. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>.

\*Büttner, D. and He, S.Y. (2009) ‘Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria’, *Plant Physiology*, 150(4), pp. 1656–1664. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>.

Cai, Q. *et al.* (2021) ‘Study on the relationship between bacterial wilt and rhizospheric microbial diversity of flue-cured tobacco cultivars’, *European Journal of Plant Pathology*, 160(2), pp. 265–276. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02237-4>.

Caldwell, D., Kim, B.-S. and Iyer-Pascuzzi, A.S. (2017) ‘*Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants’, *Phytopathology*®, 107(5), pp. 528–536. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0353-R>.

\*Cisek, A.A. *et al.* (2017) ‘Phage therapy in bacterial infections treatment: One hundred years after the discovery of bacteriophages’, *Current Microbiology*, 74(2), pp. 277–283. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>.

Clarke, C.R. *et al.* (2015) ‘Genome-enabled phylogeographic investigation of the quarantine pathogen *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 and screening for sources of resistance against its core effectors’, *Phytopathology*®, 105(5), pp. 597–607. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0373-R>.

\*Czajkowski, R., Roca, A. and Matilla, M.A. (2025) ‘Harnessing bacteriophages for sustainable crop protection in the face of climate change’, *Microbial Biotechnology*, 18(2), p. e70108. Available at: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70108>.

Dudnik, A. and Dudler, R. (2014) ‘Virulence determinants of *Pseudomonas syringae* strains isolated from grasses in the context of a small type III effector repertoire’, *BMC Microbiology*, 14, p. 304. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0304-5>.

El-Fatah, B.E.S.A. *et al.* (2023) ‘Isolation of *Pseudomonas syringae* pv. tomato strains causing bacterial speck disease of tomato and marker-based monitoring for their virulence’, *Molecular Biology Reports*, 50(6), pp. 4917–4930. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08302-x>.

Elhalag, K. *et al.* (2018) ‘Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*’, *Journal of Basic Microbiology*, 58(8), pp. 658–669. Available at: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800039>.

*EU Pesticides database – Active substances* (no date). Available at: <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances> (Accessed: 11 April 2025).

Feltn, C. *et al.* (2024) ‘Novel phages of *Pseudomonas syringae* unveil numerous potential auxiliary metabolic genes’. bioRxiv, p. 2024.05.07.591244. Available at: <https://doi.org/10.1101/2024.05.07.591244>.

Fontana, R. *et al.* (2022) ‘Control of *Erwinia amylovora* growth by *Moringa oleifera* leaf

extracts: In vitro and in planta effects’, *Plants*, 11(7), p. 957. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants11070957>.

Fujiwara, A. *et al.* (2011) ‘Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages’, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), pp. 4155–4162. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.02847-10>.

Gayder, S. *et al.* (2020) ‘Population dynamics between *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans* and bacteriophages: Exploiting synergy and competition to improve phage cocktail efficacy’, *Microorganisms*, 8(9), p. 1449. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091449>.

Gomila, M. *et al.* (2017) ‘Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis’, *Frontiers in Microbiology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02422>.

Groen, S.C. *et al.* (2016) ‘*Pseudomonas syringae* enhances herbivory by suppressing the reactive oxygen burst in *Arabidopsis*’, *Journal of Insect Physiology*, 84, pp. 90–102. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.011>.

Gu, J. *et al.* (2012) ‘A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential’, *PLoS ONE*, 7(3), p. e31698. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031698>.

He, L.-L. *et al.* (2023) ‘A novel strategy to control *Pseudomonas syringae* through inhibition of type III secretion system’, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 194, p. 105471. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105471>.

Ingel, B. *et al.* (2022) ‘Revisiting the source of wilt symptoms: X-ray microcomputed tomography provides direct evidence that *Ralstonia* biomass clogs xylem vessels’, *PhytoFrontiers<sup>TM</sup>*, 2(1), pp. 41–51. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-06-21-0041-R>.

Iriarte, F.B. *et al.* (2012) ‘Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages’, *Bacteriophage*, 2(4), pp. 215–224. Available at: <https://doi.org/10.4161/bact.23530>.

Klee, S.M. *et al.* (2020) ‘Virulence genetics of an *Erwinia amylovora* putative polysaccharide transporter family member’, *Journal of Bacteriology*, 202(22), p. 10.1128/jb.00390-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/jb.00390-20>.

Kornienko, N. *et al.* (2022) ‘Isolation and characterization of two lytic phages efficient against phytopathogenic bacteria from *Pseudomonas* and *Xanthomonas* genera’, *Frontiers in Microbiology*, 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.853593>.

Krishna, P.S. *et al.* (2022) ‘*Pseudomonas syringae* addresses distinct environmental challenges during plant infection through the coordinated deployment of polysaccharides’, *Journal of Experimental Botany*, 73(7), pp. 2206–2221. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erab550>.

Lang, J.M., Gent, D.H. and Schwartz, H.F. (2007) ‘Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator’, *Plant Disease*, 91(7), pp. 871–878. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0871>.

- Lee, S. *et al.* (2023) ‘Identification and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a causative bacterium of apple canker in Korea’, *The Plant Pathology Journal*, 39(1), pp. 88–107. Available at: <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2022.0121>.
- Liu, L. *et al.* (2025) ‘Bacteriophage LDT325 enhances *Pseudomonas syringae* tolerance by improving antioxidant defense in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]’, *Frontiers in Microbiology*, 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1525040>.
- Lukas, M. *et al.* (2022) ‘Toward understanding bacterial ice nucleation’, *The Journal of Physical Chemistry. B*, 126(9), pp. 1861–1867. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c09342>.
- \*Mansfield, J. *et al.* (2012) ‘Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology’, *Molecular Plant Pathology*, 13(6), pp. 614–629. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
- Mikiciński, A. *et al.* (2016) ‘Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus* spp.)’, *European Journal of Plant Pathology*, 145(2), pp. 265–276. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0837-y>.
- Nagai, H. *et al.* (2017) ‘Improved control of black rot of broccoli caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using a bacteriophage and a nonpathogenic *Xanthomonas* sp. strain’, *Journal of General Plant Pathology*, 83(6), pp. 373–381. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0745-4>.
- \*Naureen, Z. *et al.* (2020) ‘Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations’, *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 91(Suppl 13), p. e2020024. Available at: <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10819>.
- Ni, P. *et al.* (2021) ‘Characterization of a lytic bacteriophage against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and its endolysin’, *Viruses*, 13(4), p. 631. Available at: <https://doi.org/10.3390/v13040631>.
- Obradovic, A. *et al.* (2005) ‘Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato’, *Plant Disease*, 89(7), pp. 712–716. Available at: <https://doi.org/10.1094/PD-89-0712>.
- Plantlet (2019) ‘The disease cycle: Stages of disease development’, *Plantlet*, 27 May. Available at: <https://plantlet.org/the-disease-cycle-stages-of-disease-development/> (Accessed: 16 April 2025).
- \*Sabri, M. *et al.* (2021) ‘Phages as a potential biocontrol of phyto-bacteria’, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(17–18), pp. 1277–1291. Available at: <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1902033>.
- Sabri, M. *et al.* (2022) ‘Identification and characterization of *Erwinia* phage IT22: A new bacteriophage-based biocontrol against *Erwinia amylovora*’, *Viruses*, 14(11), p. 2455. Available at: <https://doi.org/10.3390/v14112455>.
- Saint-Vincent, P.M. *et al.* (2020) ‘Isolation, characterization, and pathogenicity of two *Pseudomonas syringae* pathovars from populus *trichocarpa* seeds’, *Microorganisms*, 8(8), p.

1137. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081137>.

Santamaría-Hernando, S. *et al.* (2022) ‘*Pseudomonas syringae* pv. tomato infection of tomato plants is mediated by GABA and l-Pro chemoperception’, *Molecular Plant Pathology*, 23(10), pp. 1433–1445. Available at: <https://doi.org/10.1111/mpp.13238>.

Santander, R.D. and Biosca, E.G. (2017) ‘*Erwinia amylovora* psychrotrophic adaptations: evidence of pathogenic potential and survival at temperate and low environmental temperatures’, *PeerJ*, 5, p. e3931. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.3931>.

Schachterle, J.K. *et al.* (2022) ‘Identification of novel virulence factors in *Erwinia amylovora* through temporal transcriptomic analysis of infected apple flowers under field conditions’, *Molecular Plant Pathology*, 23(6), pp. 855–869. Available at: <https://doi.org/10.1111/mpp.13199>.

Schmerer, M., Molineux, I.J. and Bull, J.J. (2014) ‘Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails’, *PeerJ*, 2, p. e590. Available at: <https://doi.org/10.7717/peerj.590>.

Silva, E.C. *et al.* (2023) ‘Newly isolated phages preying on *Pseudomonas syringae* pv. garcae: *In vitro* and *ex vivo* inactivation studies in coffee plant leaves’, *Enzyme and Microbial Technology*, 171, p. 110325. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110325>.

Skliros, D. *et al.* (2023) ‘In planta interactions of a novel bacteriophage against *Pseudomonas syringae* pv. tomato’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(11), p. 3801. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12493-5>.

Slack, S.M. *et al.* (2017) ‘Microbiological examination of *Erwinia amylovora* exopolysaccharide ooze’, *Phytopathology*®, 107(4), pp. 403–411. Available at: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0352-R>.

\*Stefani, E. *et al.* (2021) ‘Bacteriophage-mediated control of phytopathogenic Xanthomonads: A promising green solution for the future’, *Microorganisms*, 9(5), p. 1056. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051056>.

Taylor, P. and Reeder, R. (2020) ‘Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors’, *CABI Agriculture and Bioscience*, 1(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s43170-020-00001-y>.

Umrao, P.D., Kumar, V. and Kaistha, S.D. (2021) ‘Biocontrol potential of bacteriophage  $\phi$ sp1 against bacterial wilt-causing *Ralstonia solanacearum* in Solanaceae crops’, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), p. 61. Available at: <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00408-3>.

\*van der Wolf, J. and De Boer, S.H. (2015) ‘Phytopathogenic bacteria’, in B. Lugtenberg (ed.) *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture*. Cham: Springer International Publishing, pp. 65–77. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_9).

Vanneste, J.L. (2000) ‘What is fire blight? Who is *Erwinia amylovora*? How to control it?’, in *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. (CABI Books), pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1079/9780851992945.0001>.

\*Vrancken, K. *et al.* (2013) 'Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art', *Microbiology*, 159(Pt\_5), pp. 823–832. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.064881-0>.

\*Vu, N.T. and Oh, C.-S. (2020) 'Bacteriophage usage for bacterial disease management and diagnosis in plants', *The Plant Pathology Journal*, 36(3), pp. 204–217. Available at: <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.04.2020.0074>.

\*Weinbauer, M.G. (2004) 'Ecology of prokaryotic viruses', *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), pp. 127–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>.

\*Yadav, M. *et al.* (2024) 'Navigating the signaling landscape of *Ralstonia solanacearum*: A study of bacterial two-component systems', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(5), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03950-y>.

\*Ye, M. *et al.* (2019) 'A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment', *Environment International*, 129, pp. 488–496. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.062>.

Ye, M. *et al.* (2022) 'Managing tomato bacterial wilt by suppressing *Ralstonia solanacearum* population in soil and enhancing host resistance through fungus-derived furoic acid compound', *Frontiers in Plant Science*, 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1064797>.

Zeng, Q., Puławska, J. and Schachterle, J. (2021) 'Early events in fire blight infection and pathogenesis of *Erwinia amylovora*', *Journal of Plant Pathology*, 103(1), pp. 13–24. Available at: <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00675-3>.

Zhang, Y. *et al.* (2022) 'Application of endolysin LysSTG2 as a potential biocontrol agent against planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas* on various food and food contact surfaces', *Food Control*, 131, p. 108460. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108460>.

Zhao, Y., Blumer, S.E. and Sundin, G.W. (2005) 'Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue', *Journal of Bacteriology*, 187(23), pp. 8088–8103. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.8088-8103.2005>.