

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Metoda loop-mediated isothermal amplification pro detekci  
fytopatogenních mikroorganismů**

**Ing. Dagmar Stehlíková**

**2019**

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

---

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 12.09.2019

## Dedikace

Výsledky uvedené v této disertační práci vznikly za finanční podpory grantů GA JU: 062/2016/Z, 011/2017/Z, 120/2016/Z, 027/2019/Z, COST Actions FP1406

## Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu celého studia. Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavlu Beranovi, Ph.D. za odborné konzultace a za jeho častou trpělivou pomoc. Další poděkování patří vědeckému týmu Dr. Alberto Santini, který mě podporoval při zpracování části této disertační práce.

## Summary

In the areas of tomato and pepper growth, *Xanthomonas* related bacteria cause high economical losses every year. This thesis presents development of three separate LAMP assays for portable rapid and sensitive detection of plant pathogenic bacteria *X. vesicatoria*, *X. gardneri* and *X. euvesicatoria* that cause bacterial spot of tomato and pepper. Based on bioinformatic analysis of available gene sequences was chosen one gene *efp* for design primers for *X. vesicatoria*. The reaction was optimized by mixing the components where  $\text{MgSO}_4$  was in a gradient dilution. The LAMP method for detection *X. vesicatoria* was transferred to a Smart-DART platform (Diagenetix, USA). The *atpD* gene was selected to design primers for specific detection of *X. gardneri*. Real-time LAMP and colorimetric LAMP were optimized. LAMP method was optimized for *X. euvesicatoria*. It was based on the selection of a specific region within the whole genome. The designed primers were tested at two different concentrations. The reaction was specific at both concentrations. The difference was only at the beginning of the threshold fluorescence overhang. To verify the functionality of the LAMP method, the method was tested on DNA isolated directly from plants. The LAMP for specific detection of *X. euvesicatoria* was detection limit of 0,128 pg/ $\mu\text{L}$  DNA in the reaction.

*Fusarium circinatum* is the causal agent of pitch canker, a destructive disease, which is an economically important disease of pines and other conifers in many parts of the world including south North America, Central and South America, east Asia, South Africa and also south-west Europe. It causes cankers from which a huge amount of resin is extruded, especially at the early stage of colonization. Since *F. circinatum* is a quarantine organism, subjected to provisional emergency measures, its report immediately causes serious economic implications. For this reason, in this thesis is developed a sequence-specific probe LAMP assay for *F. circinatum* using a field-deployable portable Genie<sup>®</sup> II (Optigene, UK) and Smart-DART<sup>®</sup> (Diagenetix, USA) instrument. The assay is able to detect target DNA in pine tissue in a reasonably short time and detection limit was as low as 0,05 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  of DNA. The molecular assay is, therefore, able to detect the infection even before symptoms have fully developed. The test was challenged with a very large set of strains collected in different regions of the

world and host plants, giving reliable results. The high efficiency of this method suggests its use as a standard diagnostic tool during phytosanitary controls.

## Seznam impaktových a recenzovaných publikací:

Prohlašuji, že moje role na přípravě publikací a rukopisů publikací byla následující:

1. Stehlíková D., Beran P., Čurn V. (2016): Optimalizace metody loop-mediated isothermal amplification pro detekci bakterie *Xanthomonas vesicatoria*. Úroda 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 281-284. ISSN 0139-6013.

*Kultivace a izolace bakterií, návrh primerů, otestování vzorků pomocí PCR a LAMP, elektroforéza DNA, vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace.*

2. Beran P., Zemanová M., Kříž P., Stehlíková D., Olšan P., Havelka Z., Čurn V. (2016): Vliv nízkoteplotního plazmatu na životaschopnost fytopatogenních bakterií. Úroda 12, roč. LXIV, vědecká příloha, s. 129-132. ISSN 0139-6013.

*Kultivace bakterií, spolupráce při přípravě vzorků a spolupráce při interpretaci výsledků.*

3. Stehlíková D., Beran P., Čurn V. (2017): Návrh a testování duplex-PCR pro detekci bakteriální skvrnitosti u rajčat. Úroda 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 81-88. ISSN 0139-6013

*Kultivace a izolace bakterií, návrh primerů, otestování vzorků pomocí PCR a LAMP, elektroforéza DNA, vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace.*

4. Beran P., Stehlíková D., Dušek J., Čurn V. (2017): Míra polní odolnosti rezistentních odrůd rajčete k *Phytophthora infestans* v podmínkách ČR. Úroda 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 279-282. ISSN 0139-6013.

*Spolupráce při zakládání a sklizení polního pokusu, spolupráce při interpretaci výsledků.*

5. Stehlíková D., Vernerová K., Čurn V., Tonka T., Farková B., Vejčík A., Barták P., Václavěk P. The use of LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) method for molecular diagnosis of lentiviruses in small ruminants. Veterinářství 2018;68(5): 340-345.

*Příprava vzorků pro testování, izolace DNA, optimalizace metody LAMP, elektroforéza DNA, vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace.*

6. Strnad A., Stehlíková D., Beran P., Čurn V. Design primers for detection *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. Úroda 12, LXVI, s. 279-282. ISSN 0139-6013.

*Návrh primerů, otestování vzorků pomocí PCR, elektroforéza DNA, vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace.*

7. Tonka, T., Čurn, V., Stehlíková, D., Vejčík, A., Barták, P., Václavek, P., Šimek, B. (2019). The phylogenetic analysis of a novel genetic subtype of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in the Czech Republic. Acta virologica, 63(2), 240-242.

*Testování vzorků pomocí PCR, elektroforéza DNA, přečištění vzorků pro sekvenování, příprava publikace*

8. Stehlíková D., Beran P., Stephen S.P., Strnad A. a Čurn V: (2019) Multiplex PCR for detection of bacterial spot of tomato and pepper related *Xanthomonas*. European Journal of Plant Pathology, odesláno k opublikování

*Izolace DNA, návrh primerů, otestování vzorků pomocí PCR, elektroforéza DNA, vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace.*

9. Stehlíková D., Beran P., Stephen S.P. a Čurn V (2019) Development of real-time and colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Xanthomonas gardneri*. Plant Disease, odesláno k opublikování

*Kultivace a izolace DNA, návrh primerů, optimalizace metody, vyhodnocení výsledků, příprava publikace.*

10. Stehlíková D., Luchi N., Aglietti C., Pepori A. L., Diez Casero J. J. a Santini A. (2019) Real-time loop-mediated isothermal amplification assay based on assimilating probe for rapid sequence-specific detection of *Fusarium circinatum*, Biotechnique, odesláno k opublikování

*Kultivace a izolace DNA, návrh primerů a asimilační sondy, optimalizace metody, vyhodnocení výsledků, příprava publikace.*

Za spoluautory pravdivost prohlášení potvrzují:

.....  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

V Českých Budějovicích dne 12.9. 2019

.....  
Ing. Dagmar Stehlíková



## Ostatní činnost

### Příspěvky na konferencích ve sborníku:

1. Stehlíková D., Beran P., Čurn V. (2017): Design and testing of duplex PCR primers for detection of bacterial spot of tomato, 2<sup>nd</sup> World Biotechnology Congress in Sao Paulo (BR), 4. – 5.12.2017.
2. Stehlíková D., Aglietti C., Paap T., Luchi N., Pecori F., Santini A. (2019): A new loop-mediated isothermal amplification assay based on assimilating probe for early sequence-specific detection of *Fusarium circinatum* and *F. euwallaceae*, IUFRO Phyllosphere Diseases Conference in Figline Valdarno (IT), 5-10.5.2019.
3. Stehlíková D., Beran P., Čurn V. (2019): Real-time colorimetric loop-mediated isothermal amplification for point of care detection of *Xanthomonas gardneri* causal agent of bacterial spot of tomato and pepper, CA16107 Action on Third Annual Conference in Lednice (CZ), 9–11.09. 2019.

### Ověřená technologie:

Barták P., Šoch M., Čurn V., Vejčík A., Tonka T., Vernerová K., Farková B., Štoidl P., Jozová E., Hoštičková I., Stehlíková D., Šimek B., Václavěk P. a Plodková H. (2018): Systém prevence a profylaxe lentivirových infekcí malých přežvýkavců. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

### Řešené granty:

1. Hlavní řešitelka grantu GA JU (062/2016/Z) „Vývoj postupu pro polní detekci fytopatogenních karanténních bakterií *Xanthomonas vesicatoria*“. (rozpočet 195 000 Kč)
2. Hlavní řešitelka grantu GA JU (011/2017/Z) „Loop-mediated isothermal amplification pro detekci karanténních bakterií patogenních pro rajče a papriku“ (rozpočet 331 000 Kč)
3. Spoluřešitelka grantu GA JU (120/2016/Z) „Nové přístupy a techniky v rostlinolékařství, šlechtění a ochraně biodiverzity“ (rozpočet 715 000 Kč)

4. Spoluřešitelka grantu NAZV QJ 1610096 (2016 – 2018) „Program zdravotní kontroly antivirových infekcí malých přežvýkavců s využitím metod časně laboratorní diagnostiky“ (rozpočet: 6 583 866 Kč)
5. Hlavní řešitelka STSM v rámci grantu COST FP1406 „Optimization rapid method loop-mediated isothermal amplification for detection *Fusarium circinatum*“ (rozpočet: 2 500 EUR)
6. Spoluřešitelka grantu GA JU (027/2019/Z) „ Nové přístupy a techniky ve šlechtění, rostlinolékařství a hodnocení kvality rostlinných produktů “ (rozpočet: 1 164 000 Kč)
7. Spoluřešitelka grantu NAZV QK 1920412 (2019 – 2021) „Mykoviry jako součást potenciálních biopreparátů v ochraně smrkových porostů proti václavkám“ (rozpočet: 6 208 000 Kč)
8. Hlavní řešitelka STSM v rámci grantu COST CA16107 „Optimization of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*“ (rozpočet: 2 500 EUR)

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	11
2.1	Bakterie rodu <i>Xanthomonas</i> .....	11
2.1.1	Popis .....	11
2.1.2	Detekce molekulárními metodami .....	18
2.2	Houba <i>Fusarium circinatum</i> .....	20
2.2.1	Popis .....	20
2.2.2	Detekce molekulárními metodami .....	24
2.3	Diagnostické molekulární metody .....	25
2.4	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	25
2.4.1	Princip LAMP .....	26
2.4.2	LAMP primery .....	29
2.4.3	Návrh primerů .....	29
2.4.4	Vyhodnocení LAMP .....	31
2.4.5	Real-time Platformy .....	32
3	Cíle a hypotézy.....	35
4	Materiál a metody .....	36
4.1	<i>Xanthomonas</i> spp. patogenní pro rajče a papriku .....	36
4.1.1	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	36
4.1.2	<i>Xanthomonas gardneri</i> .....	40
4.1.3	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> .....	43
4.2	<i>Fusarium circinatum</i> .....	45
5	Výsledky .....	48
5.1	Detekce bakterií rodu <i>Xanthomonas</i> metodou LAMP.....	48
5.1.1	<i>Xanthomonas vesicatoria</i> .....	48
5.1.2	<i>Xanthomonas gardneri</i> .....	51
5.1.3	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> .....	56
5.2	Detekce <i>Fusarium circinatum</i> metodou LAMP .....	60
6	Diskuse.....	63
6.1	Detekce bakterií rodu <i>Xanthomonas</i> .....	63
6.1.1	<i>X. vesicatoria</i> .....	63
6.1.2	<i>X. gardneri</i> .....	64
6.1.3	<i>X. euvesicatoria</i> .....	65
6.1.4	LAMP pro <i>Xanthomonas</i> ssp.....	66
6.2	Detekce houby <i>Fusarium circinatum</i> .....	67
7	Závěr .....	70
8	Seznam použité literatury.....	71

## 1 Úvod

Metoda LAMP (z anglického názvu "loop-mediated isothermal amplification"), jejíž české označení je "izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou", se řadí k nově vyvinutým molekulárně-biologickým metodám pro amplifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin (DNA nebo RNA). Metoda LAMP se jako rychlá metoda používá zejména pro detekci patogenních mikroorganismů. Tato metoda může být také vhodnou detekční metodou v rozvojových zemích, jelikož nevyžaduje nákladné vybavení. Díky komerčně dostupným přenosným platformám je možné provádět monitorování přímo v terénu. Je ekonomicky efektivní, a to i díky tomu, že pro vizualizaci není potřeba elektroforetického zobrazení. Další výhodou metody LAMP je její rychlost a tedy možnost rychlé a přitom dostatečně přesné analýzy. Včasná detekce je nezbytnou součástí pro eliminaci šíření patogenních mikroorganismů. Mezi nejvýznamnější patogenní organismy patří bakterie, houby a viry. Tyto činitele jsou schopni při vhodných podmínkách zapříčinit onemocnění hostitele. Závažnějšímu rozvoji onemocnění by se mělo předcházet, a to správnou identifikací patogenu a včasnou detekcí napadených rostlin nebo zvířat.

V disertační práci jsem se zabývala využitím metody LAMP pro detekci patogenních mikroorganismů – bakterií rodu *Xanthomonas* a houby *Fusarium circinatum*.

Mezi významné druhy zelenin, jejichž produkce a pěstitelské plochy neustále narůstají, patří papriky a rajčata. Velkoplošné technologie pěstování a koncentrace ploch ale přináší riziko šíření zejména bakteriálních patogenů rodu *Xanthomonas*, který způsobuje bakteriální skvrnitost. Je to ekonomicky významné karanténní onemocnění vedoucí až k zničení porostů.

Vřeckovýtrusná houba *Fusarium circinatum* (*Gibberella circinata* Nirenberg & O'Donnell (teleomorfní stádium)) byla detekována již v roce 1946 v USA. Nyní je rozšířena celosvětově a to hlavně ve vlhkých a teplých oblastech. Způsobuje onemocnění pryskyřičná rakovina borovic. Zapříčiňuje padání semenáčků ve školcích a poškození kmene a větví stromů v lesních porostech. Identifikace onemocnění u semenáčků je obtížná. Je důležité mít vhodný detekční nástroj, který onemocnění detekuje dříve, než se objeví příznaky a dojde k rozšíření patogenu.

Pro diagnostiku uvedených fytopatogenů se používají metody sérologické (ELISA) a molekulárně biologické (PCR, LAMP). Tato disertační práce je zaměřena na optimalizaci molekulárně biologické metody LAMP pro detekci fytopatogenů (*Xanthomonas* ssp. a *Fusarium circinatum*).

## 2 Literární přehled

### 2.1 Bakterie rodu *Xanthomonas*

#### 2.1.1 Popis

##### *Klasifikace*

Onemocnění, které způsobují bakterie rodu *Xanthomonas*, bylo poprvé objeveno na rajčeti v Jihoafrické republice v roce 1914, původce onemocnění pojmenoval Doidge (1920) jako *Bacterium vesicatorium*. Toto onemocnění bylo později identifikováno také v Indii Gardenerem a Kendrickem. Měli připravené pojmenování *Bacterium exitiosum*, ale přiklonili se k názvu, který navrhl Doidge. Tyto dva druhy se sice odlišovaly v amylolytické aktivitě, ale bylo k nim přistupováno jako k jednomu původci onemocnění. Toto onemocnění identifikovali jako bakteriální skvrnitost listů u rajčete a také u papriky (Gardner a Kendrick, 1923). Higgins (1922) byl ale první, který tuto chorobu zcela popsal. V následných revizích terminologie byla bakterie zařazena do rodu *Xanthomonas* (Dowson, 1939) jako *Xanthomonas vesicatoria* a nakonec přejmenována na *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dye, 1978).

Vauterin a kol. (1995) identifikovali tři odlišné skupiny A, B a C, které byly klasifikovány jako rasy *X. campestris* pv. *vesicatoria* na základě fenotypových a genotypových testů.

Dlouhou dobu se xanthomonády patogenní pro rajče a papriku řadily do čtyř skupin. Tyto skupiny byly rozlišeny na základě amylolytických a pektolytických aktivit v pulzní gelové elektroforéze, kde bakterie *X. euvesicatoria* a *X. gardeneri* vykazovaly negativní aktivitu a *X. vesicatoria* a *X. perforans* byly pozitivní. Podrobnější molekulárně biologické techniky umožnily klasifikaci samostatných skupin A (*X. euvesicatoria*), B (*X. vesicatoria*), C (*X. perforans*) a D (*X. gardeneri*) (Jones a kol., 2004). *X. euvesicatoria* obsahuje většinu ras *X. campestris* pv. *vesicatoria* (skupina A). Původně Jones a kol. (2000) uváděli, že *X. vesicatoria* (skupina B) a *X. gardeneri* (skupina D) tvořily samostatné skupiny a druhy ze skupiny C byly považovány za poddruh *X. campestris* pv. *vesicatoria* (skupina A). Skupina D byla dříve nazvána

*Pseudomonas gardneri* (Sutic, 1957). Dye (1964) však prokázal její shodnost s rodem *Xanthomonas*.

Vzhledem k tomu, že xanthomonády skupiny A a B se vyskytují po celém světě a jsou patogenní pro rajčata i papriky, jsou nejvýznamnějšími skupinami těchto patogenů. Xanthomonády ze skupiny C byly objeveny v USA, Mexiku a Thajsku, a to pouze na rajčatech. Pro papriky není skupina C patogenní. Xanthomonády ze skupiny D byly detekovány na rajčatech i paprikách v Kostarice, zemích bývalé Jugoslávie, Kanadě, Brazílii a oblastech Tichého oceánu (Jones a kol., 2005).

Na základě fylogenetické analýzy a porovnání parciálních genových sekvencí gyrázy B byly *X. gardneri* a *X. cynarae* (patogenní především pro artyčok) rozpoznány jako druh úzce příbuzný *X. hortorum* (Parkinson a kol., 2007). Young a kol. (2008) navrhli na základě genové podobnosti (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* a *rpoD*) nad 99% u MLSA sloučit *X. euvesicatoria* a *X. perforans* v jednu skupinu. Poddruhy *X. fuscans*, *X. citri* a *X. axonopodis* potvrzují shodu na 98,34% a měly by být přiřazeny ke stejnému druhu jako *X. perforans* a *X. euvesicatoria*. *X. axonopodis*, *X. gardneri* a *X. cynarae* jsou tatáž skupina. Almeida a kol. (2010) a Timilsina a kol. (2015) navrhli rozlišování druhů *Xanthomonas* pomocí šesti genů, a to *fusA*, *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *lacF* a *lepA*.

Ačkoli čtyři druhy *Xanthomonas* infikují stejného hostitele a způsobují velmi podobné onemocnění rajčat, jsou geneticky různými patogeny. Celogenomová srovnávací analýza poskytla přehled o vývoji těchto druhů. Z této analýzy vyplynulo, že *X. gardneri* a *X. vesicatoria* jsou více příbuzné *X. campestris* pv. *campestris* než *X. campestris* pv. *vesicatoria* a *X. perforans* (Potnis a kol., 2011).

Porovnání všech dostupných sekvencí podporuje závěr, že *X. euvesicatoria* a *X. perforans* jsou jeden bakteriální druh. Barak a kol. (2016) ve své studii provedl rozsáhlou analýzu sekvenovaných genomů druhů *X. perforans* a *X. euvesicatoria*. Ve studii byly porovnávány části sedmi genů (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *gyrB*, *lepA* a *rpoD*) ze všech dostupných genomů všech druhů. Polymorfismy se zde vyskytovaly velmi vzácně. Výsledky srovnání nezávislých genů naznačují, že mezi druhy *X. euvesicatoria* a *X. perforans* existuje několik polymorfismů. Ale dřívější oddělení těchto dvou druhů bylo chybně interpretováno díky zkoumání a porovnávání příliš širokého výběru kmenů. Ze škály bioinformatických dat a jejich vlastní analýzy vyplývá označení všech zkoumaných druhů (*X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. axonopodis* pv. *allii*, *X. alfalfa*

subsp. *citrumelonis*, a *X. dieffenbachiaesun*) jako *X. euvesicatoria*. Výsledky jednotlivých studií potvrzují návrh Constantin a kol. (2016) na sloučení druhů *X. perforans* a *X. euvesicatoria* a rozdělení do dvou pathovarů: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* a *X. euvesicatoria* pv. *perforans*. MLSA u genů (*fusA*, *gapA*, *gltA*, *lacF* a *lepA*) ukazuje, že existuje fylogeneticky nová populace *X. euvesicatoria* pv. *perforans* v Íránu, která potřebuje další analýzu (Osdaghi a kol., 2018). Nedávno byla provedena studie na základě celogenomových sekvencí, kde *X. gardneri* a *X. cynarae* byly spojeny do jednoho druhu - *X. cynarae* a rozlišeny do patovarů. *X. cynarae* pv. *cynarae* a *X. cynarae* pv. *gardneri* (Timilsina a kol., 2019).

Xantomonády, které infikují papriku a rajče jsou nyní dle dostupných studií rozděleny na druhy *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria* a *X. cynarae*.

### Rozšíření

Původci bakteriální skvrnitosti se můžou vyskytovat ve všech klimatických podmínkách, avšak největší škody způsobují v subtropických a tropických oblastech (Sahin a Miller, 1996; Jones a kol., 1986). V mírném pásmu se můžeme setkat jen s některými patovary např. *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. axonopodis* (Kůdela a kol., 2002).

Původci bakteriální skvrnitosti jsou rozšířeni v následujících oblastech:

Severní Amerika: Bermudy, Mexiko, Kanada a USA

Střední a Jižní Amerika: Americké Panenské ostrovy, Argentina, Barbados, Brazílie, Chile, Dominikánská republika, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Jamajka, Kolumbie, Kostarika, Kuba, Martinik, Nikaragua, Salvador, Paraguay, Portoriko, Surinam, Svatý Kryštof a Nevis, Svatý Vincenc a Grenadiny, Trinidad, Tobago, Uruguay a Venezuela

Austrálie a Oceánie: Fidži, Mikronésie, Nový Jižní Wales, Nový Zéland, Palau, Queensland, Tasmánie, Tonga, Victoria a Západní Austrálie

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



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

Afrika: Egypt, Etiopie, JAR, Keňa, Malawi, Maroko, Mozambik, Niger, Nigérie, Réunion, Senegal, Seychely, Súdán, Togo, Tunisko, Zambie a Zimbabwe. (OEPP/EPPO, 2019)

#### *Hostitelské druhy*

Paprika (*Capsium* spp.) a rajče (*Lycopersicum* spp.) mezi nejvýznamnější hostitelské druhy bakterií *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin a kol. 1995, *Xanthomonas euvesicatoria* (Jones a kol. 2004), *Xanthomonas perforans* Jones a kol. 2004 a *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic, 1957). Tyto bakterie ale mohou napadat i další hostitelské druhy rostlin. Jsou to například: mochně (*Physalis* spp.), durman (*Datura* spp.), kustovnice (*Lycium* spp.), blín (*Hyoscyamus* spp.), tabák selský (*Nicotiana rustica*) a rostliny rodu *Solanum*. Významt napadení u těchto rostlin není tak důležitý, jako u rajčete a papriky (Hayward a Waterston, 1964).

#### *Morfologie*

Buňky jsou tyčinkovité s jedním polárním bičíkem, mají oblé zakončení a vyskytují se jednotlivě nebo v páru. Jejich přibližná velikost je  $0,6 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$ . Xanthomonády produkují kyseliny ze sacharidů, neredukují dusičnany a jsou katalyticky pozitivní (Jackson, 2009). Xanthomonády jsou nesporulující, obligátně aerobní, gramnegativní bakterie. Na masopeptonovém agar s glukosou vytváří žluté mukoidní hladké kolonie. Zbarvení je způsobeno žlutými pigmenty zvanými xanthomonadiny a exopolysacharidem xanthanem. Netvoří poly- $\beta$ -hydroxybutyrátové inkluze (Kúdela a kol., 2002). Na jiných médiích např: CKTM (Sijam a kol., 1992), mTMB (McGuire a kol., 1986) a YGCA se kolonie liší v jasů žlutého zbarvení a v rozmezí mezi 3-7 dny se kolem kolonií objevuje tzv. halo (Scortichini a kol., 2013).

#### *Symptomy onemocnění*

Příznakem onemocnění rostlin rajčat a paprik jsou vodnaté léze, skvrny, chlorózy a nekrózy, které jsou viditelné hlavně na listech, stoncích a plodech. Mnoho znaků onemocnění je podobných u obou plodin. Vzhledem k tomu, že nejvíce zjevné příznaky

se vyskytují na listech, nemoc je často označována jako "bakteriální skvrnitost". Symptomy začínají jako malé, žluté, až zelené léze na mladých listech, které se zdají většinou deformované a zkroucené. U starších listů se objevují tmavé, vodou nasáklé léze. Ty se rozvíjejí do velikosti 0,25-0,5 cm a postupně hnědnou. Příznaky na listech jsou podobné houbovým onemocněním nebo příznakům poškození pesticidy nebo jinými chemickými prostředky. Od houbového onemocnění se liší matným vzhledem. Léze se častěji vyskytují ve vlhkých částech listu (špička) a následně se i zvětšují. Za sucha listy nekrotizují, vysychají a následně se rozpadají (Obr. 1). U plodů onemocnění začíná světle zelenými, vodou nasáklými lézemi, které nakonec hnědnou a jejich velikost je do 0,5 cm (Obr. 2) (Swings a Civerolo, 1993).

Obrázek 1: Symptomy bakteriální skvrnitosti na listech rajčete infikovaných bakteriemi rodu *Xanthomonas*



[http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/images/Pests/Septoria\\_Leaf\\_Spot\\_of\\_Tomato186.jpg](http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/images/Pests/Septoria_Leaf_Spot_of_Tomato186.jpg)

Obrázek 2: Symptomy bakteriální skvrnitosti na plodu rajčete způsobené bakteriemi rodu *Xanthomonas*



<https://www.extension.umn.edu/garden/fruit-vegetable/plant-diseases/bacterial-spot-tomatopepper/img/bacterial-spot-fruit-2-800.jpg>

### *Biologie*

Xanthomonády jsou fytopatogeny a nacházejí se pouze ve spojení s rostlinami nebo rostlinným materiálem (Kúdela a kol., 2002). Patogen vstupuje do rostlinné tkáně prostřednictvím průduchů a hydatod nebo oděrkami způsobenými větrem, hmyzími vpichy nebo mechanickými prostředky (Jones, 1991).

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

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

## *Ochrana*

Xanthomonády způsobující bakteriální skvrnitost mají nepříznivý vliv na produkci rajčat a paprik. Onemocnění se rozšiřuje rychle a jeho kontrola je složitá. Vůči streptomycinu si rychle vytváří rezistenci (Stall a Thayer, 1962). Doporučuje se používat certifikované osivo. Na trhu jsou dostupné i rezistentní odrůdy. Rostliny jsou běžně ošetřovány přípravky s obsahem mědi (Dougherty, 1979). Závažnost choroby je redukována použitím bakteriálních fágů (bakteriofágů), a to hlavně ve sklenících. Použití bakteriofágů je účinnější než měďnaté přípravky. Studie potvrzují snížení onemocnění s použitím bakteriofágů o 17% a u přípravků na bázi mědi o 11% (Flaherty, 2000). Nevýhodou bakteriofágů je, že jejich účinnost je eliminována deštěm a slunečním zářením. Aplikace se musí provádět brzy ráno před svítáním (Balogh a kol., 2009).

*X. vesicatoria* a *X. euvesicatoria* (*X. perforans*) i *X. gardneri* jsou podle legislativy ČR i EU řazeny ke karanténním organismům (EPPO/CABI, 2017).

### 2.1.2 Detekce molekulárními metodami

Bakterie rodu *Xanthomonas* jsou snadno izolovány z infikované tkáně na živném agaru. Charakterizují je žluté, mukoidní a konvexní kolonie (Doidge, 1920). Žlutá barva je způsobena přítomností xanthomonadinů, ve vodě nerozpustných pigmentů, které jsou přítomné ve vnější membráně (Stephens a Starr, 1963).

Při reklasifikaci druhů *Xanthomonas* se využívaly různé techniky, např. stanovení amylolytické a pektolytické aktivity pomocí SDS-PAGE, či různé sérologické metody např. ELISA (Bouzar a kol., 1994). V roce 1997 Kuflu a Cuppels vyvinuli diagnostickou sondu DNA, která se dala použít k určení *X. euvesicatoria* a *X. vesicatoria*. Na rozlišení čtyř druhů patogenních xanthomonád vyvinuli Cuppels a kol. sady PCR primerů až v roce 2006.

V roce 2000 byly porovnány výsledky AFLP analýzy s analýzou DNA-DNA hybridizace zahrnující 80 kmenů *Xanthomonas*. V tomto případě poskytla analýza pomocí AFLP srovnatelné fylogenetické výsledky jako DNA-DNA hybridizace (Rademaker a kol., 2000). Později byly navrženy čtyři páry druhově specifických PCR primerů, založené na výsledcích předchozích analýz AFLP. Pomocí těchto oligonukleotidových primerů byly schopné přesně detekovat všechny testované kmene (Koenraadt a kol., 2007). Jelikož byl počet testovaných druhů *X. perforans* a *X. gardneri* omezený, Araújo a kol. (2012) otestovali tyto primery na více kmenech metodou multiplex PCR, kterou lze současně detekovat všechny čtyři druhy.

Mezi další detekční nástroje patří i sekvenování, pomocí jehož výsledků lze porovnávat genomy bakterií, a tím i rozlišovat patogenní bakterie. Potnis a kol. (2011) pro svou analýzu využili 454 pyrosekvenování.

Mnoho diagnostických PCR metod bylo založených na analýze oblastí genů. Geny *hrpB* a *rhsA* byly použity pro specifický návrh primerů pro detekci *X. euvesicatoria* (Obradovic a kol., 2004; Park a kol., 2009). Na základě krátkých genových sekvencí byla navržena pro detekci *X. euvesicatoria* také sada primerů Xeu2.4 a Xeu2.5 (Moretti a kol., 2009). Gen *atpD* byl použit pro optimalizaci specifické PCR pro detekci *X. vesicatoria* (Beran a Mráz, 2013). Leite a kol. (1994) byli první, kdo využil analýzu genů *hrp* k detekci 28 různých pathovarů *X. campestris* (Bogdanove a kol., 1996; Noël a kol., 2002). Strayer a kol. (2014) použil analýzu *hrpB2* k vývoji multiplex kvantitativní

PCR pro odhalení všech čtyř bakteriálních patogenů současně. Tato analýza byla považována za velké zlepšení oproti ostatním detekčním technikám využívající gelovou separaci, protože šetří čas a materiál při zpracování mnoha vzorků. V roce 2016 vyvinuli pro identifikaci analýzu pomocí multiplex real-time TaqMan PCR. Na základě sekvence *hrpB7* genu byly navrženy čtyři druhově specifické sondy a dvě sady primerů. Jelikož byl optimalizovaný multiplex PCR vysoce specifický a usnadňoval identifikaci každého bakteriálního patogenu způsobující skvrnitost z čisté kultury a infikované rostlinné buňky, má velký potenciál jako diagnostický nástroj (Strayer a kol., 2016).

## 2.2 Houba *Fusarium circinatum*

### 2.2.1 Popis

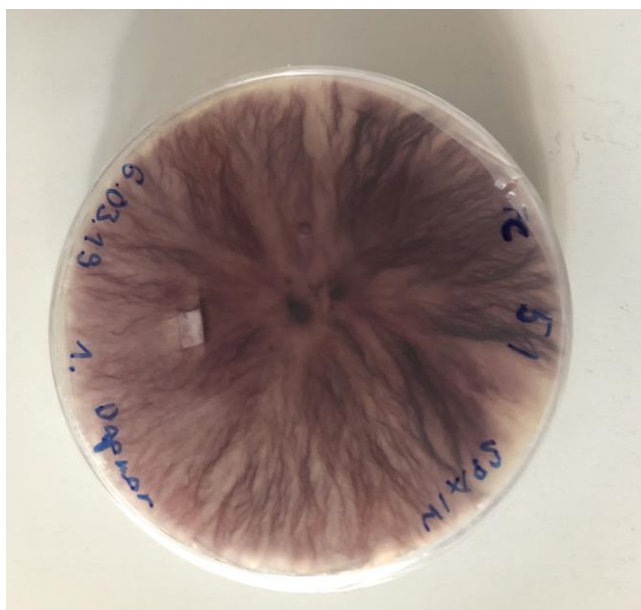
#### *Klasifikace*

*Fusarium circinatum* Nirenberg a O'Donnell (teleomorfa = *Gibberella circinata*) byla prvně popsána v roce 1946 (Hepting a Roth). Od té doby proběhlo několik reklasifikací. (Snyder a kol., 1949; Dwinell a Phels, 1977; Kuhlman a kol., 1978). 15 let se řadila do druhu *Fusarium subglutinans* (Nelson a kol., 1983). Poté byla pojmenována jako *F. circinatum* (Nirenberg a O'Donnell, 1998).

#### *Morfologie*

V kultuře a během životního cyklu v hostiteli patogen vytváří makro- a mikrokonidie. Nejčastěji se ke kultivaci používá médium PDA (potato dextrose agar), kde *F. circinatum* roste při  $22\text{ °C} \pm 6\text{ °C}$  průměrně 4,7 mm/den při  $20\text{ °C}$  (Nirenberg a O'Donnell, 1998). Kolonie tvoří bílé vzdušné mycelium někdy i s lososově zbarveným nádechem uprostřed nebo s purpurovým až tmavě fialovým nebo žlutým pigmentem (Obr. 4). Některé druhy tvoří sterilní hyfy pouze za tmavých podmínek (Aoki a kol., 2001).

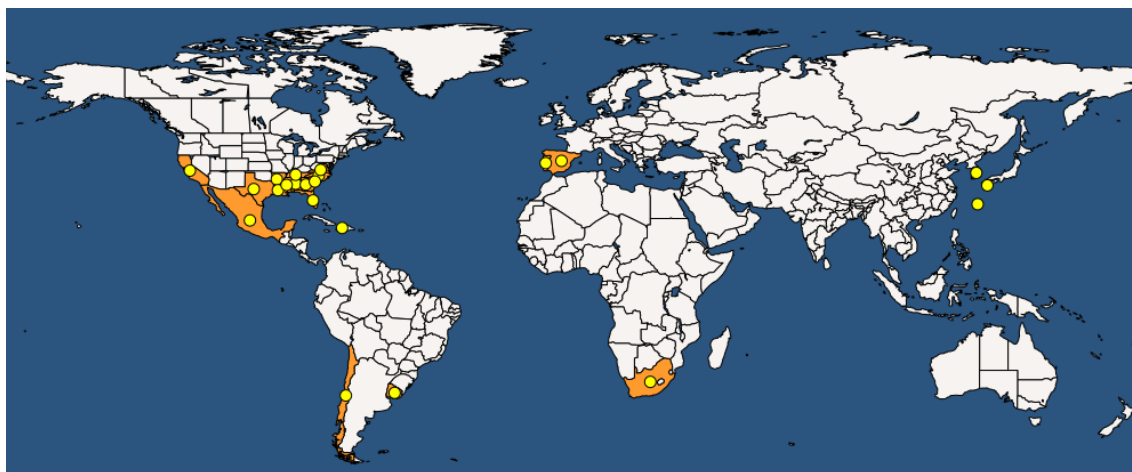
Obrázek 4: Kolonie *F. circinatum* na PDA médiu



### *Rozšíření*

První záznamy výskytu této houby jsou z roku 1945 v Severní Karolíně a Virginii v USA (Hepting a Roth, 1946). Odtud se hojně rozšířila po celé střední Americe (Hepting a Roth, 1953). Výskyt byl zaznamenán také v severní a jižní Americe (Wingfield a kol., 2002; Alonso a Bettucci, 2009; Steenkamp a kol.; 2012; Pfenning a kol., 2014), jižní Africe (Viljoen a kol., 1994) východní Asii (Kobayashi a kol., 1989; Lee a kol., 2000) a západní Evropě. Na území Evropské unie je potvrzen výskyt ve Španělsku (Landeras a kol., 2005) a Portugalsku (Bragança a kol., 2009), avšak v Itálii a Francii byla houba eradikována (Carlucci a kol., 2007) (Obr. 3).

Obrázek 3: Rozšíření houby *F. circinatum*



EPPO (2019)

### *Hostitelské druhy*

*Giberella circinata* (teleomorfní stádium) neboli *Fusarium circinatum* (anamorfní stádium) způsobuje onemocnění „pine pitch canker“. Toto onemocnění postihuje téměř výhradně *Pinus* spp. (borovice), ale bylo také popsáno na *Pseudotsuga menziesii* (douglaska tisolistá) (Storer a kol., 1994; Gordon a kol., 1996). Toto onemocnění bylo v České republice pojmenováno pryskyřičná rakovina borovice (Sliacký a Kapitola, 2007).



### *Symptomy onemocnění*

Symptomy u dospělých stromů jsou v podobě velkých pryskyřičných ran, nejčastěji umístěných na kmeni či sekundárním větvení, obvykle od 2,5 metrů. Po odloupení kůry kmene je možné pozorovat pletivo prosáklé pryskyřicí, které je medově-hnědě až tmavě hnědě zbarveno (tzv. smolení) (Obr. 5). Jehlice mění barvu do rezava a následně opadávají. Pro napadené stromy je typické, že prosychají a mají deformované větve. (Stenkamp a kol., 2012).

Symptomy u semenáčků mají určitá specifika oproti symptomům způsobenými jinými faktory. Příznaky onemocnění jsou pozorovatelné i na kořenovém systému, kdy uhnívá kořenový krček. Semenáčky vykazují také známky chlorózy, padání semenáčků, zarudnutí jehlic a další známky chřadnutí asimilačního aparátu. Nejvíce jsou ohroženy mladé stromky v lesních školkách (Pérez-Sierra a kol., 2007; Donnelly a kol., 2016).

Obrázek 5: Symptomy onemocnění způsobené houbou *F. circinatum*



EU template *Fusarium* field guide (2017)

### *Biologie*

Zdrojem infekce jsou makrokonidie a mikrokonidie přenášené člověkem, větrem nebo hmyzem, vodou i půdním substrátem. Nejvýznamnějším rizikem jsou činnosti způsobené člověkem (transport sazenic mezi školkami nebo ze školek do lesa). Typickým lokálním přenašečem konidií je hmyz z rodu *Pityophthorus* a *Conophthorus*. Tento hmyz se běžně rozmnožuje i na napadených větvích a nově vylíhnutí dospělci dále tento patogen přenášejí (EPPO, 2005). Pro vstup patogenu napomáhá poranění způsobené hmyzem (Donnelly a kol., 2016).

Výskyt houby je vázán na oblasti s vyšší vzdušnou vlhkostí a s relativně vysokými teplotami. V oblastech mírného klimatu může patogen přežít více než jeden rok v napadeném dřevě nebo v půdě až šest měsíců.

### *Ochrana*

Ochrana proti rozšiřování houbového patogenu *F. circinatum* je zaměřena na používání méně náchylného sadebního materiálu a prevenci, tzn. zabránění šíření této houby ze zamořených území. Chemická eliminace onemocnění není možná. Nejúčinnější je promývání horkou vodou. Dále můžeme aplikovat fungicidy, peroxid vodíku nebo páru. V lesních školkách se doporučuje dodržovat fytosanitární opatření (desinfekce kontejnerů, mechanizačních pomůcek a obuvi). V Chile se v školkách používá způsob biologické ochrany rostlin. Do půdy nebo přímo do kořenů se očkují houby zelenatky (*Trichoderma spp.*) (Moraga-Suazo a kol., 2011)

V České republice představuje *F. circinatum* nebezpečí především v lesních školkách pro *Pinus sylvestris*, ale také pro *Picea abies* a *Larix decidua* (Martín-García a kol., 2018). Kontrola v ČR spadá pod Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Evropská organizace pro ochranu rostlin (EPPO) řadí *F. circinatum* do kategorie A2 a doporučuje nakládání s touto houbou stejně jako s karanténními organismy.

### 2.2.2 Detekce molekulárními metodami

*F. circinatum* byla poprvé detekována primery EF1 a EF1 pro gen translačního elongačního faktoru 1-alfa (*EF-1alfa*) a následným sekvenováním. Tato detekce je vhodná k identifikaci PCR produktů extrahovaných pouze z čisté houbové kultury (O'Donnell a kol., 1998). Další specifická detekce druhu *F. circinatum* primerovým párem CIRC1A a CIRC4A, který amplifikuje fragment DNA o velikosti 360 bp v IGS rDNA (intergenové spacerové oblasti) je využitelná i u DNA extrahované z rostlin a semen při citlivosti 10 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ . Kvantifikace byla provedena metodou real-time PCR. (Schweigkofler a kol., 2004). Pro gen *EF-1alfa* byla optimalizována metoda multiplex PCR. Diagnostický test byl schopen detekovat spory *F. circinatum* v minimální koncentraci 10<sup>5</sup> spor/g půdy a 10<sup>6</sup> spor/g zalévací směsi (Ramsfield a kol., 2008).

Relativně přesná, specifická a citlivá PCR v reálném čase byla porovnána s klasickým PCR testem na 420 semenných DNA extraktech. Zde popsaná PCR se ukázala jako vysoce specifická a podstatně více citlivá než konvenční PCR a umožnila detekci *F. circinatum* ve vzorcích uměle kontaminovaných méně než 1/1 000 infikovaných semen, stejně jako v přirozeně infikovaných vzorcích. Primery a TaqMan sonda cílí na vysoce konzervativní region v rámci 18S ribozomální DNA v rostlinách nebo houbách. Tato metoda je velmi citlivá a to až do 0.4 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  (Ioos a kol., 2009).

Dalším způsobem detekce je použití univerzálních primerů pro ITS s následnou sekvenací. Bohužel není dostatečně polymorfni pro několik blízkých příbuzných druhů. Například u druhů *Fusarium fujikuroi* mají navíc neortologické kopie oblasti ITS2, což může vést k nesprávným fylogenetickým závěrům (O'Donnell a Cigelnik, 1997). Doporučuje se, aby pozitivní výsledky ze všech testů PCR byly ověřeny sekvenční analýzou (White a kol., 1990).

Díky mezinárodní spolupráci bylo provedeno testování devíti molekulárních protokolů pro detekci 71 reprezentativních kmenů *F. circinatum* a příbuzných druhů *Fusarium* s cílem posoudit přenositelnost a výkonnost těchto testů. Vzhledem k tomu, že zúčastněné laboratoře používali vlastní přístrojová vybavení, tato studie prokázala, že diagnostické protokoly pro *F. circinatum* nejsou snadno přenositelné na konečného uživatele (Ioos a kol., 2019).

## 2.3 Diagnostické molekulární metody

### *Sekvenování*

Tato metoda slouží ke stanovení pořadí (sekvence) nukleotidů v molekule DNA (primární struktury). Sekvenování DNA je založeno na přípravě, separaci a detekci fragmentů DNA, jejichž velikost se liší o 1 nukleotid. Základní metodou je Sangerovo sekvenování využívající modifikovanou PCR k syntéze kopií DNA, do nichž jsou začleňovány kromě deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) i dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP), které postrádají hydroxylovou skupinu na 3'konci, na kterou by se mohl navázat další nukleotid v nově vznikajícím řetězci. Tyto ddNTP tedy slouží jako terminátory syntézy. Samotná syntéza DNA pomocí PCR se provádí odděleně ve čtyřech vzorcích, přičemž každý z nich obsahuje jiný dideoxynukleosidtrifosfát (A, T, G, nebo C).

V posledních letech vznikla řada metod označovaných jako „next generation sequencing“ neboli sekvenování nové generace. Tyto metody umožňují především rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou. Next generation sequencing využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat. Ztěžejícím krokem je třídění analyzování výstupních dat. Nejčastěji používanými platformami sekvenování nové generace jsou: 454 (Roche), Solexa (Illumina), Solid (Applied Biosystems), Ion Torrent (Life Technologies), PacBio (Pacific Biosciences), Oxford Nanopore (Stein, 2008; Tucker a kol., 2009).

## 2.4 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkami (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) je vysoce specifická a účinná amplifikační metoda, která amplifikuje DNA za izotermických podmínek (Notomi a kol., 2000; Nagamine a kol., 2002). Ve srovnání s PCR a real-time PCR má LAMP vyšší účinnost amplifikace, která je přisuzována tomu, že není nutné volit složité teplotní podmínky (Nagamine a kol., 2001).

Obrovská výhoda LAMP je i v úspoře času. DNA se amplifikuje  $10^9 - 10^{10}x$  za 15 – 60 minut, což může ve srovnání s PCR ušetřit i 1 hodinu (Nzulu a kol., 2016). Bylo

zjištěno, že metoda LAMP je 10-100x citlivější než PCR, proto lze testování pomocí metody LAMP použít k detekci patogenů v časném stadiu infekce ještě před viditelným projevem příznaků (Li a kol., 2017).

LAMP reakce také poskytuje velké množství vedlejšího produktu, jímž je pyrofosfátový iont, což vede k bílé sraženině pyrofosforečnanu hořečnatého v reakční směsi. Vzhledem k tomu, že množství sraženiny v reakční směsi koreluje s množstvím syntetizované DNA, může být monitorování LAMP reakce v reálném čase dosaženo měřením zákalu v reálném čase (Mori a kol., 2001).

LAMP metodu vyvinuli Notomi a kol. v roce 2000. Pro urychlení reakce vyvinuli Nagamine a kol. v roce 2002 smyčkové primery, které hybridizují s kmenovými smyčkami. Zjistili, že by se tím mohla snížit reakční doba metody na polovinu. Nyní je LAMP již široce používána v oblasti přírodních věd, zejména na detekci mikroorganismů, diagnostiku infekčních nemocí a identifikaci pohlaví embryí (Fang a kol., 2008).

#### **2.4.1 Princip LAMP**

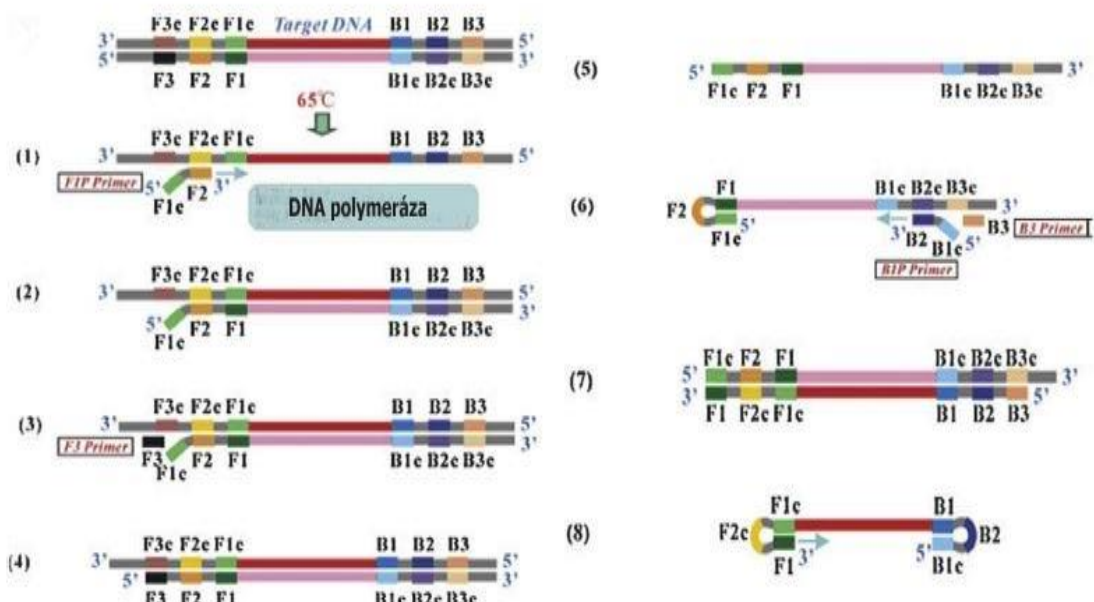
Metoda LAMP je charakteristická použitím šesti různých primerů, které jsou specificky určené k rozpoznání osmi odlišných oblastí na cílovém genu. Amplifikace a detekce genu může být dokončena v jediném kroku inkubace reakční směsi při konstantní teplotě cca 60- 65°C (Notomi a kol., 2000).

V reakční směsi je mimo templátovou DNA a primery také velmi důležitá termostabilní DNA polymeráza (Fang a kol., 2008). Používají se enzymy s dislokázovou aktivitou, které mají 5'-3' endonukleázovou aktivitu. Těmto kritériím vyhovuje *Bst* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus stearothermophilus*, *Bsm* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus smithii* (Nagamine a kol., 2001; Wozniakowski a kol., 2012) a *Gsp* polymeráza z *Geobacillus stearothermophilus* (Hawwa a kol., 2009). Mezi další komponenty patří dNTP, jako zdroj potřebných nukleotidů. Dále se do reakční směsi přidávají ionty  $Mg^{2+}$ , pomocí nichž lze reakci optimalizovat. Na stabilizaci poměru AT a GC bází lze do reakčního mixu přidat aminovou sůl, např. betain (Dhama a kol., 2014).

LAMP amplifikaci lze rozdělit na 2 části. Na přípravu výchozího materiálu a na cyklickou amplifikaci (Notomi a kol., 2000). V první části se vnitřní primer FIP (oblast F2) hybridizuje k oblasti F2c, nacházející se na templátovém řetězci DNA. Tento proces

zahajuje syntézu řetězce a vytváří se řetězec, který je komplementární k templátu. Poté primer F3 nasedá na oblast F3c templátu. S pomocí dislokázové aktivity termostabilní DNA polymerázy se zahájí řetězová substituční reakce, čímž vzniká vazba primeru FIP a nově vzniklého řetězce. Tato struktura může na jednom konci vytvořit smyčkovou strukturu. Syntetizuje se dvojřetězcová DNA pomocí primeru F3 a templátového řetězce DNA. Vzhledem k tomu, že na 5'konci řetězce existují komplementární oblasti F1c a F1 po nasednutí BIP a B3 probíhá ekvivalentní proces a vznikne další struktura kmenové smyčky na druhém konci DNA. Celkově tato struktura slouží jako výchozí materiál pro cyklickou amplifikaci (Obr. 6).

Obrázek. 6: Necyklická fáze LAMP

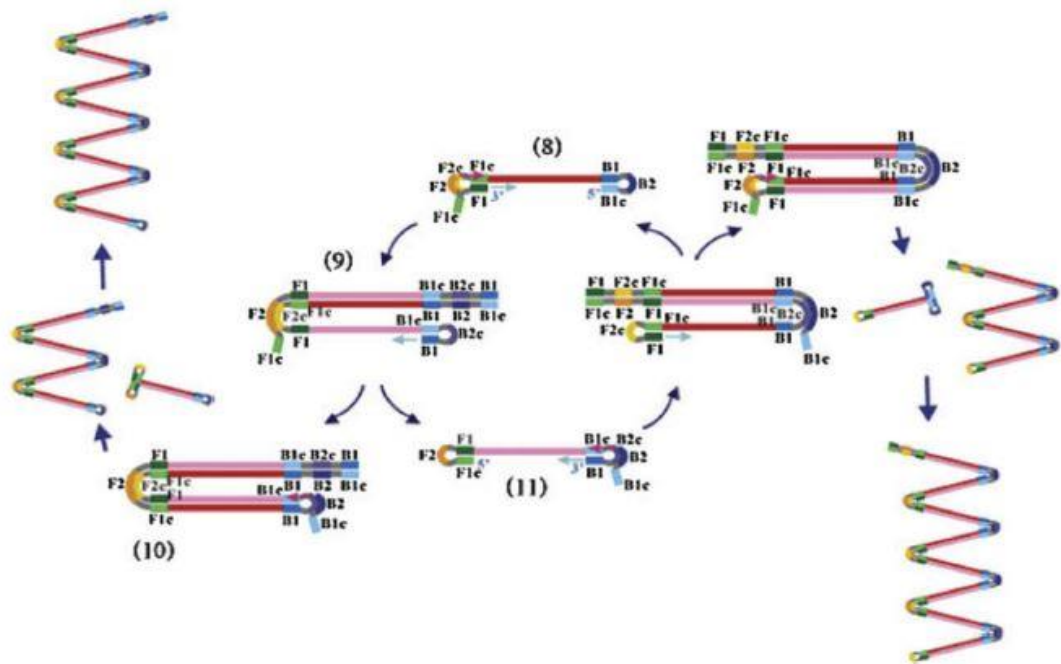


<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0882401017300748-gr2.jpg>

(1) Nasednutí termostabilní DNA polymerázy, (2) prostřednictvím dislokázové aktivity DNA polymerázy se syntetizuje řetězec DNA komplementární k templátové DNA, začínající od 3' konce oblasti F2, (3) nasednutí F3 primeru, (4) dvojvlákno tvořené ze syntetizované DNA a templátu, (5) uvolňuje se vytěsněný řetězec, ze kterého vzniká na 5' konci kmenová smyčka, (6) jednovládnová DNA z kroku 5 slouží jako templát pro syntézu iniciovanou BIP primerem, (7) vzniká dvouvláknová struktura, (8) vznik kmenových smyček na obou koncích.

V druhé části probíhá cyklická amplifikace (Obr. 7). Struktura vzniklá v první fázi je rychle převedena do kmenové smyčky pomocí syntézy DNA. Poté FIP hybridizuje se smyčkou DNA, čímž disociuje dvouřetězcovou DNA na jednořetězcovou, která rychle vytvoří strukturu kmenové smyčky na 3' konci díky komplementárním B1c a B1 oblastem.

Obrázek. 7: Cyklická fáze LAMP



[http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/img/principle\\_13.jpg](http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/img/principle_13.jpg)

(9) Syntéza DNA od 3' konce B1 a uvolnění vlákna spojené s FIP, tato uvolněná struktura může „obtočit“ strukturu vytvořenou v kroku 8, vzniká tak struktura (10), (11) syntéza DNA od 3' konce B1c a uvolnění vlákna

Poté je od 3' konce oblasti B1 iniciována syntéza DNA a uvolňuje se FIP spojený s vláknem. Později se, díky komplementaritě oblastí F1 - F1c a B1c - B1, na obou koncích, tyto oblasti spojí. Stejným způsobem B2 se spojí se smyčkovou oblastí B2c, čímž se vytvoří nová sekvence DNA. Produkt pak slouží jako templát, na který nasedá BIP primer a syntetizuje nové vlákno a následuje cyklická amplifikace až do ukončení reakce. Výsledkem tohoto procesu jsou různé struktury sestávající ze střídavě

obrácených opakování cílové sekvence na tentýž vláknu (Fang a kol., 2008; Li a kol, 2017; Nagamine a kol., 2001).

### **2.4.2 LAMP primery**

Stěžejním krokem LAMP reakce je návrh vysoce citlivé a specifické sady LAMP primerů. Pro návrh je běžně používají programy Primer- Explorer V4/V5, dostupný na internetové stránce <https://primerexplorer.jp/e/> nebo LAMP Designer (Optigene, UK; Primer- Explorer, ČLR).

Sada primerů pro amplifikaci LAMP zahrnuje minimálně čtyři primery, a to vnější přední primer (Forward outer primer; F3), vnější zadní (Backward outer primer; B3), vnitřní přední (Forward inner primer; FIP) a vnitřní zadní (Backward inner primer; BIP). Pro urychlení reakce jsou navrženy dva smyčkové primery, a to zadní smyčkový primer (Backward loop primer; Loop B) a přední smyčkový primer (Forward loop primer; Loop F). Tyto primery odpovídající sekvenci 6 různých oblastí cílového genu. Na 3'konci to jsou oblasti F3c, F2c, F1c a na 5'konci oblasti B1, B2, B3.

FIP je složený ze sekvence F2 na 3'konci, která je komplementární k oblasti F2c, a F1c na 5'konci. F3 je komplementární k oblasti F3c. BIP je složený ze sekvence B2 na 3'konci, která je komplementární k oblasti B2c, a B1c na 5'konci. B3 je komplementární k oblasti B3c. FLP je navržen s použitím komplementárního vlákna odpovídajícího oblasti mezi F1 a F2. BLP je navržen pomocí sekvence komplementárního vlákna oblasti mezi B1 a B2. Vnější primery F3 a B3 mají roli v přesunu vláken během necyklického kroku. FIP a BIP mají sense, tak antisense sekvenci tak, aby napomáhaly při vytváření smyčky. LF a LB jsou navrženy tak, aby zrychlily amplifikační reakci vazbou na další místa, která nejsou přístupná vnitřními primery.

### **2.4.3 Návrh primerů**

Mezi podstatné faktory, které při návrhu primerů musíme dodržovat, patří obsah GC bází a teplota tání. Dále je důležité, aby konce primerů byly stabilní a nevznikaly sekundární struktury. Pokud je sekvence DNA bohatá na GC báze, v primeru by mělo



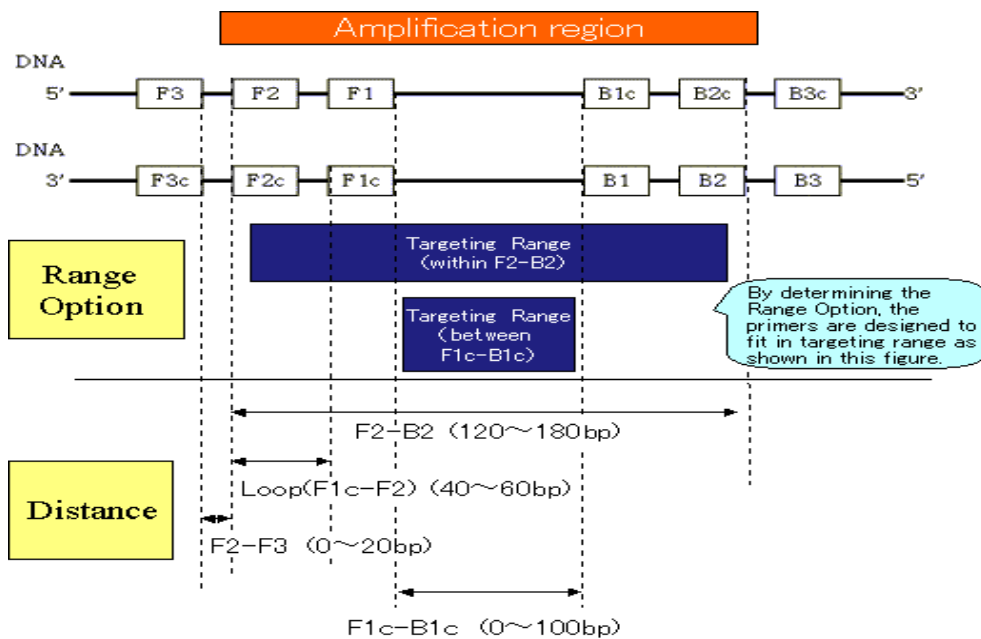
být cca 40 - 50% GC bází. Naopak je – li sekvence bohatá na AT báze, tak by obsah GC v primeru měl být cca 50 - 60%.

3'konec primeru by neměl obsahovat mnoho AT bází či být komplementární k jiným primerům. Je to důležité, zejména u vnitřních primerů, aby se netvořily sekundární struktury. Konec primerů slouží jako výchozí bod pro syntézu DNA, a proto musí mít určitý stupeň stability. 3'konce F2, B2, F3, B3 a LF, LB a 5' konec F1c, B1c jsou navrženy tak, aby volná energie byla nižší než -4 kcal / mol.

Teplota tání ( $T_m$ ) pro oblast primerů by měla být cca 60 - 65 ° C v případě bohatých na GC, a 55 - 60 ° C v případě bohatých na AT. Současně by  $T_m$  F1c a B1c měla být vyšší než  $T_m$  smyčkové struktury F2 a B2.  $T_m$  se odhaduje pomocí metody nejbližších sousedů (Nearest-Neighbor). Tato metoda je v současné době považována za aproximační metodu, která udává hodnotu nejbližší skutečné hodnotě.  $T_m$  je určena pro každou oblast pro F1c a B1c, přibližně 60 ° C (64 - 66 ° C), přibližně 60 ° C (59 - 61 ° C) pro F2, B2, F3 a B3 a přibližně 65 ° C (64 - 66 ° C) pro smyčkové primery.

Primery jsou navrženy tak, aby vzdálenost od konce F2 po konec B2 (amplifikovaná oblast) byla mezi 120 - 160 bází. Vzdálenost od 5' konce F2 k 5' konci F1 (část, která tvoří smyčku) byla mezi 40 - 60 bázemi a vzdálenost mezi F2 a F3 byla mezi 0 - 60 bází (Obr. 8) (Notomi a kol., 2000; Nagamine a kol., 2001; Nagamine a kol., 2002).

Obrázek. 8: Vzdálenosti oblastí navrhovaných primerů



[https://primerexplorer.jp/e/v5\\_manual/img/03\\_ch01.gif](https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/img/03_ch01.gif)

## 2.4.4 Vyhodnocení LAMP

Prvotní posouzení amplifikace je možné vizuální detekcí zákalu pyrofosforečnanu hořečnatého pouhým okem. Po přidání interkalačního činidla do směsi lze pozorovat fluorescenci vzorku pod UV světlem. Další jednoduchou metodou hodnocení amplifikace je agarozová gelová elektroforéza (Parida, 2008). Mezi optické metody vyhodnocení lze zahrnout i monitorování LAMP amplifikace v reálném čase, které lze provést spektrofotometrickou analýzou pomocí turbidimetru (Mori, 2001).

Elektrochemické metody jsou rychlejší, jednodušší a mají nižší náklady, proto se velká část studií zaměřuje na využití voltametrie pro sledování LAMP reakce, použitím např. metody monitorování elektrochemickými senzory / čipy či elektrochemickými biosenzory (Zhang a kol., 2014)

### 2.4.4.1 Turbidimetrie

LAMP lze v reálném čase sledovat i pomocí turbidimetrického měření zákalu pyrofosforečnanu hořečnatého. Turbidimetr detekuje vedlejší produkt syntetické reakce DNA, pyrofosfátové ionty jako nerozpustný pyrofosforečnan hořečnatý. Z tohoto důvodu je možné určit vztah mezi množstvím amplifikované DNA a zákalu měřenou turbidimetrem v reálném čase. Mezi naměřeným zákalem a množstvím syntetizované dsDNA naměřenou pomocí turbidimetru je lineární vztah. Jinými slovy, křivka turbidity versus čas získaný použitím turbidimetru v reálném čase představuje reakční křivku amplifikace LAMP. Turbidimetr lze také použít pro analýzu kinetiky LAMP reakce. Turbidimetrie nezávisí na sekvenci amplifikovaného produktu, takže není možné provádět multiplexní detekci, která se provádí na real-time PCR přístroji pomocí fluorescenčních sond. Na rozdíl od fluorofotometrie v reálném čase, která měří postupné zvyšování intenzity signálu, je snadnější získat stabilní základní hodnotu turbidimetrie v reálném čase, která měří pokles intenzity signálu. Tato nová metoda pro kvantifikaci nukleových kyselin využívá výhod dvou důležitých vlastností metody LAMP. Vysoké specifčnosti, která eliminuje potřebu kontrolovat amplifikovaný produkt a snadnost s jakou může turbidimetrie detekovat amplifikovaný produkt. (Mori a kol., 2001, 2004)

#### **2.4.4.2 Elektroforéza**

Elektroforéza patří mezi nejdůležitější metody biochemických analýz. Rozděluje fragmenty DNA, RNA nebo bílkovinné molekuly podle relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje (Sambrook a kol., 1989).

Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě-anodě (Šmarda a kol., 2005).

Pro vizualizaci DNA fragmentů se nejčastěji používá značení interkalačním činidlem (SYBR Green, ethidium bromid).. Pro detekci fluorescence interkalačního činidla lze použít UV záření v přístroji zvaném transluminátor. Jedná se o levný způsob detekce, avšak nevýhodou je její relativně vysoká časová náročnost, probíhá až po skončení LAMP a výsledný produkt nelze kvantifikovat ani kvalifikovat. Vzhledem k velké amplifikaci při této metodě vzniká velké riziko kontaminace při nanášení na gel (Freeman a kol., 2002).

#### **2.4.4.3 Real-time LAMP**

Detekce Real-time LAMP je založena na přítomnosti fluorescenčního substrátu, který se váže na přítomnou DNA. Fluorescence je vyzařovaná substrátem až po jeho navázání na DNA. Hladina fluorescence substrátu navázaného na DNA je detekovaná detektorem a odráží množství přítomné DNA. Jako zdroj fluorescence se používá SYBR green. Pro Real-time LAMP se využívají speciální cyclery, které se používají u real-time PCR nebo speciální přenosné přístroje (Aoi, 2006). Na trhu už je dostupných několik přístrojů, které jsou i přenosné. Jsou to například Genie II a III (Optigene,UK), Bioranger, Smart-DART (Diagenetix, USA) nebo ESEQuant TS2 (Qiagen, DE) (Tomlinson, 2013).

### **2.4.5 Real-time Platformy**

#### **2.4.5.1 Smart-DART<sup>TM</sup> a Bioranger<sup>TM</sup> platformy (Obr. 9)**

Tyto přístroje umožňují nastavit teplotu požadovanou pro LAMP reakci a analyzovat současně až 8 vzorků. Umí také odečítat fluorescenční signál a tím sledovat reakci v reálném čase. Zároveň detekuje dvě vlnové délky, takže ho lze využít pro duplex LAMP. Zařízení lze bezdrátově pomocí Bluetooth® připojit do zařízení se systémem Android prostřednictvím aplikace, která umožňuje uživateli ovládat nastavení reakčních

podmínek a zobrazení dat graficky v reálném čase. Platforma funguje jako uzavřený systém pro amplifikaci pomocí metody LAMP bez rizika kontaminace a využitelného i terénních podmínkách (Jenkins a kol., 2011; Keremane a kol., 2015).

Obrázek 9: Smart-DART™

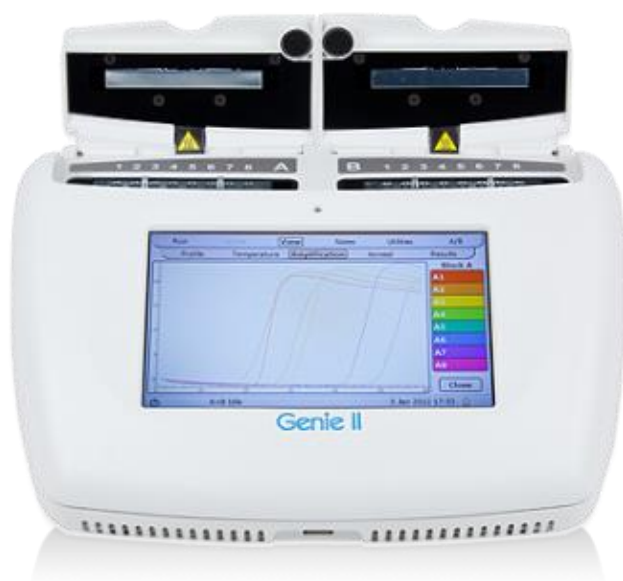


[https://c1.iggcdn.com/indiegogo-media-prodclld/image/upload/c\\_fill,f\\_auto,h\\_460,w\\_695/v1410830106/fbzle3i5a9bvero3nkuv.png](https://c1.iggcdn.com/indiegogo-media-prodclld/image/upload/c_fill,f_auto,h_460,w_695/v1410830106/fbzle3i5a9bvero3nkuv.png)

#### 2.4.5.2 Genie® II a III platformy (Obr. 10)

Přístroje se liší od těch z Diagenetix Inc. zejména v tom, že jejich ovládání neprobíhá přes mobilní aplikaci, ale pomocí zabudovaného displeje. Jsou schopné zahřát vzorky na požadovanou teplotu a tím umožnit průběh reakce. Záznam reakce v reálném čase probíhá také na principu odečítání fluorescence. Přístroje Genie® II mají 2 oddělené bloky každý po 8 slotech pro vzorky, takže lze najednou zpracovávat až 16 vzorků. Přístroje Genie® III jsou přizpůsobené více na práci v terénu a mají slot pouze na 8 vzorků. Na rozdíl od Genie® II umí číst při dvou vlnových délkách, takže s ním lze provádět duplex LAMP. Ovládání přístroje stejně, jako sledování průběhu reakce lze na zabudovaném dotykovém displeji. Platformy lze připojit k počítači pomocí USB, Bluetooth® a WiFi. Pro polní provádění LAMP je výhodou Genie® III i zabudovaná GPS (Hu, 2018; Bühlmann, 2013; Tomlinson, 2010, 2013).

Obrázek 10: Genie® II



<https://cdn3.volusion.com/vzdbp.ddhur/v/vspfiles/photos/GEN2-01-2.jpg?1411726402>

#### 2.4.5.3 ESEQuant TS2 platforma (Obr. 11)

Tento přístroj od firmy Qiagen má stejná specifika jako ostatní přístroje. Je možná amplifikace při jedné teplotě pro 12 vzorků- Má vestavěný dotykový displej, 4 USB výstupy a Bluetooth®. Jeho největší výhodou je v čtení 6 vlnových délek. Na této platformě je možné optimalizovat multiplex LAMP pro až 6 vzorků (Yang a kol., 2017).

Obrázek 11: ESEQuant TS2



[https://detector.lateralflowreader.com/wp-content/uploads/sites/10/2017/07/qiagen\\_t2.png](https://detector.lateralflowreader.com/wp-content/uploads/sites/10/2017/07/qiagen_t2.png)

### 3 Cíle a hypotézy

Tato práce byla zaměřena na dva hlavní cíle:

1. Optimalizace metody LAMP pro detekci karanténních bakterií rodu *Xanthomonas* patogeních pro rajče a papriku.

Díličními cíli bylo navrhnout tři samostatné postupy pro specifickou detekci druhů (*X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. euvesicatoria*) a optimalizovat je pro platformu, kterou lze využít k detekci v terénu.

2. Optimalizace metody LAMP pro detekci houby *F. circinatum* způsobující pryskyřičnou rakovinu borovic.

Cílem bylo navrhnout sekvenčně specifickou asimilační sondu pro detekci druhu *F. circinatum* a implementovat ji pro terénní detekci na přenosné platformě.

#### *Hypotézy:*

- Metoda LAMP je proti jiným molekulárně biologickým metodám přenosná do prostředí a nevyžaduje nákladné vybavení.
- Existují vhodné geny pro vytvoření specifických systémů detekce přístupem LAMP.
- Díky vysoké sensitivitě je možné detekovat latentního původce onemocnění.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 *Xanthomonas* spp. patogenní pro rajče a papriku

Optimalizovány byly tři samostatné detekční postupy pro *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* a *X. gardneri*.

#### 4.1.1 *Xanthomonas vesicatoria*

##### *Bioinformatická analýza*

Pro „in silico“ návrh primerů byly použity částečné sekvence DNA genů *Xanthomonas vesicatoria* z databáze GenBank (NCBI) (Tab. 1). Všechny sekvence byly testovány v programu Mfold (Zuker, 2003), kde byla zjištěna pravděpodobnost tvoření sekundárních struktur. Návrh primerů z vybraných sekvencí probíhal v programu PrimerExplorer verze 5 za předem definovaných podmínek. Nejdůležitější je dodržet ideální poměr G a C bází mezi 50 - 60%, vzdálenost mezi primery, stabilitu na konci primerů a optimální teplotu tání primerových oblastí mezi 59 – 65°C. Primery také nesmí tvořit žádné sekundární struktury.

Po navržení byly primery nejdříve po jednom porovnávány s databází GenBank (NCBI) pro zjištění teoretické specifity pro *X. vesicatoria*. K laboratorním analýzám byly vybrány pouze primery, které měly největší předpoklad pro specifickou detekci bakterie *X. vesicatoria* a co nejnižší předpoklad detekce ostatních bakterií. Vnější primery F3 a B3 byly „in silico“ otestovány v programu In silico PCR amplification (Bikandi a kol., 2004).

Tabulka. 1: genové sekvence *Xanthomonas vesicatoria* použité pro návrh primerů

Pořadí	Zkratka genu	Název genu	Velikost v bp	Accession číslo
1	<i>rpoB</i>	<i>RNA polymerase beta subunit</i>	613	HM470000.1
2	<i>rpoD</i>	<i>RNA polymerase sigma factor</i>	870	EU499099.1
3	<i>atpD</i>	<i>ATPase beta subunit</i>	753	KM198924.1
4	<i>gyrB</i>	<i>DNA gyrase B gene</i>	530	EU007519.1
5	<i>irp</i>	<i>The leucine-responsive regulatory protein</i>	460	AY227435.1
6	<i>lepA</i>	<i>GTP-binding protein gene</i>	390	KM492632.1
7	<i>lacF</i>	<i>ABC transporter sugar permease gene</i>	408	KM492529.1
8	<i>gltA</i>	<i>Citrate synthase gene</i>	501	KM492245.1
9	<i>gapA</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene</i>	443	KM492116.1
10	<i>fusA</i>	<i>Translation elongation factor G gene</i>	591	KM491976.1
11	<i>fyuA</i>	<i>TonB-dependent receptor gene</i>	698	EU498855.1
12	<i>hrpB</i>	<i>HrpB gene</i>	340	KF994843.1
13	<i>copB</i>	<i>Copper resistance protein B gene</i>	501	HM626587.1
14	<i>copA</i>	<i>Copper resistance protein A gene</i>	779	HM626539.1
15	<i>copL</i>	<i>Copper resistance protein L gene</i>	340	HM623168.1
16	<i>dnaK</i>	<i>Heat shock protein gene</i>	762	EU015307.1
17	<i>efp</i>	<i>Elongation factor P gene</i>	387	GU322634.1
18	<i>groEL</i>	<i>Molecular chaperone gene</i>	213	FJ971165.1
24	<i>xopE2</i>	<i>Xanthomonas outer protein E2 gene</i>	1077	HM125708.1

#### Laboratorní testování

K analýzám a testování specificity byly použity bakteriální druhy *X. vesicatoria* a ostatní příbuzné bakterie patogenní pro rajče a papriku ze sbírek BCCM/LMG, CCM, DSMZ aj. (Tab. 2). Všechny kmeny byly kultivovány při 28 °C po dobu 1 až 3 dnů na umělé živné půdě MPAg (masopeptonovém agaru s glukosou: 40 g živného agaru, 2,5 g kvasničného autolyzátu, 10 g glukózy, 20 g agaru, doplněno dH<sub>2</sub>O do 1 litru, pH upraveno na 7,2). DNA z čerstvě narostlých bakteriálních kultur byla vyizolována pomocí komerčně dostupného kitu Genomic mini (A&A Biotechnology). Vlastní izolace byla provedena podle protokolu přiloženého výrobcem. Vyizolovaná DNA byla uchovávána při teplotě -20°C.

Z důvodu finanční úspory byla pro každou sadu primerů provedena PCR s primery F3 a B3. Reakční směs PCR byla připravena do celkového objemu 15 µl v následujícím složení: 7,5 µl PPP MasterMix Combi (Top-Bio, ČR), 4,5 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O, 1



μl templátové DNA a 1 μl každého z primerů (10 pmol/μl) Program PCR se skládal z úvodní denaturace při 95°C trvající 5 minut. Následně proběhlo 35 cyklů denaturace při 94°C trvající 1 minutu, annealingu při 58°C po dobu 40 sekund a elongace při 72°C po dobu 1 minuty. Celý program byl zakončen elongací při 72°C po dobu 15 minut. Po dokončení programu byly vzorky zchlazeny a udržovány při 4°C.

Optimalizace všech primerů probíhala v gradientovém ředění koncentrací MgSO<sub>4</sub>. Reakční směsi pro metodu LAMP byly připraveny v celkovém objemu 20 μl v následujícím složení: 1,6 μM primeru FIP; 1,6 μM primeru BIP; 0,2 μM primeru F3; 0,2 μM primeru B3; 1,4 mM dNTPs; 0 - 5mM MgSO<sub>4</sub>, 5mM betainu, 3,2 μl templátové DNA, 8 U GspM2.0 DNA polymerázy, 2 μl 10X reakčního pufru a zbytek objemu byl doplněn sterilní destilovanou H<sub>2</sub>O. Amplifikace probíhala v termocycleru při 65°C po dobu 30 – 60 minut s následnou závěrečnou denaturací při 90°C. Po amplifikaci bylo do vzorků přidáno interkalační činidlo ethidium bromid. Proběhla elektroforetická separace fragmentů na 1% agarózovém gelu s 0,5X TBE po dobu 80 minut při 4 V/cm. Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení InGenius3.

Specifické primery byly použity pro real-time LAMP. Reakční směsi byly stejné jako při klasické LAMP s výjimkou odlišného způsobu barvení DNA. Namísto ethidium bromidu bylo použito interkalační činidlo SYBR Green, které bylo v koncentraci 1X obsaženo přímo v reakční směsi. Optimalizovaná sada primerů byla převedena na platformu Smart-DART (Diagenetix, USA), kterou lze použít i v terénu.

Tabulka 2: Bakterie použité při testování specifity

Bakterie	Číslo sbírky	Sada primerů	
		XvcopL	Xvefp2
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CCM 2102	+	+
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	BCCM/LMG 918	-	-
<i>Xanthomonas gardneri</i>	DSMZ 19127	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI 9223	-	-
<i>Erwinia amylovora</i>	CCM 1133	-	-
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	BCCM/LMG 5727	-	-

BCCM/LMG = Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, CCM = Česká sbírka mikroorganismů v Brně, CRI = sbírka Výzkumného ústavu rostlinné výroby, DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

### 4.1.2 *Xanthomonas gardneri*

#### *Bioinformatická analýza*

Primery pro LAMP analýzu byly navrženy *in silico* v programu Primer Explorer V5 (Tab 3). Použity byly sekvence získané z databáze NCBI. Následně byly porovnány v programu MEGA software, kde byly zjištěny odlišnosti v genu *atpD* bakterie *Xanthomonas gardneri* od ostatních xantomonád (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*). Specifita primerů byla testována v databázi NCBI programem BLAST.

Tabulka 3: sada primerů pro dektekci *X. gardneri*

Název primeru	Sekvence (5' - 3')
Xg_F3	CGGTGATGGCGTGGTG
Xg_B3	TCTTCGTACGACGGTGCA
Xg_FIP	GGCGCGCTCGGTATTGGTGTTCGCGCTCGGCTCCAC
Xg_BIP	GACGCTGGGCCGCATCATTGGTCCGAGGCCTGCA
Xg_LB	GCCCGATCGACGAAGCC

#### *Laboratorní testování*

Bakteriální kmeny (Tab. 4) byly získány ze sbírek: Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms – Bacteria Collection, Gent (BCCM/LMG), French Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Beaucouze Cedex (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes – CFBP), Czech Collection of Microorganisms, Brno (CCM), Crop Research Institute Collection, Prague – Ruzyně (CRI) Deutsche Sammlung Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Germany and National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK, York (NCPPB). Všechny bakterie rodu *Clavibacter* byly pěstovány na nutrient broth yeast extract (NBY) (Schaad a kol., 2001) při 27°C po dobu 3 až 7 dnů, v závislosti na poddruhu. Další bakterie byly kultivovány na médiu MPAg (meat-peptone agar with glucose: 20 g živného agaru č. 2, 2,6 g kvasnicového extraktu, 5 g glukózy, 10 g agarózy - zajišťující pevný povrch, přidáno do 500 ml destilované H<sub>2</sub>O, pH upravené na 7,2 pomocí 1 M NaOH) při 28°C po dobu 24–48 hodin.

100 mg čerstvě narostlých kultur bylo odebráno pomocí bakteriální kličky pro izolaci DNA pomocí NucleoSpin® Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Germany). Postupováno bylo dle protokolu doporučeném výrobcem. Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla testována na BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu, Japan).

Tabulka 4: Bakterie použité při testování specifity

Bakteriální kmeny	Zkratky sbírek	Číslo sbírky	Kultivační médium	Růstová teplota (°C)	Doba kultivace (dni)
<i>Xanthomonas gardneri</i>	DSMZ	19127	MPAg	28	1-2
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	BCCM/LMG	921	MPAg	28	1-2
<i>Xanthomonas perforans</i>	DSMZ	18975	MPAg	28	1-2
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG	920	MPAg	28	1-2
<i>Erwinia amylovora</i>	CRI	312/97	MPAg	28	1-2
<i>Burkholderia glumae</i>	BCCM/LMG	20138	MPAg	28	1-2
<i>Clavibacter michiganensis</i> susp. <i>michiganensis</i>	CRI	1075	NBY	27	3-7
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	NCPPB	3467	NBY	27	3-7
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CCM	4073	MPAg	28	1-2
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI	8119	MPAg	28	1-2
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NCPPB	2505	MPAg	28	1-2

Pro potvrzení specifčnosti testu LAMP pro detekci *X. gardneri* byla provedena PCR se sadou vnějších primerů (F3 a B3). Reakční směs 25 µl PCR obsahovala 1 µl genomové DNA (10 ng/µl), 12,5 µl Mater mixu PPP (TopBio, CZ), 1 µl každého primeru (F3 a B3) a 9,5 µl H<sub>2</sub>O. Podmínky amplifikace byly následující: úvodní denaturace při 95°C po dobu 5 minut; následované 30 cykly opakující se denaturace při 94°C po dobu 1 minuty, nasedání primerů při 58°C po dobu 40 s a elongace při 72°C po dobu 30 s a finální elingace při 72°C po dobu 10 minut. LAMP v reálném čase

Reakce LAMP byla prováděna v QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR systému (ThermoFisher, USA). Reakční směs obsahovala 12,5 µl izotermálního master mixu (Optigene, Sussex, UK), 0,2 µM každého z vnějších primerů (F3 a B3), 1,6 µM každého z vnitřních primerů (FIP a BIP), 0,4 µM smyčkového primeru (pouze LoopB) a 1 µl SybrGreen (10000x v DMSO). Nakonec byly přidány 3 µl templátové genomové DNA

(10 ng/μl) a zbývající objem byl upraven na konečný objem 25 μl pomocí H<sub>2</sub>O. Reakční směsi LAMP byly inkubovány po dobu 30 minut při 65°C v PCR systému QuantStudio™ 6 Flex Real-Time, následovalo zahřívání při 98°C po dobu 2 minut pro ukončení reakce. Všechny testy LAMP prováděné pro účely screeningu byly replikovány alespoň dvakrát a všechny experimenty obsahovaly negativní kontroly (bez templátu).

Reakční produkty LAMP a produkty PCR (5 a 10 μl) byly podrobeny elektroforéze na 1,5% agarózovém gelu připraveném z 1 x TBE pufru (Tris / Borate / EDTA: 89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8.3) obarvené ethidiumbromidem (SigmaAldrich, USA) při 90 V (4 V/cm) po dobu 1 hodiny. 100 bp ladder (NEB, UK) byl použit pro vzorky PCR a DirectLoad™ Wide Range DNA Marker pro vzorky LAMP jako vzor pro porovnání molekulové hmotnosti. Aby se zabránilo kontaminaci mezi vzorky, byly pro extrakci DNA a pro přípravu reakční směsi použity různé laboratoře, pro čištění povrchů byla použita PCR Clean™ (Minerva Biolabs, DE) a byly použity pouze filtrované špičky. Po elektroforéze byl gel vizualizován pod UV osvětlením GeneSys (Syngene, UK).

Kolorimetrické reakce LAMP byly prováděny v objemu 25 μl obsahujícím 1,6 μM každého z vnitřních primerů FIP a BIP, 0,2 μM každého z vnějších primerů F3 a B3, 0,4 μM primeru loopB, 12,5 μl 2X colorimetric LAMP Master Mix (kat. Č. M1800, New England Biolabs) a 5 ul DNA templátu (10 ng/μl). Reakce byly inkubovány při 65°C po dobu 15 a 30 minut v tepelném bloku před zaznamenáním výsledků.

Jako templát pro test citlivosti *X. gardneri* od 10 ng do 10 fg byly použity sériové 10násobné ředění. Specifičnost byla testována na *Xanthomonas* spp. a další příbuzné bakterie patogenní pro rajčata a papriky (Tab. 3). V každém běhu LAMP byla zahrnuta kontrola bez templátu (NC; voda).

### 4.1.3 *Xanthomonas euvesicatoria*

#### *Bioinformatická analýza*

Na základě software, který dokáže typizovat unikátní úseky z genomových sekvencí DNA, byl vybrán úsek 330 bp, pro který byly navrženy primery. V programu LAMP Designer (Optigene, UK) bylo navrženo několik primerů s různými kombinacemi. Byla vybrána jedna sada primerů, která byla syntetizována společností KRD (Tab. 5).

Tabulka 5: Sada primerů specifických pro *X. euvesicatoria*

Název primeru	Sekvence (5'-3')
Xe_F3	ACAAATGCGGTGAGTACG
Xe_B3	GCTATCCGATAAGCTGTTGT
Xe_FIP	ATGCTTGGTAGCGAACCTCGCCGACCAAGATCACGATG
Xe_BIP	CACACGAAAATATCGCGCAGATTCGCATGTAGCTAGATCCA
Xe_LF	CGTGAAAAACGAGAGAGAAGC
Xe_LB	ACGATAAGATCCAGGAACCTTG

#### *Laboratorní analýza*

Bakteriální kmeny pro optimalizaci metody byly použity stejně jako u optimalizace LAMP pro *X. gardneri* (Tab. 3). Pro ověření detekovatelnosti přímo z rostlin bylo 50 rajčat a paprik napěstováno v testovací komoře Sanyo MLR-351H (Schoeller, CZ) při 24 °C a vlhkosti 72% po dobu 4 týdnů. Inokulační metoda byla zvolena pomocí páráték. Způsob inokulace byl převzat z metodiky INSTA (2015). Dva nejmladší plně vyvinuté listy byly propíchnuty v oblasti kolem hlavní žilnatiny sadou šesti páráték namočených v bakteriální suspenzi. Po 3 – 4 týdnech byly pozorovány příznaky infekce. Odběr infikované tkáně byl na rozhraní zdravé a infikované tkáně a rozpuštěna v 50 µl TE pufru. Izolace bakteriální DNA z čisté kultury i z rostlin byla provedena pomocí komerčně dostupného kitu NucleoSpin® Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Germany). Pro homogenizaci byl použit Retsch® Mixer Mill MM400 po dobu 4 minut při maximální frekvenci (30 Hz). Koncentrace extrahované DNA byla měřena pomocí BioSpec-nano spektrofotometru (Shimadzu, Japonsko).

Reakce LAMP byly prováděny v QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR systému (ThermoFisher, USA). Pro optimalizace nejvhodnější reakční směsi byla testována dvě různá ředění primerů (0,2 µM F3,B3, 1,6 µM FIP, BIP, 0,8 µM LF, LB a 0,2 µM F3,B3, 0,8 µM FIP, BIP, 0,4 µM LF, LB). Dále směsi obsahovaly 15 µl izotermálního master mixu (Optigene, Sussex, UK) a 3 µl templátové genomové DNA (neředěná), zbývající objem byl upraven na konečný objem 25 µl pomocí H<sub>2</sub>O. Reakční směsi LAMP byly inkubovány po dobu až 45 minut při 65 °C v PCR systému QuantStudio™ 6 Flex Real-Time, následovalo zahřívání při 98 °C po dobu 2 minut pro ukončení reakce.

Specificita reakce byla testována pro vybranou nejrychlejší reakční směs u stejných bakterií jako u optimalizace LAMP pro *X. gardneri*-(Tab. 3). Testování sensitivity bylo v pětinasobném ředění v rozmezí od 10 ng/µl do 25,6 fg/µl.

## 4.2 *Fusarium circinatum*

### *Bioinformatická analýza*

Pro specifickou detekci byl vybrán gen elongační faktor (*EF-1alfa*) (GenBank ID JN092335.1). Tento gen byl použit při návrhu primerů a sondy pro real-time PCR (Luchi a kol., 2018). Cílem bylo navrhnout sondu pro LAMP do stejné pozice jako sonda TaqMan od Luchi a kol. (2018), protože tato pozice je pro *F. circinatum* jedinečná. Nejprve byla stanovena teoretická specifita pomocí analýzy nukleotidů BLAST (NCBI). Primery byly navrženy v softwaru LAMP designer (Optigene, UK) a syntetizovány společností Eurofins (LUX). Byly navrženy čtyři primery (vnější primery F3 a B3; vnitřní primery FIP a BIP). Byly také navrženy oba primery (LoopF a LoopB). Jeden z nich (LoopB) byl fluorescenčně označen. Všechny oligonukleotidové sekvence jsou uvedeny v tabulce 6.

### *Laboratorní testování*

Všechny izoláty (Tab. 7) byly kultivovány na bramborovém dextrózovém bujónu (PDB; Difco, Detroit, MI, USA) po dobu přibližně 5 dnů. 100mg čerstvého mycelia bylo použito pro extrakci genomické DNA pomocí EZNA® Plant DNA Kitu (Omega Biotek, USA) podle pokynů výrobce. Koncentrace gDNA byla stanovena pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000™ (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Reakce LAMP (finální objem, 25 µl) byly prováděny v přenosném přístroji Genie® II (Optigene, UK) a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Science, Foster City, CA, USA). Reakční směs s asimilační sondou obsahovala 15 µl Isothermal master Mix no dye (Optigene, Sussex, UK), 0,2 µM vnějších primerů (F3 a B3), 0,8 µM vnitřních primerů (FIP a BIP) a 0,4 µM smyčkových primerů (Loop F a LoopB). Pro zvýšení specifity bylo použito fluorescenční značení loopB primeru (asimilační sonda) 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) v koncentraci 0,04 µM a zhasěče BHQ (Black Hole Quencher) v koncentraci 0,06 µM. Nakonec byly přidány 3 µl templátové genomové DNA (2,5 ng/µl) a zbývající objem byl doplněn vodou. Reakční směs pro klasický LAMP se lišila pouze v použití klasických loop primerů a isotermálního Master mixu (Optigene, Sussex, UK). Reakční směsi LAMP byly inkubovány po dobu 30 minut při 65°C na platformě Genie® II a na StepOnePlus™



byl program 30min při 65°C s fluorescencí zaznamenáváním každých 30 sekund, poté následovala 5 min denaturace při 80°C. Všechny experimenty LAMP obsahovaly kontroly bez templátů. Specifita LAMP byla testována pomocí různých kmenů *F. circinatum* a dalších druhů *Fusarium* spp. (Ioos a kol., 2019). Některé z nich jsou patogenní pro borovice, zatímco jiné jsou fylogeneticky blízké *F. circinatum*. Všechny testované izoláty jsou uvedeny v tabulce 7 a byly zředěny na stejnou koncentraci 2,5 ng/μl. Testování sensitivity *F. circinatum* bylo v pětinasobném ředění v rozmezí od 8,4 ng/μl do 4,352 fg/μl. Pro ověření navržené metody byly testovány vzorky infikovaného materiálu (kůra, jehlice) *Pinus radiata*. Extrakce DNA probíhala pomocí kitu, který je přenosný do prostředí (Optigene, UK).

Tabulka 6: Sada primerů a asimilační sonda pro detekci *F. circinatum*

Sekvence (5' - 3')	
<b>LAMP</b>	
<b>primery</b>	
F3	CATTGAGAAGTTCGAGAAGGT
B3	TGTCGAATGATTAGTGACTGC
FIP	TTGGTCTCGAGCGGGGTATTTGCCCATCGATTCTCC
BIP	GAGCGATGCGCGTTTCTGTAAACACGTGACGATGCG
LF	GGCACGTTTCGAGTCGTA
LB	CCTCCCATTGCCACAAC
<b>Asimilační sonda</b>	
Probe	FAM <sup>a</sup> -
strand <sup>c</sup>	ACGCTGAGGACCCGGATGCGAATGCGGATGCGGATGCCGACCTCCCATTGCCACAAC
Q strand <sup>d</sup>	TCGGCATCCGCATCCGCATTCGCATCCGGGTCCTCAGCGT - BHQ <sup>b</sup>

[<sup>a</sup>] FAM = 6-carboxyfluorescein.

[<sup>b</sup>] BHQ = Black Hole Quencher-1 (Eurofins, LUX)

[<sup>c</sup>] asimilační sonda fluorescenčně značená (podtržená část je loopB primer)

[<sup>d</sup>] Zhašecí vlákno asimilační sondy

Tabulka 7: Kmeny použité při testování specificity

Kmeny	LAMP výsledky
1 <i>F. circinatum</i>	POS
2 <i>F. begoniae</i>	NEG
3 <i>F. concentricum</i>	NEG
4 <i>F. fujikuroi</i>	NEG
5 <i>F. mangiferae</i>	NEG
6 <i>F. nygamai</i>	NEG
7 <i>F. proliferatum</i>	NEG
8 <i>F. sacchari</i>	NEG
9 <i>F. subglutinans</i>	NEG
10 <i>F. temperatum</i>	NEG
11 <i>F. thapsinum</i>	NEG
12 <i>F. verticillioides</i>	NEG
13 <i>F. fractiflexum</i>	NEG
14 <i>F. parvisorum</i>	NEG
15 <i>F. sororula</i>	NEG
16 <i>F. marasasianum</i>	NEG
17 <i>F. pininemorale</i>	NEG
18 <i>F. fracticaudum</i>	NEG
19 <i>F. avenaceum</i>	NEG
20 <i>F. incarnatum-equiseti species complex</i>	NEG
21 <i>F. sporotrichioides</i>	NEG
22 <i>F. tricinctum species complex</i>	NEG
23 <i>F. acuminatum</i>	NEG
24 <i>F. torulosum</i>	NEG
25 <i>F. graminearum</i>	NEG
26 <i>F. reticulatum negundis</i>	NEG
27 <i>F. redolens</i>	NEG
28 <i>F. culmorum</i>	NEG
29 <i>F. oxysporum</i>	NEG
30 <i>F. euwaleceae</i>	NEG

## 5 Výsledky

### 5.1 Detekce bakterií rodu *Xanthomonas* metodou LAMP

Výsledky popisují tři samostatné detekční postupy LAMP pro specifickou detekci *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* a *X. gardneri*

#### 5.1.1 *Xanthomonas vesicatoria*

Vzhledem k vysoké míře příbuznosti v rámci rodu *Xanthomonas* bylo velmi obtížné najít primery vhodné pro specifickou detekci *X. vesicatoria*. V době zpracování této problematiky se bakterie rodu *Xanthomonas* způsobující bakteriální skvrnitost rajčete dělily do tří skupin: A - *Xanthomonas euvesicatoria* (do této skupiny byla opět přiřazena dříve samostatná skupina C - *Xanthomonas perforans*), skupina B – *Xanthomonas vesicatoria* a skupina D – *Xanthomonas gardneri*) (Barak a kol., 2016).

Pro prvotní ověření specifity navržených primerů byla provedena PCR s primery F3 a B3, které mají na specifitu LAMP největší vliv. Důraz byl kladen především na to, aby nebyla amplifikována DNA pocházející z *X. euvesicatoria* (*X. perforans*) a *X. gardneri* které vykazují vysokou příbuznost s *X. vesicatoria*. Pro ověření specifity reakce byla dále používána DNA druhů *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Na základě provedených bioinformatických analýz bylo k testování vybráno 12 sad primerů, které byly pojmenovány podle bakterie, kterou detekují a genových sekvencí, z kterých vznikly, a to: XvgtA, XvfusA, XvlfacF, XvfyuA, XvxopE1, XvxopE2, XvefP1, XvefP2, XvcopL, Xvirp, XvatpD a XvlepA. Díky PCR byly vybrány pouze dvě sady primerů XvefP2 a XvcopL (Tab. 8 a 9). Pouze tyto dvě sady primerů byly specifické pro *X. vesicatoria*.

LAMP reakce byly vytvořeny v gradientovém ředění MgSO<sub>4</sub> od 3 mM do 5 mM pro obě uvedené sady primerů. U sady XvcopL nebyl mezi jednotlivými ředěními zaznamenán žádný rozdíl ve specifitě detekovaných vzorků, proto byl zvolen další optimalizační krok. Vzhledem k velkému množství DNA amplifikované metodou LAMP byl postupně snižován čas reakce z 1 hodiny na 30 min při dodržení stejné teploty čímž byla docílena pozitivního detekčního signálu pouze u *X. vesicatoria*. Pro

sadu primerů XvefP2 bylo docíleno specifické detekce *X. vesicatoria* při koncentraci MgSO<sub>4</sub> 5 mM (Obr. 12). Reakční podmínky byly následně také upraveny na 30 min při 65°C vzhledem k převodu na přenosnou platformu Bioranger kvůli rychlé detekci. Rozdíl v barvení různými interkalačními činidly nebyl vyzorován. Při vizualizaci na gelu byl použit ethidium bromid a pro real-time analýzu na platformě Smart-DART SYBR Green.

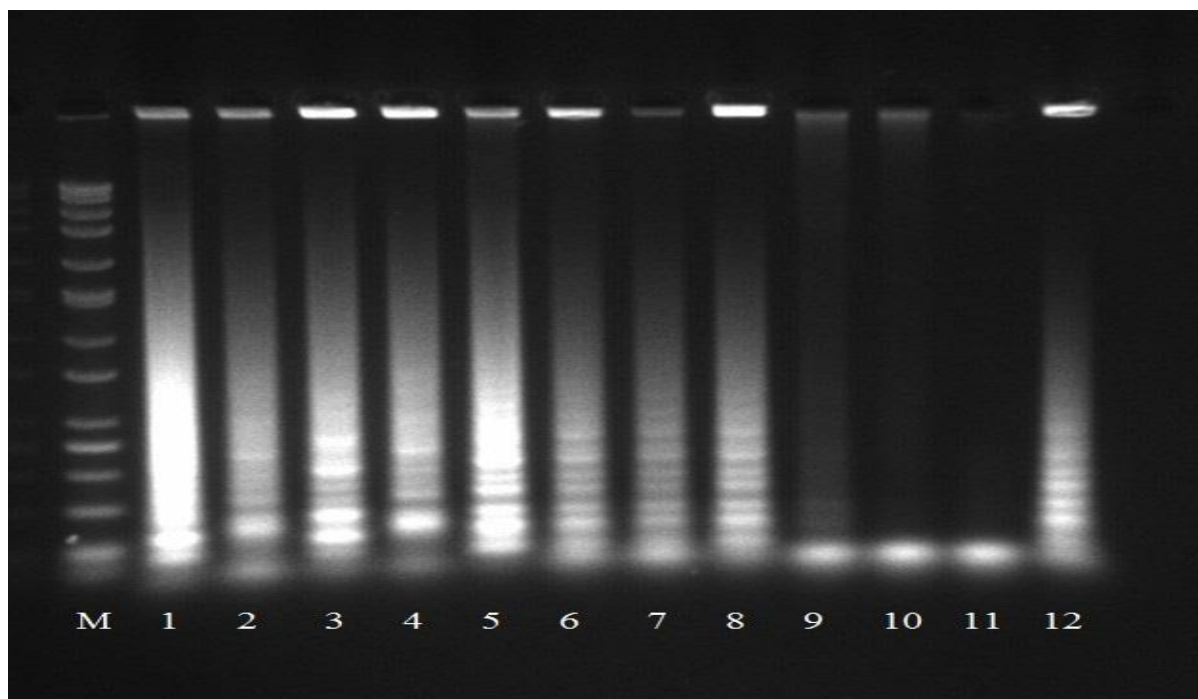
Tabulka 8: Sada primerů XvefP, která obsahuje primery F3, B3, FIP, BIP:

<b>Název primeru</b>	<b>Sekvence</b>
XvefP_F3	ACCGACATGCGTTACCTCTA
XvefP_B3	GGTCTCGGTGATCTTCAGC
XvefP_FIP	CCTTGTCGGCCTGTACCTGCATGGCGAGTACTGGCACTT
XvefP_BIP	TGGCTCAAGGGTGAGGAAGACTACGAAATTCGGTGGCTGC

Tabulka 9: Sada primerů XvcopL, která obsahuje primery F3, B3, FIP, BIP:

<b>Název primeru</b>	<b>Sekvence</b>
XvcopL_F3	ACTGCGACTGTCCGTGAT
XvcopL_B3	TCGATGTGGCATCGGGAT
XvcopL_FIP	TGACCGGGTTCATACTGACGGTCGCCATGCTCGTGCTTAA
XvcopL_BIP	GAAGAGCAGGCCAGCGAAGTATGCTCAGCACTGTGATGG

Obrázek 12: Stanovení specifity sady primerů XvefP při koncentracích MgSO<sub>4</sub> 3 mM – 5 mM pro bakterie *Erwinia amylovora* (Ea), *Pseudomonas syringae* (Ps), *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) a *Xanthomonas vesicatoria* (Xv).

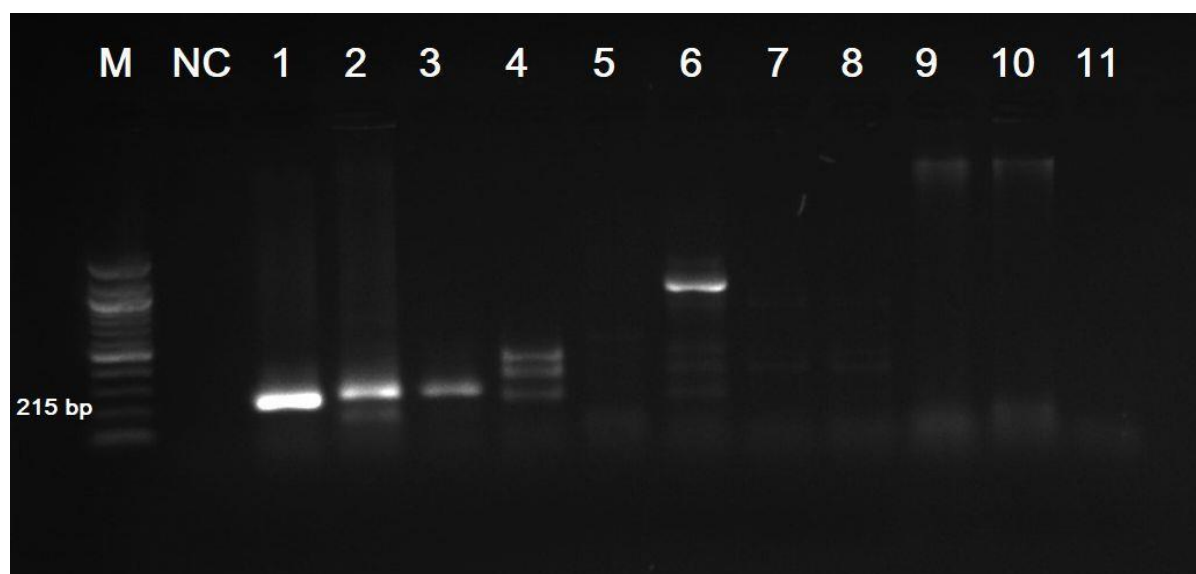


M = marker (50 - 10 000 bp) (Sigma Aldrich), 1, 5, 9 - *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) 2, 6, 10 - *Xanthomonas perforans* (Xp), 3, 7, 11 - *Xanthomonas gardneri* (Xg), 4, 8, 12 - *Xanthomonas vesicatoria* (Xv), 1-4: koncentrace MgSO<sub>4</sub>: 3mM, 5 - Xe, 6 - Xp, 7 - Xg, 8 - Xv, 5 - 8: koncentrace MgSO<sub>4</sub>: 4 mM, 9 - Xe, 10 - Xp, 11 - Xg, 12 - Xv, 9 - 12: koncentrace MgSO<sub>4</sub>: 5 mM

### 5.1.2 *Xanthomonas gardneri*

Pro návrh primerů byl vybrán gen *atpD* kvůli jeho vysoké druhové specificitě. Specificita nově navržených vnějších primerů (F3 a B3) byla nejprve testována pomocí PCR. Očekávaná velikost amplikonu byla 215 bp. Amplikon této velikosti byl viditelný pouze ve vzorcích obsahujících DNA *X. gardneri*. DNA jiných příbuzných bakterií produkovala nespecifické produkty nebo nebyla vůbec amplifikována (Obr. 13). Žádný z necílových druhů rodu *Xanthomonas*, včetně blízké příbuzných druhů *X. gardneri* nevytvořil žádný viditelný amplikon v průběhu 30 minut u LAMP v reálném čase ani u kolorimetrického LAMP (Obr. 13). Všechny testy LAMP v reálném čase byly provedeny s použitím izotermálního Master mixu v PCR systému QuantStudio™ 6 Flex real-time. Amplifikace vzorků DNA získané z *X. gardneri* byla poprvé pozorovatelná po 15 minutách (Obr. 14). Všechny reakce byly následně analyzovány na agarózovém gelu, čímž byla potvrzena specificita (Obr. 15).

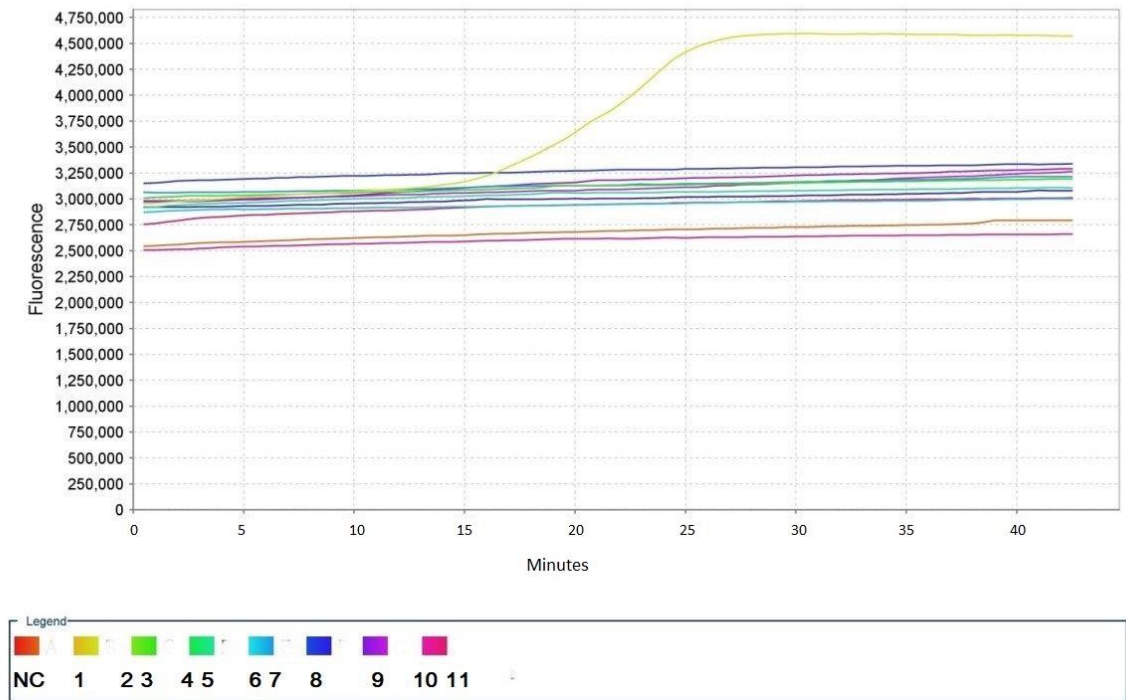
Obrázek 13: Testování specificity vnějších LAMP primerů (F3 a B3)



M – ladder 100 bp (NEB, UK), NC – negativní kontrola, 1 - *Xanthomonas gardneri* DSMZ 19127, 2 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* CFBP 8604, 3 - *Xanthomonas perforans* DSMZ 18975, 4 - *Xanthomonas vesicatoria* BCCM/LMG 920, 5 - *Erwinia amylovora* CRI 312/97, 6 - *Burkholderia glumae* BCCM/LMG 20138, 7 - *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* CRI 1075, 8 - *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB 3467, 9 -

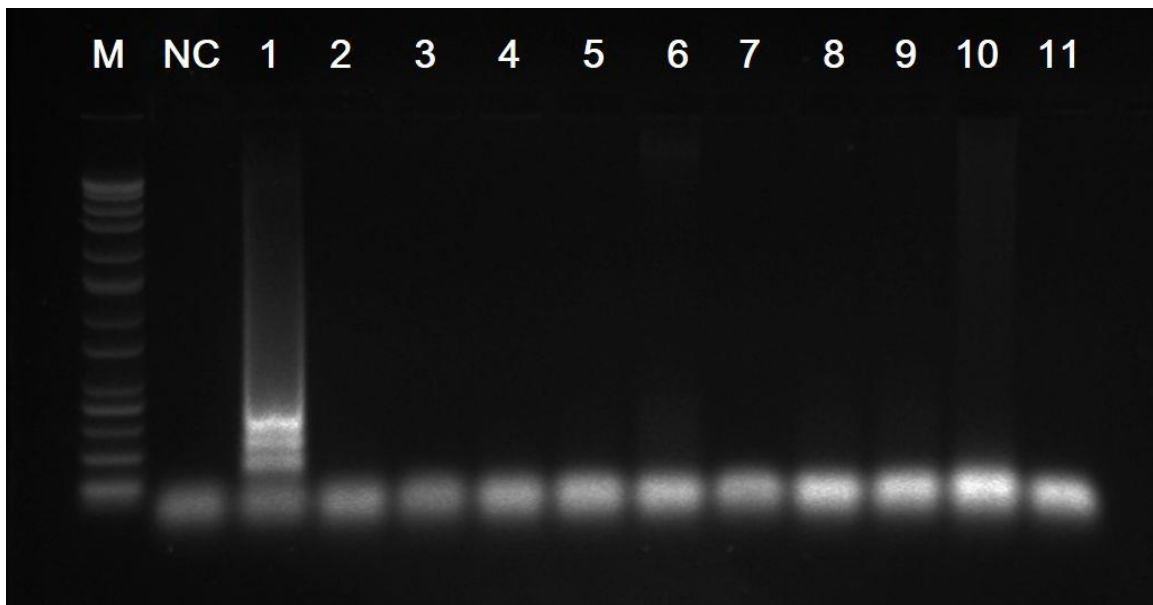
*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* CCM 4073, 10 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CRI 8119, 11 - *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2505

Obrázek 14: Specificita Real-time LAMP



NC – negativní kontrola, 1 - *Xanthomonas gardneri* DSMZ 19127, 2 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* CFBP 8604, 3 - *Xanthomonas perforans* DSMZ 18975, 4 - *Xanthomonas vesicatoria* BCCM/LMG 920, 5 - *Erwinia amylovora* CRI 312/97, 6 - *Burkholderia glumae* BCCM/LMG 20138, 7 - *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* CRI 1075, 8 - *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB 3467, 9 - *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* CCM 4073, 10 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CRI 8119, 11 - *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2505

Obrázek 15: Specificita LAMP



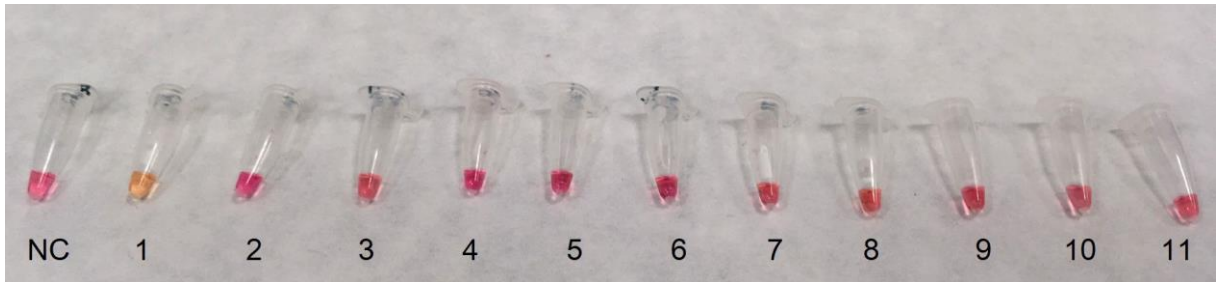
M – ladder 100 bp (NEB, UK), NC – negativní kontrola, 1 - *Xanthomonas gardneri* DSMZ 19127, 2 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* CFBP 8604, 3 - *Xanthomonas perforans* DSMZ 18975, 4 - *Xanthomonas vesicatoria* BCCM/LMG 920, 5 - *Erwinia amylovora* CRI 312/97, 6 - *Burkholderia glumae* BCCM/LMG 20138, 7 - *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* CRI 1075, 8 - *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB 3467, 9 - *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* CCM 4073, 10 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CRI8119, 11 - *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2505

Kolorimetrické testy LAMP byly prováděny s použitím 2X colorimetric isothermal LAMP Master Mix v tepelném bloku (Obr. 16). Po 15 minutách nebyla pozorována žádná amplifikace pro žádný vzorek. Po 30 minutách byla amplifikace viditelná pouze ve zkumavkách s DNA *X. gardneri*. Elektroforéza na agarózovém gelu ukázala typický žebříkový vzhled produktů LAMP.

Pro stanovení citlivosti každého testu byla použita genomická DNA zředěná na koncentrace v rozmezí od 10 ng/μl do 10 fg/μl. Do každé experimentální replikace byla zahrnuta kontrola bez templátu (voda). Prahová hodnota detekce byla 10 pg/μl pro *X. gardneri* (Obr. 17). Velmi slabá amplifikace však byla také pozorovatelná v koncentracích 100 fg/μl a 10 fg/μl (Obr. 18). Nejnižší množství bakteriální genomové DNA, které spolehlivě detekuje bakterii však bylo 10 pg/μl po 30 minutách amplifikace.

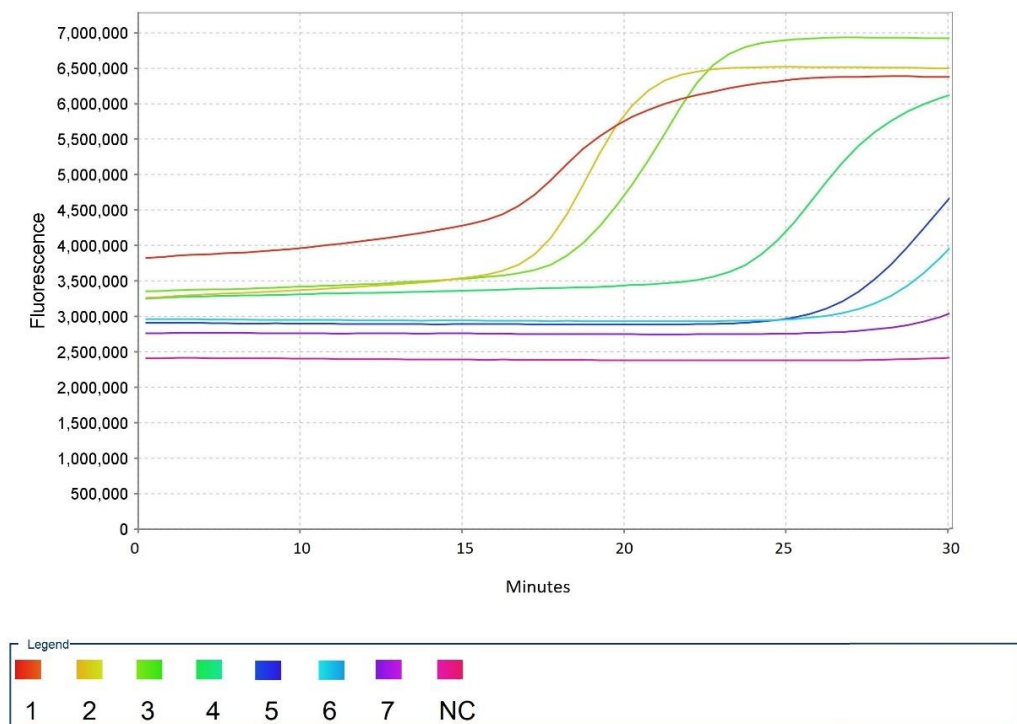


Obrázek 16: Specificita kolorimetrické LAMP



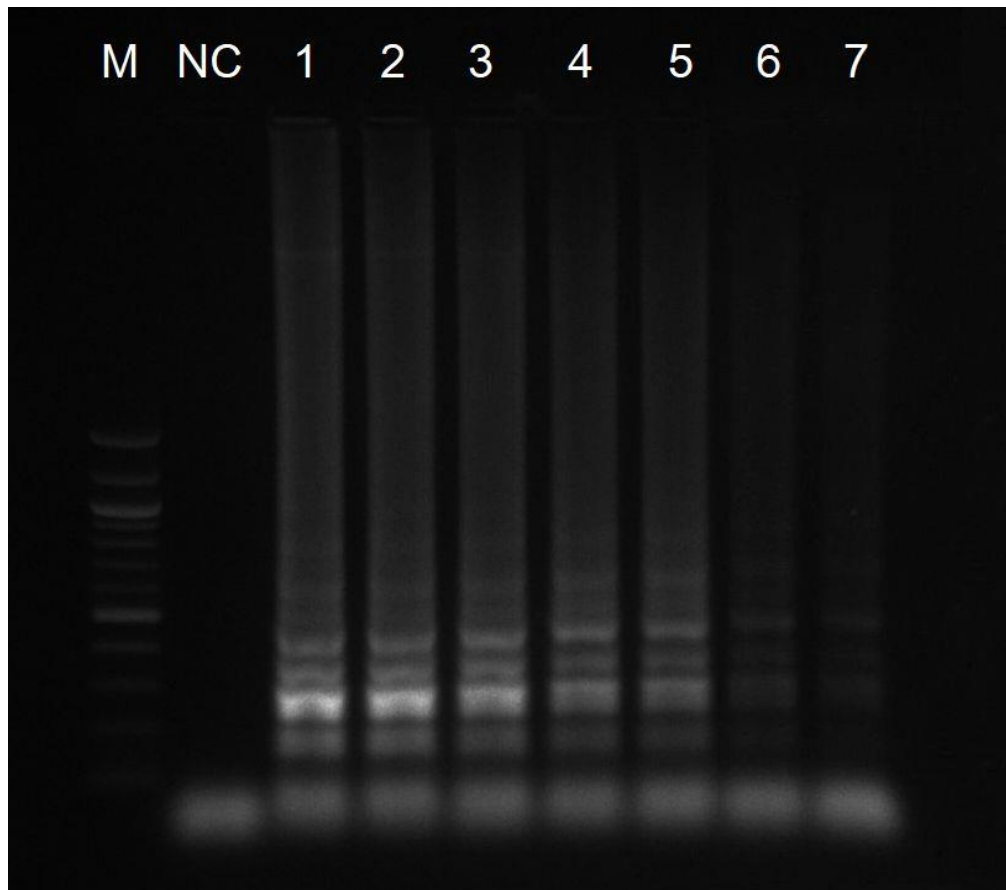
NC – negativné kontrola 1 - *Xanthomonas gardneri* DSMZ 19127, 2 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* CFBP 8604, 3 - *Xanthomonas perforans* DSMZ 18975, 4 - *Xanthomonas vesicatoria* BCCM/LMG 920, 5 - *Erwinia amylovora* CRI 312/97, 6 - *Burkholderia glumae* BCCM/LMG 20138, 7 - *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* CRI 1075, 8 - *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB 3467, 9 - *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* CCM 4073, 10 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CRI8119, 11 - *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2505

Obrázek 17: Sensitivita LAMP



NC – negativní kontrola, 1 – 10 ng/μl, 2 – 1 ng/μl, 3 - 100 pg/μl, 4 - 10 pg/μl, 5 – 1 pg/μl, 6 – 100 fg/μl, 7 – 10 fg/μl

Obrázek 18: elektroforetické zobrazení LAMP sensitivity



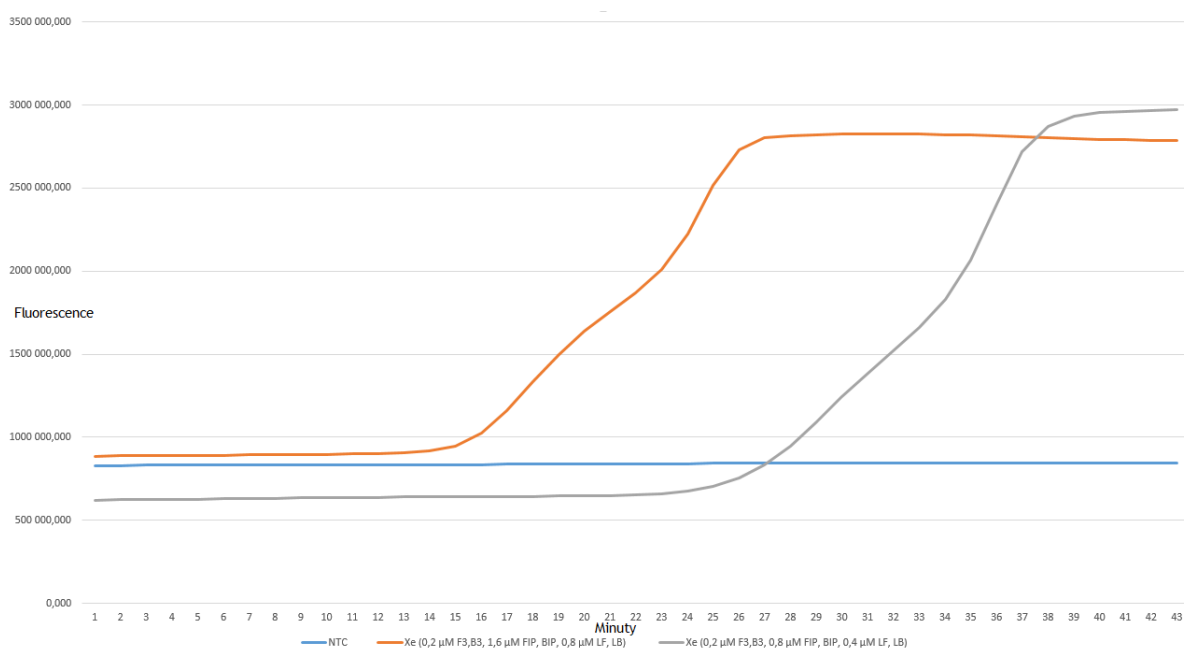
M – ladder 100 bp (NEB, UK), NC – negativní kontrola 1 – 10 ng/μl, 2 – 1 ng/μl, 3 - 100 pg/μl, 4 - 10 pg/μl, 5 – 1 pg/μl, 6 – 100 fg/μl, 7 – 10 fg/μl

### 5.1.3 *Xanthomonas euvesicatoria*

Navržená sada primerů byla testována v dvou různých kombinacích ředění primerů. Ostatní podmínky reakce byly stejné. Při koncentraci primerů 0,2  $\mu\text{M}$  F3,B3, 1,6  $\mu\text{M}$  FIP, BIP, 0,8  $\mu\text{M}$  LF, LB byl začátek nárůstu amplifikační reakce cca o 10 min rychlejší než při koncentraci primerů 0,2  $\mu\text{M}$  F3,B3, 0,8  $\mu\text{M}$  FIP, BIP, 0,4  $\mu\text{M}$  LF, LB. Při zvolení první koncentrační sady primerů je možné zajistit dostatečnou amplifikaci do 30 min, ačkoliv při optimalizaci reakce bylo použito 45 min (Obr 19). Reakce specificky detekovala pouze *X. euvesicatoria*. (Obr. 20). Citlivost reakce byla testována v pětinasobném ředění v rozmezí od 10 ng/ $\mu\text{l}$  do 25,6 fg/ $\mu\text{l}$ . Detekční limit byl stanoven na 0,128 pg/ $\mu\text{l}$  DNA v reakci (Obr. 21).

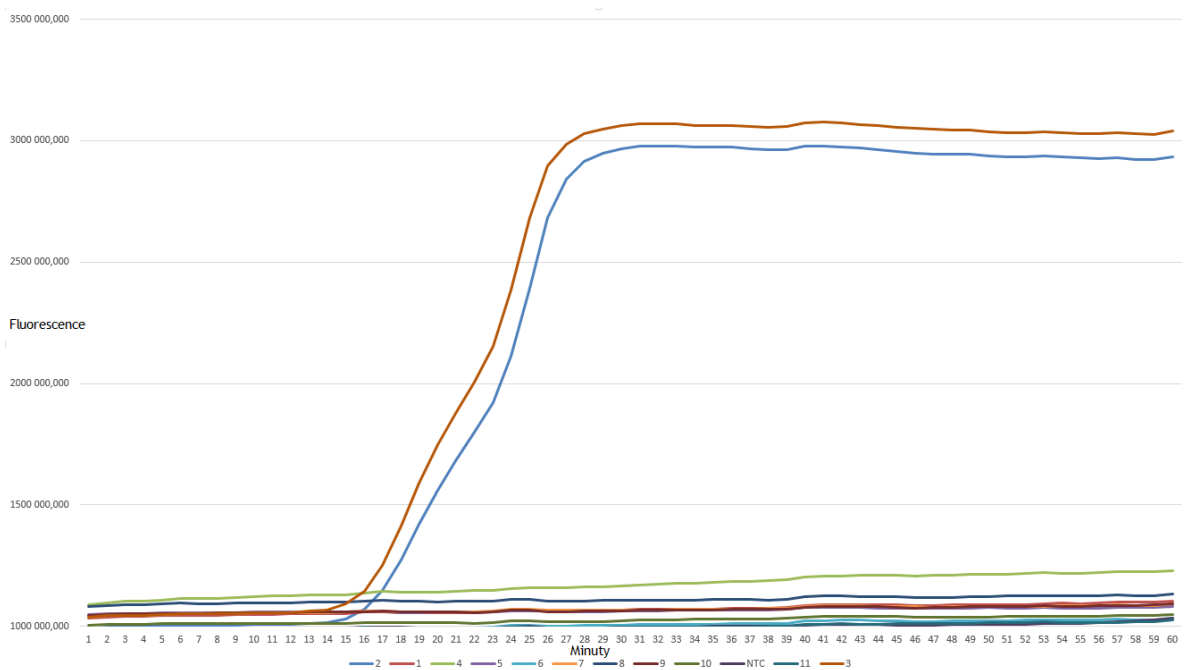
Pro ověření funkčnosti LAMP metody byla metoda testována na DNA izolované přímo z rostlin. Z 50 rostlin bylo infikováno pomocí párátok 40 rostlin a 10 bylo ponecháno neinfikovaných. 4 týdny po inokulaci byly viditelné symptomy (Obr. 22). Izolace probíhala pomocí komerčně dostupného kitu NucleoSpin® Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Germany), kde jsme schopni získat DNA ve velmi krátkém čase (cca 20 min). Takto vyizolované DNA byla detekována později a v nižší amplifikaci než u vzorků vyizolovaných z čisté bakteriální kultury. Bakteriální DNA z neinfikovaných rostlin a DNA ostatních bakteriálních druhů nebyla detekována. (Obr. 23). Stále ale i přes znečištění způsobené např: DNA rostlin jsme schopni specificky detekovat patogen *X. euvesicatoria*. Všechny analýzy byly provedeny na přístroji QuantStudio™ 6 Flex Real-Time.

Obrázek 19: Porovnání různých koncentrací primerů



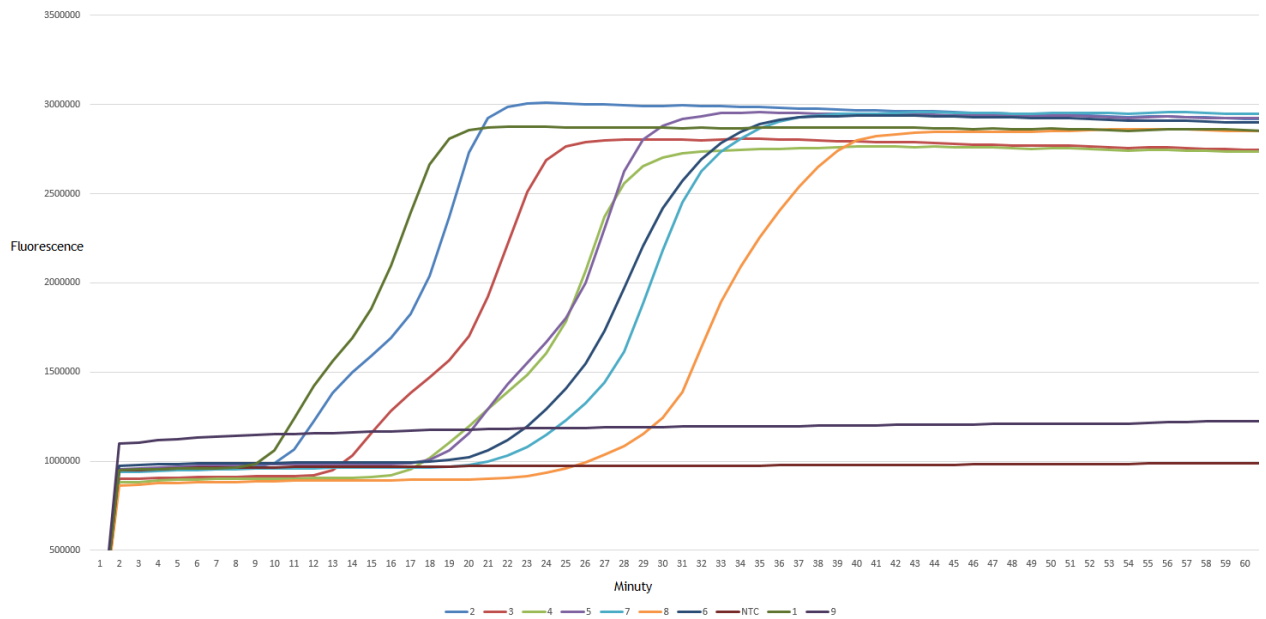
NTC modrá – negativní kontrola, Xe oranžová – Xe (0,2  $\mu\text{M}$  F3,B3, 1,6  $\mu\text{M}$  FIP, BIP, 0,8  $\mu\text{M}$  LF, LB), Xe šedivá - Xe (0,2  $\mu\text{M}$  F3,B3, 0,8  $\mu\text{M}$  FIP, BIP, 0,4  $\mu\text{M}$  LF, LB)

Obrázek 20: Specificita real-time LAMP



NTC – negativní kontrola, 1 – *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* BCCM/LMG 928 , 2 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* CFBP 8604, 3 - *Xanthomonas gardneri* DSMZ 19127, 4 - *Xanthomonas vesicatoria* BCCM/LMG 920, 5 - *Erwinia amylovora* CRI 312/97, 6 - *Burkholderia glumae* BCCM/LMG 20138, 7 - *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis* CRI 1075, 8 - *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* NCPPB 3467, 9 - *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* CCM 4073, 10 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* CRI 8119, 11 - *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2505

Obrázek 21: Sensitivita real-time LAMP (5-násobné ředění)

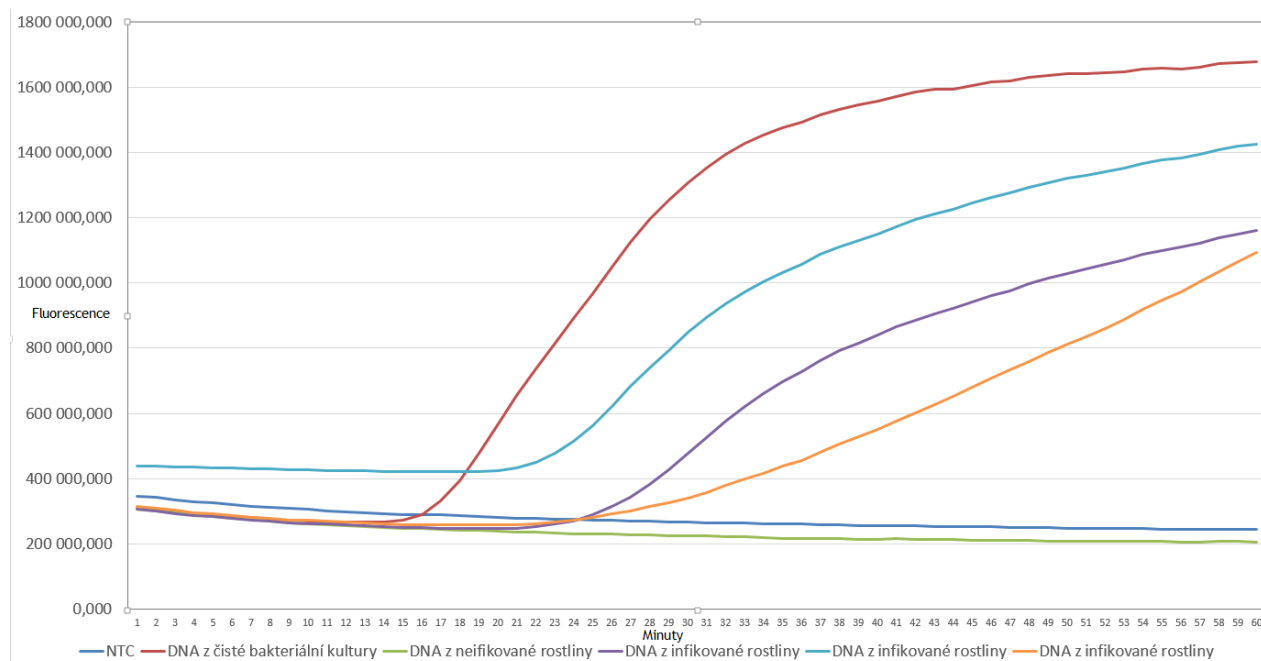


NTC – negativní kontrola, 1 – 10 ng/μl, 2 – 2 ng/μl, 3 – 0,4 ng/μl, 4 – 0,08 ng/μl, 5 – 0,016 ng/μl, 6 – 3,2 pg/μl, 7 – 0,64 pg/μl, 8 – 0,128 pg/μl, 9 – 25,6 fg/μl

Obrázek 22: Symptomy po 4 týdenní inokulaci bakterií rodu *Xanthomonas* ssp.



Obrázek 23: Real-time LAMP vzorků DNA z infikovaných rostlin



## 5.2 Detekce *Fusarium circinatum* metodou LAMP

Teoretická specificita sekvence genu *EF-1alfa* byla stanovena v databázi NCBI pro *F. circinatum*. Příbuznost se pohybovala v rozmezí 97,14 až 97,89% s *F. oxysporum*, *F. guttiforme*, *F. begonia*, *F. ananatum*, *F. fujikuroi*, *F. bulbicola*, *F. ublutinans*, *F. bactridioides*, *F. anthophilum*, *F. mexicanum*, *F. temperatum*, ale ne všechny jsou pro borovice patogenní.

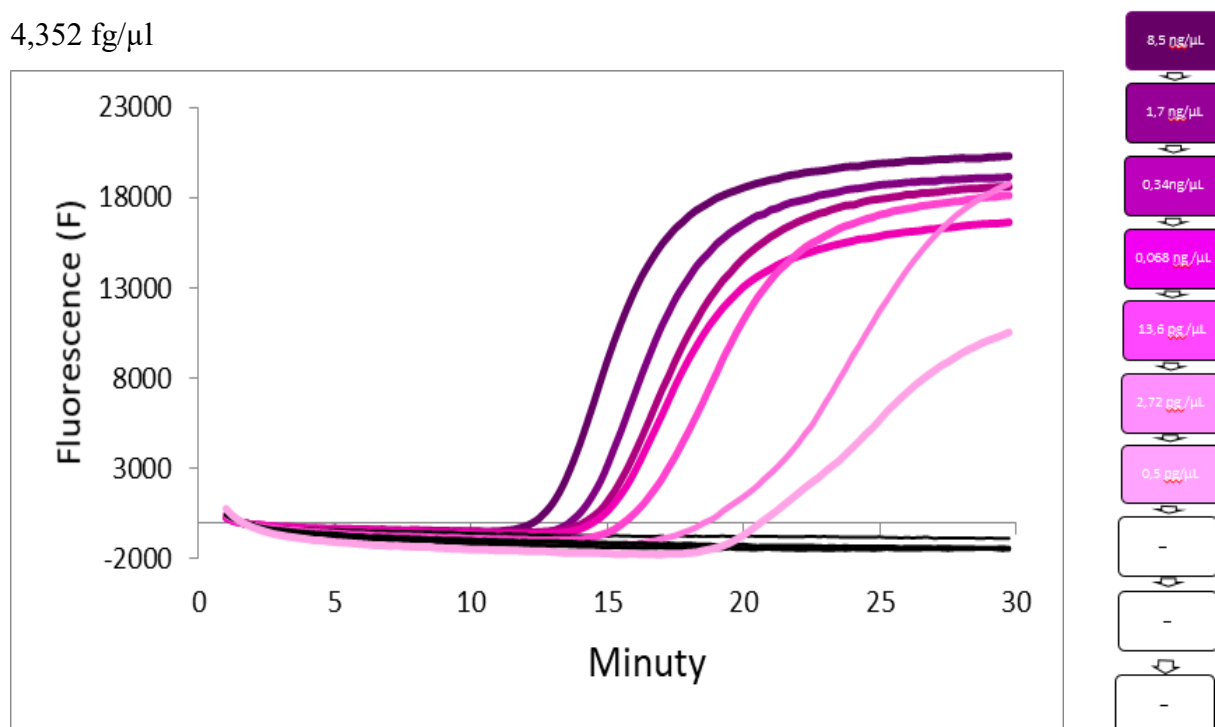
Detekční limit a sensitivita LAMP byly stanoveny amplifikací ředících řad DNA jak pro klasický LAMP tak pro LAMP s asimilační sondou o koncentraci 8,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 1,7 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 0,34 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 0,068 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 13,6 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 2,72 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 0,5 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 0,108 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 21,76 fg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 4,352 fg  $\mu\text{L}^{-1}$  extrahované ze standardních druhů. U všech standardních druhů byla tato detekční metoda schopna detekovat cílové geny do koncentrace 0,05 pg/ $\mu\text{l}$  jak pro klasický LAMP tak pro LAMP s asimilační sondou (Obr. 24).

Před testem specificity byla stanovena nejcitlivější koncentrace DNA na 2,5 ng/ $\mu\text{l}$  (Obr. 25: modré křivky). Tato koncentrace byla stanovena na základě koncentračního gradientu. Nižší koncentrace DNA (0,5 ng/ $\mu\text{l}$ ) vykazovala stejnou citlivost jako 5 ng/ $\mu\text{l}$  (Obr. 25: černé a tmavě zelené křivky). Specificita testu LAMP byla stanovena s koncentrací 2,5 ng/ $\mu\text{l}$  pro všechny vzorky. Vzorky *Fusarium circinatum* byly amplifikovány s vysokou fluorescencí (cca 25 000). Velmi nízká amplifikace (5000) byla detekována v případě *F. temperatum* (Obr. 26).

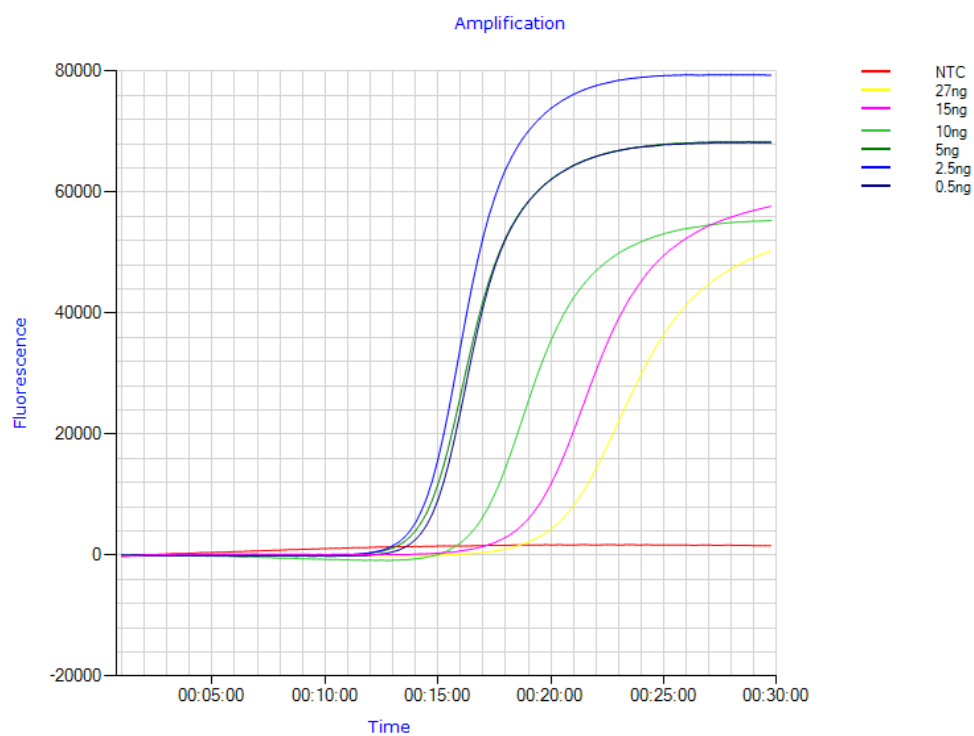
Fluorescence při reakcích se značenými primery přesáhla prahovou hodnotu po 12 min od začátku reakce, což odpovídá minimální koncentraci 2,5 ng/ $\mu\text{l}$ . Fluorescence u reakcí s neznačenými primery přesáhla prahovou hodnotu už po 9 min, ale specificita reakce byla nižší. Ačkoli LAMP reakce bez sondy byly rychleji amplifikovány, reakční specificita byla nižší.

Pomocí přenosného kitu jsme získali DNA přímo z infikovaného materiálu jehlic a kůry *Pinus radiata* ve velmi krátkém čase a bez laboratorního vybavení. 3  $\mu\text{l}$  takto vyextrahované DNA bylo použito do reakce LAMP. Všechny vzorky byly pozitivní, což nám ověřuje robustnost této metody pro použití mimo laboratoř.

Obrázek 24: Test citlivosti LAMP testu se sondou: 5 násobné ředění od 8,4 ng/μl do 4,352 fg/μl

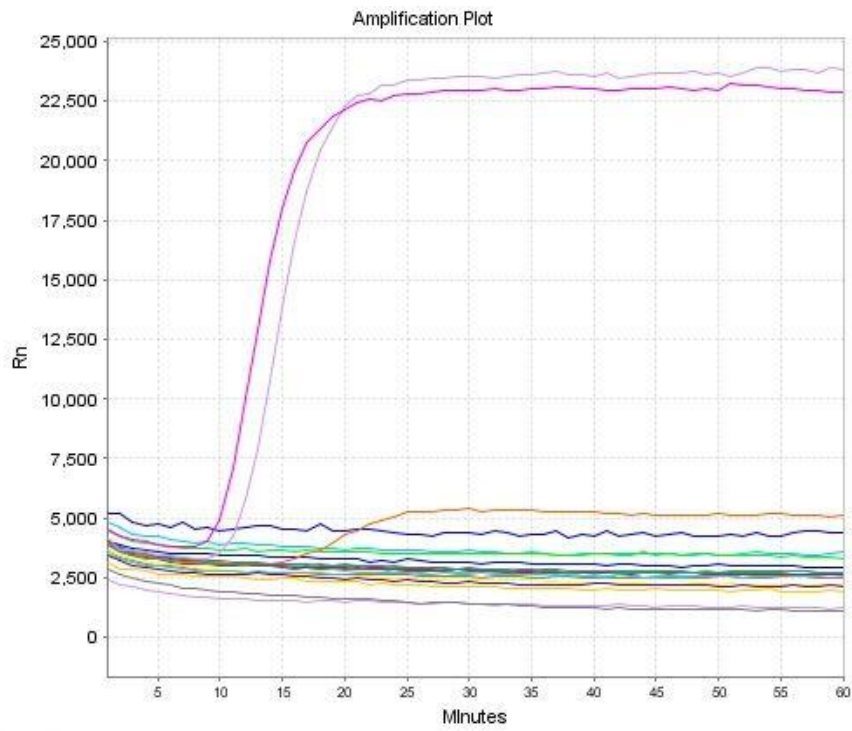


Obrázek 25: DNA koncentrační gradient 27ng/μl - 0,5ng/μl na přístroji Genie® II se sondou





Obrázek 26: Test specificity pro *F. circinatum*



## 6 Diskuse

### 6.1 Detekce bakterií rodu *Xanthomonas*

Pro detekci fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas* pro rajče a papriku byly optimalizovány tři samostatné LAMP metody pro rychlou a specifickou detekci, kterou lze použít i v terénu.

#### 6.1.1 *X. vesicatoria*

Jako první byla vyvíjena tato metoda pro detekci *X. vesicatoria*. Vzhledem k vysoké příbuznosti v rámci rodu *Xanthomonas* byl proveden výběr nejvhodnějších genů. Multilokusové sekvenční analýzy byly vhodným výchozím bodem pro výběr genových sekvencí pro následný návrh primerů. *dnaK*, *fyuA*, *gyrB*, *rpoD*, *fusA*, *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *lacF* a *lepA*, *atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *copL* aj. byly použity pro identifikaci a klasifikaci bakterií rodu *Xanthomonas* (Young a kol., 2008; Almeida a kol. 2010; Behlau a kol., 2013; Timilsina a kol. 2015; Barak a kol., 2016; Osdaghi a kol., 2018). Na základě bioinformatických analýz byly vybrány geny *efp* a *copL* pro detekci *X. vesicatoria*.

Díky online dostupnému programu Primer Explorer V4 software (<http://primerexplorer.jp/e/>) bylo možné navrhnout primery F3, B3, FIP a BIP. Tento program se hojně používá i v rámci rodu *Xanthomonas* (Bühlmann a kol., 2013; Gétaz a kol., 2017).

Vnější F3 a B3 primery byly použity při klasické PCR pro prvotní testování specificity primerů pro detekci „yellow leaf curl virus“, který je patogenní také pro rajče (Fukuta a kol., 2003). Testování F3 a B3 primerů pro detekci *X. vesicatoria* bylo též provedeno metodou PCR.

Ačkoliv Nagamine a kol. (2002) optimalizovali metodu s loop primery, které dokážou urychlit průběh reakce, testování a optimalizace LAMP reakce pro *X. vesicatoria* probíhala z důvodu urychlení analýz a snížení ceny optimalizace.

Základní komponenty reakce vycházely z první publikace LAMP metody (Notomi a kol., 2000): V celkovém objemu 25  $\mu$ l bylo obsaženo 0.8  $\mu$ M FIP a BIP, 0.2  $\mu$ M F3 a B3, 400  $\mu$ M dNTP, 1 M betainu (Sigma), 20 mM Tris–HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tritonu X-100, DNA a 8U *Bst* DNA

polymeráza (New England Biolabs). Reakce byla inkubována při 65°C po dobu 1 hodiny. Reakce pro dvě sady primerů *efP* a *copL* byla v gradientovém ředění MgSO<sub>4</sub> od 3 mM do 5 mM. Z předchozích optimalizací metod PCR víme, že různými koncentracemi hořčnatých iontů jsme schopni ovlivnit specifitu reakce (Riedel a kol., 1992). U LAMP reakce se ionty hořčiku vážou na vedlejší pyrofosfátový produkt a tvoří bílou sraženinu pyrofosfátu hořčnatého (Mori a kol., 2004).

Vyhodnocení probíhalo při optimalizaci reakce elektroforeticky použitím separací fragmentů na agarózovém gelu. Výsledné produkty ale nelze kvantifikovat ani kvalifikovat. Vzhledem k vysoké účinnosti amplifikace a produkce značného množství produktů při této metodě vzniká velké riziko kontaminace při nanášení na gel (Freeman a kol., 2002). Po optimalizaci reakce byla metoda převedena na přenosnou platformu Smart-DART (Diagenetix, USA). Platforma funguje v reálném čase jako uzavřený systém pro amplifikaci pomocí metody LAMP bez rizika kontaminace a využitelného i terénních podmínkách (Jenkins a kol., 2011; Keremane a kol., 2015).

### **6.1.2 *X. gardneri***

Použití genu *atpD*, který se podílí na regulaci syntézy ATP, pro klasifikaci bakteriálních druhů bylo rozsáhle popsáno a tento marker úspěšně určil fylogenetické vztahy mezi několika bakteriálními skupinami, včetně *Pasteurella*, *Bradyrhizobium*, *Sesbania* a *Mesorhizobium* (Petersen a kol., 2001; Weir a kol.; Vinuesa a kol. 2005; Simões a kol., 2007). V těchto analýzách vykázal gen *atpD* vyšší rozlišení, než bylo pozorováno v analýze s 16S - 23S rRNA (Gonçalves a Rosato, 2002). Na základě MLSA analýzy tohoto genu byly identifikovány čtyři bakteriální druhy patogenní pro rajče a papriku na úrovni druhů *Xanthomonas spp.* (Hamza a kol., 2010). Pro návrh primerů byl vybrán gen *atpD* kvůli jeho vysoké druhové specifitě. Specifičnost nově navržených vnějších primerů (F3 a B3) byla nejprve testována pomocí PCR, jak to doporučuje Fukuta a kol. (2003). Očekávaná velikost amplikonu byla 215 bp a amplikon této velikosti byl viditelný pouze ve vzorcích obsahujících DNA *X. gardneri*.

Reakce byla optimalizována použitím izotermálního Master mixu, který dodává firma Optigene. Tento mix obsahuje fluorescenční interkalační činidlo a nemusí se do reakce dodávat při použití pro real-time LAMP (Tomlinson a kol., 2010). Metoda pro detekci *X. gardneri* byla převedena na přenosnou platformu Smart-DART (Diagenetix, USA)

(Jenkins a kol., 2011; Keremane a kol., 2015). Použitím kolorimetrického Master mixu byl vyvinut rychlý, spolehlivý, citlivý a specifický test pro detekci viru Zika z moči nebo séra, který lze provést v klinickém nebo terénním prostředí s minimálním vybavením a technologickými znalostmi (Calvert a kol., 2017). Na základě této studie byla optimalizovaná kolorimetrická LAMP metoda pro detekci *X. gardneri*.

### **6.1.3 *X. euvesicatoria***

V průběhu řešení optimalizace LAMP metody pro specifickou detekci *X. euvesicatoria* Larrea-Sarmiento a kol. (2018) publikovali článek s řešením stejné problematiky. V této studii byl vyvinut protokol LAMP pro platformu BioRanger™ pro specifickou, citlivou, spolehlivou a robustní detekci a diferenciaci *X. euvesicatoria*, která je původcem bakteriální skvrnitosti u rajčat a paprik. Díky metodám sekvenování nové generace jsou dostupné genové sekvence tohoto druhu (Ouyang a kol., 2013). Srovnávací analýza deseti genomů blízké příbuzných patogenů získaných z veřejně dostupné databáze usnadnila identifikaci jedinečných genových sekvencí přítomných v *X. euvesicatoria*. Byl validován gen *recG*, který je unikátní pro *X. euvesicatoria*. Žádný ze šesti primerů nevykazoval 100% homologii s žádnou existující sekvencí v databázi NCBI (Larrea-Sarmiento a kol., 2018). Námi navržené primery nelze s databází porovnávat, protože nejsou dostupné, což neznamená, že nejsou specifické. Naše primery nebyly navrženy pro genové sekvence, ale výběr unikátní sekvence byl v rámci celého genomu. Primery byly navrženy v programu LAMP Designer (Optigene, UK), kde jsou loop primery navrhovány najednou spolu s ostatními primery. Larrea-Sarmiento a kol. (2018) navrhli primery v programu Primer Explorer V5 software (<http://primerexplorer.jp/e/>), kde se nejdříve navrhují vnější a vnitřní primery. Loop primery se navrhují až po vygenerování těchto primerů, což má nevýhodu v tom, že nemusí být pro ně volná pozice. Optimalizovaný LAMP dle Larrea-Sarmiento a kol. (2018) má velmi podobný detekční limit (100 fg).

Testování bylo provedeno na DNA z infikovaných rostlin u obou optimalizovaných LAMP metod. Infikování rostlin Larrea-Sarmiento a kol. (2018) provedli dle metodiky Giovanardi a kol. (2018). Náš postup infikování rostlin byl zvolen dle metodiky INSTA (2015). Izolace u obou postupů byly zvoleny dle komerčně dostupných kitů, které zajišťují velmi rychlé získání DNA.

Úspěšnost, rychlost, specifická a citlivost LAMP testů je velmi podobná. Ovšem námi navržená LAMP metoda má navržené primery tak, aby bylo možné fluorescenční označení jednoho z primerů, a tím bude možné optimalizovat metodu pro multiplex LAMP s ostatními *Xanthomonas* ssp. patogenních pro rajče a papriku.

#### **6.1.4 LAMP pro *Xanthomonas* ssp.**

V rámci rodu *Xanthomonas* byly již v minulosti publikovány primerové sady pro specifickou detekci *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*; *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Rigano a kol., 2010; Bühlmann a kol., 2013; Lang a kol., 2014). Kromě rozlišení pathovaru jsou tyto dva testy schopné rozlišit *X. oryzae* jak africké tak asijské linie. Byl navržen LAMP test pro detekci bakteriálního patogenu u banánů v Africe způsobené *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Hodgetts a kol., 2015). Bakteriální rakovinu u citrusů způsobují *Xanthomonas citri* subsp. *citri* a *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, které se ještě dělí do skupin A, B a C. LAMP test byl navržen a optimalizován pro tři poddruhy (Rigano kol., 2010).

## 6.2 Detekce houby *Fusarium circinatum*

Pro optimalizaci metody LAMP je důležité najít vhodný úsek DNA, pro který bude možné navrhnout specifické primery. Pro detekci hub se hojně používá ITS region, který má nejvyšší pravděpodobnost úspěšné identifikace druhu pro širokou škálu hub (Schoch a kol., 2012). *F. circinatum* byla poprvé specificky detekována sekvenováním genu translačního elongačního faktoru 1-alfa (*EF-1alfa*) (O'Donnell a kol., 1998). Ramsfield a kol. (2008) tento gen použili pro optimalizaci metody multiplex PCR, která byla schopna detekovat minimálně 10 pg/μl DNA. Gen *EF-1alfa* byl také použit pro specifický návrh primerů a TaqMan sondy, které byly použity pro metodu duplex real-time PCR. V této publikaci Luchi a kol. (2018) prezentují detekci *Fusarium circinatum* a *Caliciopsis pinea* v jedné reakci. Sonda se nachází v unikátní pozici. Návrh asimilační sondy v této práci byl soustředěn do stejné oblasti pro LAMP analýzu.

Molecular beacons (Tyagi and Kramer, 1996) a TaqMan sondy (Heid a kol., 1996) jsou sondy založené na přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET). Jsou slibnou alternativou pro sekvenčně specifické monitorování amplifikace DNA v reálném čase (Kubota a kol., 2011) Bohužel molecular beacons se spontánně rozvíjejí při teplotě LAMP reakce (60°C až 65°C) a vyžadovaná aktivita TaqMan sondy není kompatibilní s exonukleázovou aktivitou LAMP procesu. Avšak na základě těchto FRET procesů byly navrženy asimilační sondy, které lze použít při monitorování metodou real-time LAMP. Asimilační sonda se skládá ze smyčkového primeru nebo vnitřního primeru a fluorescenčního vlákna (Kubota a kol., 2011). Nejčastěji používané fluorescenční značení je 6-carboxyfluorescein (FAM) avšak lze použít i jiná: HEX, ROX, TAMRA, Cy5, Cy5.5 (Kouguchi a kol., 2010; Tanner a kol., 2012; Kubota a Jenkins, 2015). Asimilační sonda pro specifickou detekci *F. circinatum* byla značena 6-carboxyfluoresceinem (FAM). Pro návrh primerů a sond se používají stejné programy jako pro „klasický“ LAMP s tím rozdílem, že jeden z loop primerů situujeme do specifické pozice sekvence. Tento loop primer je fluorescenčně označen a vzniká asimilační sonda.

Jako doplněk byla použita analýza křivky tání (data nejsou uvedena), která jde použít pouze pro „klasický“ LAMP bez fluorescenčního značení. Analýza křivky tání byla pro rozlišení specifických produktů LAMP upřednostněna před procesem elektroforézy na

agarózovém gelu, vzhledem k tomu že je velké riziko kontaminace. Existuje několik zpráv o analýze křivek tání PCR produktů (Shrestha a kol., 2003; Haverstick a kol., 2004; Bu a kol., 2005; Aglietti a kol., 2019). Produkty PCR mohou být charakterizovány analýzou křivek tání, protože každá dvouřetězcová molekula DNA má specifickou teplotu tání ( $T_m$ ), při níž se 50% DNA rozplete na jednovláknovou. Hodnota  $T_m$  je závislá jak na základní sekvenci, tak na obsahu GC. Amplifikace primer-dimerů nebo nespecifických produktů bude pozorována jako píky s různými hodnotami  $T_m$ . Bu a kol. (2005) uvedli identifikaci PCR produktů amplifikovaných z *Candida spp.* a *Aspergillus spp.* pomocí analýzy křivek tání a specifické sondy byly použity na analýzu křivek tání typizující virus hepatitidy (Haverstick a kol., 2004) a diferenciaci druhů *Mycobacterium* (Shrestha a kol., 2003). Toto byla první zpráva analýzy křivky tání produktů LAMP. Identifikace produktů LAMP se sondami nemůže být stanovena, protože se již používá relativně velké množství oligonukleotidů (Njiru a kol., 2008).

V rámci *Fusarium ssp.* bylo provedeno několik optimalizací LAMP metod. Avšak pro specifickou detekci *F. circinatum* je v této disertační práci popsána první LAMP metoda, která je optimalizována pro přenosné platformy. Niessen, a Vogel (2010) vyvinuli specifický test pro toxigenní houbu *Fusarium graminearum*, která napadá obiloviny. Test byl založen na genu *gaoA* (galaktosoxidáza), pro který byly navrženy specifické primery. Bylo prokázáno, že detekují přítomnost méně než 2 pg purifikované cílové DNA v reakci během 30 minut. Real-time LAMP byla optimalizována pro detekci *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* z půdy. Tato houba je jedním z hlavních limitujících faktorů produkce melounů na světě. Detekční limit real-time LAMP byl  $1,2 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  genomové DNA nebo  $103 \text{ spór g}^{-1}$  umělé inokulované půdy, zatímco real-time PCR detekovala až  $12 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$  nebo  $102 \text{ spór g}^{-1}$ . Ačkoliv je citlivější real-time PCR než real-time LAMP tak tato metoda je přenosná a tudíž použitelná k detekci v terénu (Peng a kol., 2013). *Fusarium mangiferae* je celosvětově hlavním původcem houbového onemocnění manga. Pu a kol. (2014) v Číně optimalizovali LAMP metodu s citlivostí až  $2,26 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{l}$  plazmidové DNA. Kvantifikace DNA patogenu v přirozeně odebraných vzorcích neměla ve srovnání s výsledky u real-time PCR signifikantní rozdíl. Pro detekci *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* rasu 4 byl optimalizován real-time LAMP s detekčním limitem  $3 \times 10^3$  kopií plazmidové

DNA nebo 103 spór na gram v uměle zamořené půdě (Peng a kol., 2014). V roce 2018 byly optimalizovány dvě LAMP metody pro detekci *Fusarium fujikuroi* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* (Ortega a kol., 2018a; Ortega a kol., 2018b)

Tento rok byl publikován článek, kde bylo díky mezinárodní spolupráci testováno velké množství vzorků *Fusarium* spp. molekulárními metodami. Bylo používáno 8 protokolů, které se několikrát lišily výsledkem. To bylo způsobeno používáním různé přístrojové techniky. DNA geneticky příbuzných *F. temperatum* a *F. subglutinans* způsobovala falešně pozitivní výsledky, ačkoliv patogenita pro borovice je velmi nepravděpodobná (Ioos a kol., 2019). *F. temperatum* bylo velmi nepatrně detekováno i v LAMP metodě popsané v této disertační práci. Množství amplifikace bylo velmi zanedbatelné a můžeme ho považovat za negativní. *F. temperatum* bylo popsáno jako patogen kukuřice (Scauflaire a kol., 2012) V současné době je LAMP popsáný v této disertační práci nejcitlivější a nejspecifičtější dosud publikovanou metodou pro detekci karanténního patogenu *F. circinatum* a mohl by sloužit jako další detekční protocol při fyto-sanitárních kontrolách, který lze využít přímo v terénu.



## 7 Závěr

Disertační práce se zabývala optimalizací detekční metody LAMP pro bakterie rodu *Xanthomonas* patogenních pro rajče a papriku a pro houbu *Fusarium circinatum* patogenní pro borovici. Cílem práce bylo, navrhnout metodu tak, aby byla specifická a citlivá, vzhledem k následnému přenosu na přenosné platformy, které se používají přímo v terénu k rychlé detekci.

U bakterií rodu *Xanthomonas* byla nejdříve provedena bioinformatická analýza dostupných genových sekvencí vzhledem k vysoké míře příbuznosti. K laboratornímu testování byly vybrány dva geny *efP* a *copL*, které se jeví jako nejvíc specifické pro návrh primerů pro *X. vesicatoria*. Nejdříve byly testovány F3 a B3 primery metodou PCR, kvůli ověření specifcity. Optimalizace reakce probíhala mícháním komponentů, kde byl  $MgSO_4$  v gradientovém ředění. Tímto způsobem byla optimalizována specifická reakce LAMP, pro kterou byly navrženy primery z *efp* genu. Metoda LAMP pro detekci *X. vesicatoria* byla převedena na platformu Smart-DART (Diagenetix, USA).

Pro návrh primerů pro specifickou detekci *X. gardneri* byl vybrán gen *atpD*. Nejdříve byly testovány F3 a B3 primery metodou PCR a následně proběhla optimalizace LAMP metody pro real time zobrazení a pro kolorimetrické zobrazení. Byly optimalizovány dvě samostatné detekční LAMP metody pro *X. gardneri*.

Pro *X. euvesicatoria* byla optimalizována LAMP metoda. Vycházela z výběru specifického úseku v rámci celého genomu. Navržené primery byly testovány v dvou různých koncentracích. Při obou koncentracích byla reakce specifická. Rozdíl byl pouze v počátku přesahu prahové fluorescence. Pro ověření funkčnosti LAMP metody byla metoda testována na DNA izolované přímo z rostlin. LAMP pro specifickou detekci *X. euvesicatoria* dosahuje detekčního limitu 0,128 pg/μl DNA v reakci.

LAMP metoda byla optimalizována také pro vřeckovýtrusnou houbu *Fusarium circinatum*, která způsobuje onemocnění pryskyřičné rakoviny borovic. Vzhledem k vysoké sekvenční podobnosti v rámci genu *EFI-a* byla navržena asimilační sonda, která zvýšila specifitu reakce. Detekční limit byl 0,05 pg/μl v reakci.

Vytvořením citlivých detekčních systémů LAMP, jsme schopni detekovat rostlinné patogeny ve velmi krátkém čase bez potřeby laboratorního zařízení.

## 8 Seznam použité literatury

- Aglietti, C., Luchi, N., Pepori, A. L., Bartolini, P., Pecori, F., Raio, A., Santini A. a kol.. (2019) Real-time loop-mediated isothermal amplification: an early-warning tool for quarantine plant pathogen detection. *AMB. Express.*, 9(1), 50.
- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C. a Vinatzer, B. A. (2010) PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathol.*, 100(3), 208-215.
- Alonso, R. a Bettucci, L. (2009) First report of the pitch canker fungus *Fusarium circinatum* affecting *Pinus taeda* seedlings in Uruguay. *Australas. Plant. Dis. Not.*, 4(1), 91-92.
- Aoi, Y., Hosogai, M. a Tsuneda, S. (2006) Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J. Biotechnol.*, 125(4), 484-491.
- Aoki, T., O'Donnell, K. a Ichikawa, K. 2001. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. *Mycoscience.*, 42, 461–478.
- Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V. a Quezado-Duval, A. M. (2012) Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *J. App. Microbiol.*, 113(6), 1479-1490.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P. a Jackson, L. E. (2009) Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant. Dis.*, 87, 949-954.
- Barak, Michàlle E. Mor. (2016) Managing diversity: Toward a globally inclusive workplace. *Sage. Public.*, dostupné online: <https://www.statista.com/topics/1443/rice/>
- Bashan, Y., Diab, S. a Okon, Y. (1982a) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant. Soil.*, 68, 161-170.

- Bashan, Y., Okon, Y. a Henis, Y. (1982b) Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathol.*, 72, 1143-1144.
- Behlau, F., Hong, J. C., Jones, J. B. a Graham, J. H. (2013) Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads. *Phytopathol.*, 103(5), 409-418.
- Beran, P. a Mráz, I. (2013) Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop. Prot.*, 43, 213-215.
- Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. **2004**. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics* 20:798-9.
- Bogdanove, A. J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, Ch. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Comelis, G. R., Huang, H. Ch., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N. J. a Gijsegem, F. (1996) Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.*, 20(3), 681-683.
- Bouzar, H., Jones, J. K., Minsavage, G. V., Stall, R. E. a Scott, J. W. (1994) Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathol.*, 84, 39-44.
- Bragança, H., Diogo, E., Moniz, F. a Amaro, P. (2009) First report of pitch canker on pines caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant. Dis.*, 93(10), 1079-1079.
- Bu, R., Sathiapalan, R. K., Ibrahim, M. M., Al-Mohsen, I., Almodavar, E., Gutierrez, M. I. a Bhatia, K. (2005) Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J. Med. Microbiol.*, 54(3), 243-248.
- Bühlmann, A., Pothier, J. F., Tomlinson, J. A., Frey, J. E., Boonham, N., Smits, T. H. a Duffy, B. (2013) Genomics-informed design of loop-mediated isothermal amplification for detection of phytopathogenic *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* at the intraspecific level. *Plant. Pathol.*, 62(2), 475-484.
- Calvert, A. E., Biggerstaff, B. J., Tanner, N. A., Lauterbach, M. a Lanciotti, R. S. (2017) Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by

reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Plos. One.*, 12(9), e0185340.

Carlucci, A., Colatruglio, L. a Frisullo, S. (2007) First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant. Dis.*, 91(12), 1683-1683.

Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P. a Cottyn, B. (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant. Pathol.*, 65(5), 792–806.

Cuppels, D. A., Louws, F. J. a Ainsworth, T. (2006) Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant. Dis.*, 4, 451–458.

Dhama, K.,Karthik,K., Tiwari,R., Kapoor, S., Kumar, A. a Thomas, P. (2014) Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pak. J. Biol. Sci.*, 17, 151-166.

Doidge, E. M. (1920) A tomato canker. *Ann. Appl. Biol.*, 7, 407-430.

Donnelly, K.; Cavers, S.; Cottrell, J. E. a Ennos, R. A. (2016) Genetic variation for needle traits in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree. Genet. Genomes.*, 12, 40.

Dougherty, D. (1979) Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays. *P. Fl. St. Hortic. Soc.*, 91, 291-293.

Dowson, W. J. (1939) On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zbl. Bakt. P.*, 100, 177-193.

Dwinell, L. D. a Phelps, W. R. (1977) Pitch canker of slash pine in Florida. *J. Forest.*, 75(8), 488-489.

Dye, D. W. (1978) Genus IX *Xanthomonas* Dowson 1939. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New. Zeal. J. Agr. Res.*, 21, 153-177.

- Dye, D. W.; Starr, M. P. a Stolp, H. (1964) Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity, and cultural characteristics. *J. Phytopathol.*, 51, 394-407.
- EPPO Global Database. Fusarium Circinatum (GIBBCI): Distribution; EPPO: Paris, France, 2019, online dostupné z: <https://gd.eppo.int/taxon/GIBBCI/distribution>
- EPPO/CABI (1997) Quarantine Pests for Europe. Vydání 2. Publikováno Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R., Holderness, M. *CABI International*. Wallingford, UK.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Data sheets on quarantine pests: *Gibberella circinata*. EPPO Bull. 2005, 35, 383–386.
- Fang, X., Li, J. a Chen, Q. (2008) One new method of nucleic acid amplification loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Virol. Sin.*, 23(3), 167-172.
- Flaherty, J. E., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., Somodi, G. C. a Jackson, L. E. (2000) Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. *Hortic. Sci.*, 35, 882-884.
- Freeman, J., Ward, E., Calderon, C., & McCartney, A. (2002). A polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(9), 877-886.
- Fukuta, S., Kato, S., Yoshida, K., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J. a Ishimoto, Y. (2003). Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods.*, 112(1-2), 35-40.
- Gardner MW, Kendrick JB. Bacterial spot of tomato and pepper. *Phytopathology*. 1923;13(7):307-15.
- Gardner, M. W. a Kendrick, J. B. (1921) Bacterial spot of tomato. *J.Agric.Res.*, 21, 123-156.
- Gardner, M. W. a Kendrick, J. B. (1923) Bacterial spot of tomato and pepper. *Phytopathol.*, 13(7), 307-315.
- Gétaz, M., Bühlmann, A., Schneeberger, P. H., Van Malderghem, C., Duffy, B., Maes, M. a Cottyn, B. (2017) A diagnostic tool for improved detection of *Xanthomonas*

- fragariae* using a rapid and highly specific LAMP assay designed with comparative genomics. *Plant. Pathol.*, 66(7), 1094-1102.
- Giovanardi, D., Biondi, E., Ignjatov, M., Jevtić, R. a Stefani, E. (2018) Impact of bacterial spot outbreaks on the phytosanitary quality of tomato and pepper seeds. *Plant. Pathol.*, 67(5), 1168-1176.
- Goncalves, E. R., & Rosato, Y. B. (2002). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S-23S rDNA intergenic spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 355-361.
- Gordon, T. R., Storer, A. J. a Okamoto, D. (1996) Population structure of the pitch canker pathogen, *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini*, in California. *Mycol. Res.*, 100(7), 850-854.
- Hamza, A. A., Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Gagnevin, L., Lefeuvre, P., Chiroleu, F. a Pruvost, O. (2010) Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant. Dis.*, 94(8), 993-999.
- Hashioka, Y. (1969) Rice diseases in the world III. Bacterial. diseases. *Riso*. 18 (3), 189-204.
- Haverstick, D. M., Bullock, G. C. a Bruns, D. E. (2004) Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis: Analytical characteristics and performance. *Clin. Chem.*, 50(12), 2405-2407.
- Hawwa, R., Aikens, J., Turner, R. J., Santarsiero, B. D. a Mesecar, A. D. (2009) Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 488(2), 109-120.
- Hayward, A. C. a Waterston, J. M. (1964) *Xanthomonas vesicatoria*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *CABI International*, Wallingford, UK
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. a Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome. Res.*, 6(10), 986-994.

- Hepting, G. H. a Roth, E. R. (1946) Pitch canker, a new disease of some southern pines. *J. Forest.*, 44(10), 742-4.
- Hepting, G. H. a Roth, E. R. (1953). Host relations and spread of the pine pitch canker disease. *Phytopathol.*, 43.
- Higgins, B. B. (1922) The bacterial spot of pepper. *Phytopathol.*, 12, 501–517.
- Hodgetts, J., Karamura, G., Johnson, G., Hall, J., Perkins, K., Beed, F., Smith, J. a kol. (2015) Development of a lateral flow device for in-field detection and evaluation of PCR-based diagnostic methods for *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, the causal agent of banana xanthomonas wilt. *Plant. Pathol.*, 64(3), 559-567.
- Hu, L., Ma, L. M., Zheng, S., He, X., Hammack, T. S., Brown, E. W. Zhang, G. a kol. (2018) Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. *Enteritidis* from egg products. *Food. Control.*, 88, 190-197.
- INSTA. 7-019a Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on *Brassica* spp. (Roberts, S. J., Koenraad H.). International Rules for Seed Testing, kapitola 7: Validated Seed Health Testing Methods, Bassersdorf, Switzerland, International Seed Testing Association. 2015
- Ioos, R., Aloï, F., Piškur, B., Guinet, C., Mullett, M., Berbegal, M., Adamson, K a kol.. (2019) Transferability of PCR-based diagnostic protocols: An international collaborative case study assessing protocols targeting the quarantine pine pathogen *Fusarium circinatum*. *Sci. Rep.-UK*, 9(1), 8195.
- Ioos, R., Fourrier, C., Iancu, G. a Gordon, T. R. (2009) Sensitive detection of *Fusarium circinatum* in pine seed by combining an enrichment procedure with a real-time polymerase chainreaction using dual-labeled probe chemistry. *Phytopathol.*, 99, 582–590.
- Jones, J. B, Pohronezny, K. L., Stall, R. E. a Jones J. P. (1986) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathol.*, 76, 430-434.
- Jones, J. B., Bouzar, H., Stall, R. E., Almira, E. C., Roberts, P. D., Bowen, B. W., Sudberry, J., Stricker, J. a Chun, J. (2000) Systematic analysis of xanthomonads

(*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 50,(3), 1211-1219.

Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Minsavage, G. V., Stall, R. E. a Schaad, N. W. (2005) Bacterial Spot - worldwide distribution, importance and review. *Acta. Hort.*, 695, 27-34.

Jones, J.B, Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. a Schaad, N. W. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl. Microbiol.*, 27, 755-762.

Jones, T. (1991) Ethical decision making by individuals in organizations: An issue-contingent model. *Acad. Manage. Rev.*, 16(2), 231-248.

Keremane, M. L., Ramadugu, C., Rodriguez, E., Kubota, R., Shibata, S., Hall, R. F. a kol. (2015) A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop. Prot.*, 68, 41-48.

Kobayashi, T. (1989). Pitch canker of *Pinus luchuensis*, a new disease in Japanese forest. *Forest. Pest.*, 38(10), 169-173.

Koenraadt, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J. B., Oosterhof, J., Rijlaarsdam, A. a Roorda, P. (2007) Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta. Hort.*, 808, 99–102.

Kouguchi, Y., Fujiwara, T., Teramoto, M., & Kuramoto, M. (2010). Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolates. *Mol. Cell. Probe.*, 24(4), 190-195.

Kubota, R. a Jenkins, D. (2015) Real-time duplex applications of loop-mediated amplification (LAMP) by assimilating probes. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(3), 4786-4799.

Kubota, R., Alvarez, A. M., Su, W. W. a Jenkins, D. M. (2011) FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biol. Engi. Trans.*, 4(2), 81-100.



- Kůdela, V., Nováček, A. a Fucík, L. (2002) Rostlinolékařská bakteriologie. Vydání 1. 347 s. ISBN 80-200-0899-3.
- Kuflu, K. M. a Cuppels, D. A. (1997) Development of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Appl. Environ. Microb.*, 63(11), 4462-4470.
- Kuhlman, E. G., Dwinell, L. D., Nelson, P. E. a Booth, C. (1978) Characterization of the *Fusarium* causing pitch canker of southern pines. *Mycologia.*, 70(6), 1131-1143.
- Landeras, E., García, P., Fernández, Y., Braña, M., Fernández-Alonso, O., Méndez-Lodos, S. a Beltrán, R. (2005) Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. *Plant. Dis.*, 89(9), 1015-1015.
- Larrea-Sarmiento, A., Dhakal, U., Boluk, G., Fatdal, L., Alvarez, A., Strayer-Scherer, A. a Arif, M. a kol. (2018) Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. *Sci. Rep-UK.*, 8(1), 14298.
- Lee, J. K., Lee, S. H., Sung-II, Y. a Lee, Y. W. (2000). First report of pitch canker disease on *Pinus rigida* in Korea. *Plant. Pathology. J.*, 16(1), 52-54.
- Leite, R. P., Jones, J. B., Somodi, G. C., Minsavage, G. V. a Stall, R. E. (1994) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant. Dis.*, 79, 917-922.
- Li, Y., Fan, P., Zhou, S. a Zhang, L. (2017) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. *Microb. Pathogenesis.*, 107, 54-61.
- Luchi, N., Pepori, A. L., Bartolini, P., Ioos, R. a Santini, A. (2018). Duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Caliciopsis pinea* and *Fusarium circinatum* in pine samples. *Appl. Microbiol. Biot.* 102(16), 7135-7146.
- M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. (2003) *Nucleic. Acids. Res.*, 31 (13), 3406-3415.

- Martín-García, J., Lukačevićová, A., Flores-Pacheco, J., Diez, J. a Dvořák, M. (2018) Evaluation of the susceptibility of several czech conifer provenances to *Fusarium circinatum*. *Forests.*, 9(2), 72
- McGuire, R. G., Jones, J. B. a Sasser, M. (1986) Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Dis* 70, 887–891.
- McInnes, T. B., Gitaitis, R. D., Mccarter, S. M., Jaworski, C. A. a Phatak, S. C. (1988) Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant. Dis.*, 72, 575–579.
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G a Sanfuentes, E. (2011) Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chil. J Agr. Res.*, 71(3), 412.
- Moretti, C., Amatulli, M. T. a Buonauro, R. (2009) PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49(4), 466-471.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N. a Notomi, T. (2004) Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, 59(2), 145-157.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. a Notomi, T. (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 289(1), 150-154.
- Nagamine, K., Hase, T. a Notomi, T. (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probe.*, 16(3), 223-229.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T. a Notomi, T. (2001) Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin. Chem.*, 47(9), 1742-1743.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification.

- Niessen, L. a Vogel, R. F. (2010) Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int. J. Food Microbiol.*, 140(2-3), 183-191.
- Nirenberg, H. I. a O'Donnell, K. (1998) New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia.*, 90(3), 434-458.
- Njiru, Z. K., Mikosza, A. S. J., Armstrong, T., Enyaru, J. C., Ndung'u, J. M., & Thompson, A. R. C (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Plos. Neglect. Trop. D.*, 2(2), e147.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. a Bonas, U. (2002) Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island. *J. Bacteriol.*, 184(5), 1340-1348.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. a Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids. Res.*, 28(12), 63-63.
- Nzeli, C. O., Cáceres, A. G., Guerrero-Quincho, S., Tineo-Villafuerte, E., Rodriguez-Delfin, L., Mimori, T., Uezato, H., Katakura, K., Gomez, E. A., Guevara, G. A., Hashiguchi, Y. a Kato, H. (2016) A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. *Acta. Trop.*, 153, 116-119.
- O'Donnell, K. a Cigelnik, E. (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusariumare nonorthologous*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 7, 103–116.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. a Ploetz, R.C. (1998) Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana. Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *P. Natl. A. Sci. India. A.*, 95, 2044–2049.
- Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijevic, M., Jones, J. B. a Wang, J. F. (2004) Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris*

pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 110(3), 285-292.

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

Ortega, F. S., Tomlinson, J., Gilardi, G., Spadaro, D., Gullino, M. L., Garibaldi, A. a Boonham, N. (2018) Rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on soil, lettuce seeds and plants using loop-mediated isothermal amplification. *Plant. Pathol.*, 67(7), 1462-1473.

Ortega, S. F., Tomlinson, J., Hodgetts, J., Spadaro, D., Gullino, M. L. a Boonham, N. (2018) Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for the Detection of Seedborne Fungal Pathogens *Fusarium fujikuroi* and *Magnaporthe oryzae* in Rice Seed. *Plant. Dis.*, 102(8), 1549-1558.

Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Koebnik, R. a Lamichhane, J. R. (2018) Multilocus sequence analysis reveals a novel phylogroup of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* causing bacterial spot of tomato in Iran. *Plant. Pathol.*, 67(7), 1601-1611.

Ouyang, P., Arif, M., Fletcher, J., Melcher, U. a Corona, F. M. O. (2013). Enhanced reliability and accuracy for field deployable bioforensic detection and discrimination of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, causal agent of citrus variegated chlorosis using Razor Ex technology and TaqMan quantitative PCR. *Plos. One.*, 8(11), e81647.

Park, D. S., Shim, J. K., Kim, J. S., Lim, C. K., Shrestha, R., Hahn, J. H. a Kim, H. G. (2009) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on rhs family gene sequences. *Microbiol. Res.*, 164(1), 36-42.

Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. a Stead, D. (2007). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 57(12), 2881-2887.

Peng, J., Zhan, Y., Zeng, F., Long, H., Pei, Y. a Guo, J. (2013). Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil. *Fems. Microbiol. Lett.*, 349(2), 127-134.

- Peng, J., Zhang, H., Chen, F., Zhang, X., Xie, Y., Hou, X., Pu, J a kol. (2014) Rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in soil by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification. *J. Appl. Microbiol.*, 117(6), 1740-1749.
- Pérez-Sierra, A.; Landeras, E.; León, M.; Berbegal, M.; García-Jiménez, J.; Armengol, J. (2007) Characterization of *Fusarium circinatum* from Pinus spp. in northern Spain. *Mycol. Res.*, 111, 832–839.
- Petersen, K. D., Christensen, H., Bisgaard, M. a Olsen, J. E. (2001) Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons. *Microbiology*, 147(10), 2739-2748.
- Pfenning, L. H., Costa, S. D. S., Melo, M. P. D., Costa, H., Ventura, J. A., Auer, C. G. a Santos, Á. F. D. (2014) First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Trop. Plant. Pathol.*, 39(3), 210-216.
- Pohronezny, K., Moss, M. A., Dankers, W. I. L. B. U. R. a Schenk, J. A. M. E. S. (1990) Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct-seeded tomato. *Plant. Dis.*, 74, 800-805.
- Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N. F., Patil, P. B., Ryan, R. P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J. M., Momol, M. T., White, F. F., Preston, J. F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J. C., Norman, D. J., Staskawic, B. J. a Jones, J.B. (2011) Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics.*, 12(1), 146.
- Rademaker, J. L. (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 50(2), 665-677.
- Ramsfield, T.D., Dobbie, K., Dick, M.A. a Ball, R.D. (2008) Polymerase chain reaction-based detection of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker disease. *Mol. Ecol. Resour.*, 8, 1270–1273.
- Riedel, K. H., Wingfield, B. D. a Britz, T. J. (1992) Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. *Fems. Microbiol. Lett.*, 92(1), 69-71.

- Rigano, L. A., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Do Amaral, A. M. a Vojnov, A. A. (2010) Rapid and sensitive detection of Citrus Bacterial Canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. *Bmc. Microbiol.*, 10(1), 176.
- Sahin, F. a Miller, S. A. (1996) Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant. Dis.(USA)*.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. a Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. Vydání 1. 999 s. ISBN 0-87969309-6.
- Scauflaire, J., Gourgue, M., Callebaut, A. a Munaut, F. (2012). *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 133(4), 911-922.
- Scortichini, M., Stefani, E., Elphinstone, J. a Bergsma-Vlami, M. (2013) PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *BULLETIN OEPP* 43, 7-20.
- Shrestha, N. K., Tuohy, M. J., Hall, G. S., Reischl, U., Gordon, S. M. a Procop, G. W. (2003) Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41(11), 5121-5126.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. a Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (3. vydání). American Phytopathological Society (*APS Press*).
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. a kol. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *P. Natl. A. Sci. India. A.*, 109(16), 6241-6246.
- Schweigkofler, W., O'Donnell, K. a Garbelotto, M. (2004) Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Appl. Enviro. Microb.*, 70, 3512–3520.
- Sijam, K., Chang, C. J. a Gitaitis, R. D. (1992) A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Can. J. Plant. Pathol.*, 14, 182–184.

- Simões, T. H., Gonçalves, E. R., Rosato, Y. B., & Mehta, A. (2007). Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpf B* and *atp D* genes. *FEMS microbiology letters*, 271(1), 33-39.
- Sliacký P.; Kapitola P. (2007) *Gibberella circinata* - celosvětové nebezpečí pro borovice. Ministerstvo zemědělství, Praha
- Snyder, W. C., Toole, E. R. a Hepting, G. H. (1949) *Fusaria* associated with Mimosa wilt, Sumac wilt, and pine pitch canker. *J. Agric. Res.*, 78(10).
- Stall, R. E. a Thayer, P. L. (1962) Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant. Dis. Rep.*, 46, 389-392.
- Steenkamp, E. T., Rodas, C. A., Kvas, M., & Wingfield, M. J. (2012). *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology*, 41(5), 483-491.
- Stein RA (2008). Next-Generation Sequencing Update. *Genet Eng. Biotechn.*, 28 (15).
- Stephens, W. L. a Starr, M. P. (1963) Localization of carotenoid pigment in the cytoplasmic membrane of *Xanthomonas juglandis*. *J. Bacteriol.*, 86(5), 1070-1074.
- Storer, A., Gordon, T., Dallara, P. a Wood, D. (1994) Pitch canker kills pines, spreads to new species and regions. *Calif. Agr.*, 48(6), 9-13.
- Strayer, A. L., Jeyaprakash, A., Minsavage, G. V., Timilsina, S., Vallad, G. E., Jones, J. B. a Paret, M. L. (2016) A multiplex real-time PCR assay difentiates four *Xanthomonas* species associated with bacterial spot of tomato. *Plant. Dis.* 100, 1660-1668.
- Strayer, A., Paret, M. L., Jones, J. B. a Jeyaprakash. (2014) A. Multiplex qPCR assay for detecting the four causal agents of bacterial spot of tomato. *Phytopathol.*, 3340, 114-115.
- Sutic, D. (1957) Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). In *Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd*, vol. 6, pp.1-65 (special edition). Beograd: Institute of Plant Protein. (English summary: *Rev Appl Mycol* 36, 734-735).
- Swings, J. G. a Civerolo, E. L. (1993) *Xanthomonas*. Vydání 1. 399 s. ISBN 0-412-43420-2.

- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V. a Koptíková, J. (2005) Metody molekulární biologie. Vydání 1. 192 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- Tanner, N. A., Zhang, Y. a Evans Jr, T. C. (2012) Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques.*, 53(2), 81-89.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Kaiser, O. a kol. (2005) Insights into genome plasticity and 37 pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.*, 187, 7254-7266.
- Timilsina, S., Jibrin, M.O., Potnis, N., Minsavage, G.V., Kebede, M., Schwartz, A., Bart, R., Staskawicz, B., Boyer, C., Vallad, G.E., Pruvost, O., Jones, J.B. a Goss, E.M. (2015) Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Appl. Environ. Microbiology.*, 81(4), 1520–1529
- Timilsina, S., Kara, S., Jacques, M. A., Potnis, N., Minsavage, G. V., Vallad, G. E. & Fischer-Le Saux, M. (2019). Reclassification of *Xanthomonas gardneri* (ex Šutič 1957) Jones et al. 2006 as a later heterotypic synonym of *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 and description of *X. cynarae* pv. *cynarae* and *X. cynarae* pv. *gardneri* based on whole genome analyses. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 69(2), 343-349.
- Tomlinson, J. A., Dickinson, M. J. a Boonham, N. (2010) Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51(6), 650-657.
- Tomlison J. (2013) In-field diagnostics using loop-mediated isothermal amplification. In: Phytoplasma. *Hum. Press.*, 291-300.
- Tucker T., Marra M. a Friedman J. M. (2009) Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *Am. J. Hum. Genet.*, 85(2), 142–154.
- Tyagi, S. a Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 14(3), 303.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. a Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 472-489.



- Viljoen, A., Wingfield, M. J., a Marasas, W. F. O. (1994) First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on pine seedlings in South Africa. *Plant Dis.*, 78(3), 309-312.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. a Martínez-Romero, E. (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 34(1), 29-54.
- Weir, B. S., Turner, S. J., Silvester, W. B., Park, D. C. a Young, J. M. (2004) Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(10), 5980-5987.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. a Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky a T. J. White, eds. PCR protocols: A guide methods and applications, 315–322. San Diego, CA, *Academic. Press.*, 482.
- Wingfield, M. J., Jacobs, A., Coutinho, T. A., Ahumada, R. a Wingfield, B. D. (2002) First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. *Plant. Pathol.*, 51(3), 397-397.
- Wozniakowski, G., Kozdruń, W. a Samorek-Salamonowicz, (2012) E. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Viol. J.*, 9(1), 110.
- Yang, Y., Qin, X., Sun, Y., Cong, G., Li, Y. a Zhang, Z. (2017) Development of isothermal recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of porcine circovirus type 2. *Biomed. Res. Int.*
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. a Fargier, E. (2008) A multilocus suquence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol.*, 31, 366-377.
- Zhang, X., Lowe, S. B. a Gooding, J. J. (2014) Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.*, 61, 491-499.

