

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Studijní program: N4101 – Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Detekce bakterií rodu *Xanthomonas* patogenních pro rajče
a papriku metodou loop-mediated isothermal amplification**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Pavel Beran, Ph.D.

Konzultant diplomové práce:

Ing. Dagmar Stehlíková

Autor diplomové práce:

Bc. Lucie Voráčková

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 19.4.2018

.....

Lucie Voráčková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Pavlovi Beranovi, PhD. za vedení mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky. Dále velmi děkuji Ing. Dagmar Stehlíkové za odborné vedení při laboratorních metodách a za čas strávený při konzultacích a korekturách práce.

Abstrakt

Předmětem této diplomové práce je návrh specifických LAMP primerů a následná LAMP analýza a její optimalizace, s cílem specificky detekovat *Xanthomonas gardneri* a odlišit je tak od ostatních patogenních xanthomonád a dalších bakterií patogenních pro rajče a papriku. Byly navrženy 2 sady LAMP primerů ze sekvencí DNA genů *hrpB* a *atpD*. Tyto sady LAMP primerů jsou vysoce citlivé a jsou schopné detekovat 0,01 µl/mg DNA. Teplota LAMP reakce byla optimalizována na 64 °C, při které byla specifita reakce nejvyšší. Pomocí metody LAMP lze detekovat přítomnost patogenů v rostlinných pletivech. Hlavní výhodou této metody je časová nenáročnost analýzy oproti např. klasické PCR, proto má LAMP velký potenciál využití při detekci a identifikaci xanthomonád patogenních pro papriku a rajče.

Abstract

The subject of this thesis is the design of specific LAMP primers and LAMP analysis and its optimization. The purpose of this analysis is to specifically distinguish *Xanthomonas gardneri* from other pathogenic xanthomonads. Two sets of LAMP primers from the DNA sequences of *hrpB* and *atpD* genes were designed. These LAMP primer sets are highly sensitive and the detection limit of LAMP assay was found to be 0.01 µl / mg of DNA. The reaction temperature of the LAMP was optimized to 64 °C to reach the maximum of amplification. LAMP can be applied to detection and identification on pathogens in plant tissues. LAMP takes less time than conventional PCR to detect bacteria. This LAMP assay has a great potential to be applied to detection and identification of *Xanthomonas* genus bacteria pathogenic for tomato and pepper.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl.....	8
3	Literární Přehled	9
3.1	Bakterie rodu <i>Xanthomonas</i>	9
3.1.1	Charakteristika a klasifikace bakterií rodu <i>Xanthomonas</i>	9
3.1.2	Onemocnění způsobené bakteriemi rodu <i>Xanthomonas</i>	11
3.1.3	Detekce bakterií rodu <i>Xanthomonas</i>	14
3.2	Užité metody pro detekci bakterií	15
3.2.1	Polymerázová řetězová reakce	15
3.2.2	Elektroforéza	16
3.2.3	LAMP.....	18
4	Materiál a metody	25
4.1	Návrh primerů	25
4.2	Laboratorní testování.....	27
4.2.1	Kultivace bakteriálních kmenů	27
4.2.2	Izolace bakterií	28
4.2.3	PCR	28
4.2.4	LAMP.....	29
5	Výsledky a diskuze	31
5.1	Návrh LAMP primerů	31
5.2	Specifita primerů F3 a B3	33
5.3	LAMP reakce	34
5.4	Specifita LAMP primerů	35
5.5	Senzitivita reakce	37
6	Závěr	41
7	Seznam zkratk	42
8	Seznam použité literatury	43

1 Úvod

Kmeny bakterií *Xanthomonas*, způsobující bakteriální skvrnitost paprik a rajčat, jsou celosvětovou hrozbou pro produkci těchto zemědělských plodin. Stávající ochranná strategie spočívá v použití různých chemických a hygienických opatření k minimalizaci šíření patogenů. Pro účinné používání chemických prostředků je důležité správné rozlišení patogenů.

Pomocí metody LAMP je možné rychle a jednoduše detekovat a identifikovat tyto patogeny již v raném stádiu. Oproti klasickým metodám identifikace xanthomonád (kultivace, PCR, sekvenování, aj.) má LAMP výhodu ve vysoké specifitě, úspoře času a snadném vyhodnocení výsledků. Tyto vlastnosti by mohly být v budoucnu využity pro detekci bakterií přímo v terénu, čímž by se výrazně urychlil proces ozdravování a ochrany rajčat a paprik.

Hlavním cílem této práce je návrh a výběr nejvhodnějších LAMP primerů pro detekci bakterií *Xanthomonas gardneri*. Návrh primerů byl založen na odlišných sekvencích *hrpB* a *atpD* genů xanthomonád, které infikují papriku a rajče. Návrh byl proveden *in silico* v programu Primer-Explorer. Poté v laboratorní analýze byla hodnocena senzitivita *Xanthomonas gardneri* a specifita primerů v porovnání s dalšími kmeny xanthomonád a jiných bakterií patogenních pro rajče a papriku.

2 Cíl

1. Optimalizace detekčního postupu pro fytopatogenní bakterie pomocí metody LAMP
2. Návrh LAMP primerů detekující bakterie *Xanthomonas gardneri*
3. Stanovení specifity a senzitivity navržených primerů

3 Literární Přehled

3.1 Bakterie rodu *Xanthomonas*

3.1.1 Charakteristika a klasifikace bakterií rodu *Xanthomonas*

Xanthomonády jsou gramnegativní bakterie o velikosti 0,4 – 0,6 x 1 – 1,6 μm. Řadí se mezi pohyblivé bakterie, jejich pohyblivost zajišťuje jeden polární bičík. Mají obligátně aerobní respirační metabolismus (Kůdela a kol., 2002). Jsou katalázově pozitivní a oxidázově negativní a lze je identifikovat různými molekulárními technikami (Jones a kol., 2004). Většina xanthomonád vytváří mukoidní žluté kolonie. Xanthomonády vyvolávají bakteriózy, které způsobují vážné zemědělské ztráty, a to zejména v oblastech s tropickým a subtropickým klimatem (Kůdela a kol., 2002).

Klasifikace kmenů *Xanthomonas*, které infikují papriku a rajče, prošla v posledních letech značnou taxonomickou přeměnou. Již v 60. letech byla pozorována značná fenotypová rozmanitost bakterií (Dye a kol., 1964). Výzkumy potvrdily, že za onemocnění paprik a rajčat je zodpovědný více než jeden druh bakterií *Xanthomonas*.

Bacterium vesicatorium bylo několikrát překlasifikováno na *Pseudomonas vesicatoria*, *Phytophthora vesicatoria* a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (Dye a kol., 1980; Hayward a Waterston, 1964). Tyto bakteriální kmény byly považovány za jednu skupinu až do poloviny 90. let, kdy se prokázalo, že se rozdělují na dvě geneticky a genotypicky odlišné skupiny, které byly označeny jako A a B. Vauterin a kol. (1995) navrhl, že tyto dvě skupiny by měly být reklasifikovány jako *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (A) a *X. vesicatoria* (B).

Na základě výsledků z DNA-DNA hybridizace, Jones a kol. (2000) stanovili čtyři odlišné druhy *X. euvesicatoria* (A), *X. vesicatoria* (B), *X. perforans* (C) a *X. gardneri* (D), které mohou způsobovat bakteriální skvrnitost. Kmény patřící do skupin A, B, D infikují jak rajčata, tak i papriky. Zatímco kmény skupiny C infikují pouze rajčata. Tyto čtyři druhy se od sebe charakteristicky liší fyziologicky i molekulárně. Nicméně i toto rozdělení není konečné.

V roce 2008 provedl Young a kol. analýzu multilokusové sekvence (MLSA) pomocí genů *dnaK*, *fyuA*, *gyrB* a *rpoD*, čímž zjistil, že *X. gardneri* je téměř stejná jako *X. cynarae*, která způsobuje bakteriální skvrnitost na hlavičkách artyčoků. Mimo jiné i výsledky z MLSA naznačily blízký fylogenetický vztah mezi *X. perforans* a *X. euvesicatoria*. Almeida a kol. (2010) 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 a paprik, jsou geneticky různými patogeny. Celogenomová srovnávací analýza poskytla přehled o vývoji těchto kmenů. 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 kmenů *X. perforans* a *X. euvesicatoria*. Ve studii byly porovnávány části sedmi housekeeping genů (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *glnA*, *gyrB*, *lepA*, a *rpoD*) ze všech dostupných genomů všech kmenů. Polymorfismy se zde vyskytovaly velmi vzácně. Výsledky srovnání nezávislých genů naznačují, že mezi kmeny *X. euvesicatoria* a *X. perforans* existuje několik polymorfismů. Ale dřívější oddělení těchto dvou kmenů bylo chybně interpretováno díky zkoumání a porovnávání příliš širokého výběru kmenů. Ze škály bioinformatických dat a jejich vlastní analýzy vyplývá označení všech zkoumaných kmenů (*X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. axonopodis* pv. *allii*, *X. alfalfa* subsp. *citrumelonis*, a *X. dieffenbachiaesun*) jako *X. euvesicatoria*. Sloučení kmenů *X. perforans* a *X. euvesicatoria*, které navrhl Constantin a kol. (2016), potvrzují výsledky jednotlivých studií. Xantomonády, které infikují papriku a rajče jsou nyní dle dostupných informací rozděleny na kmeny *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* a *X. vesicatoria*.

3.1.2 Onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Xanthomonas*

Onemocnění, které způsobují bakterie rodu *Xanthomonas*, bylo poprvé objeveno na rajčeti v Jihoafrické republice v roce 1914, patogen pojmenoval Doidge (1920) *Bacterium vesicatorium*. Toto onemocnění později identifikovali také v Indii Gardener a Kendrick. Měli připravené pojmenování *Bacterium exitiosum*, ale přiklonili se k názvu, který navrhl Doidge. Tyto dva kmeny se sice odlišovaly v amylotické aktivitě, ale byly léčeny jako jeden patogen (Gardner a Kendrick, 1921). O dva roky později Gardner a Kendrick (1923) identifikovali bakteriální skvrnitost listů papriky. Zjistili, že nacházejí stejné symptomy, jaké byly objeveny u rajčete a klasifikovali ji také jako *B. vesicatorium*. Higgings (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).

3.1.2.1 Spektrum hostitelů

Mezi hlavní hostitele patří široká škála rostlin patřících do čeledi *Solanaceae*, především rajčata (*Solanum lycopersicum*), cherry rajčata (*Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*), lilek (*Solanum dulcamara*), *S. nigrum*, *S. rostratum*, *S. tuberosum*, *S. melongena*, *S. pimpinellifolium*, dále papriky (*Capsicum Annuum*), chilli papriky (*Capsicum rutescens*), durman obecný (*Datura stramonium*), blín černý (*Hyoscyamus niger*), blín zlatý (*H. aureus*), kustovnice čínská (*Lycium finese*), kustovnice cizí (*L. halimifolium*), tabák selský (*Nicotina rustice*), mochně (*Physalis minima*) a *Nicarda physalodes* (Dye a kol., 1964; Dye a kol., 1980; Hayward, 1964).

3.1.2.2 Způsob napadení

Jako jeden z primárních zdrojů inokula mohou sloužit semena, zejména v semenářském výrobním zařízení, kde se udržují vysoké teploty a vysoká relativní vlhkost. Je zde obrovská hustota rostlin, na které se ve většině případů využívá horní způsob zavlažování. Toto prostředí je ideální pro vývoj a šíření chorob (Pohronezny a kol., 1992). Ve venkovním prostředí se bakterie šíří pomocí dešťových kapek, které dopadají na rostlinu a patogen proniká skrz poranění způsobené při kulturních činnostech (roubování, ořezávání, vázání a sklizni) či poranění způsobené větrem

a dalšími faktory (Lindemann a Upper, 1985; McInnes a kol, 1988). Patogen může také pronikat do rostliny přes přirozené otvory jako stomata a hydatody (Jones, 1991).

Xanthomonády mohou přežívat ve fylosféře rajčat jako epifyti. Tyto epifytické populace bakterií i v latentní podobě napomáhají k šíření patogenu (McGuire a kol., 1991). Často se vyskytují na transplantátech rostlin, jelikož mají schopnost přetrvávat v reziduích plodin po delší dobu (Jones a kol, 1986).

3.1.2.3 Symptomy napadení

Bakteriální skvrnitost rajčat a paprik je charakterizována nekrotickými lézemi, které se tvoří na listech, stoncích, okvětních lístcích, květech a plodech (Jones a kol., 1991). Během počátečních fází vývoje symptomů se objevují kruhové vodnaté léze, které později usychají a mění barvu na tmavě hnědou až černou s mokřým až mastným vzhledem (Vallad a kol., 2004). V některých případech se okolo léze vytváří nažloutlý světlý kruh, tzv. halo efekt (Obr. 1). U rajčat se jednotlivé léze na listech rychle rozvíjí na velikost asi 0,2 cm v průměru. Léze u paprik mívají v průměru 0,25 – 0,5 cm (Stall a kol, 2009).

Obr. 1: Plody rajčat infikované bakteriální skvrnitostí



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

Za velmi vlhkých povětrnostních podmínek se skvrny na listech zvětšují a mohou přecházet až do černých nekrotických lézí (Obr. 2). Léze na stopkách a řapících mají více prodloužený tvar než ty, které se tvoří na listech. Naopak na plodech ve většině případů zůstávají léze malé a nepronikají hluboko, ale velké množství těchto míst znehodnocuje kvalitu plodů. Dalším úskalím jsou různé sekundární houby či jiné bakterie, které mohou na těchto místech kolonizovat, a způsobovat tak hnilobu plodů (Sun a kol., 2002).

Obr. 2: Bakteriální skvrnitost na listu papriky



<https://ag.umass.edu/sites/ag.umass.edu/files/photos/BLSpepper3.jpg>

Po napadení papriky bakteriální skvrnitostí je často pozorována defoliace rostlin. Mimo to mohou odpadávat květy a mladé plody. Kvalita plodů bývá ovlivněna jak přítomností lézí, tak i spálenin od slunce zapříčiněných odlistěním (Ritchie a Awerre, 2000).

3.1.3 Detekce bakterií rodu *Xanthomonas*

Bakterie rodu *Xanthomonas* jsou snadno izolovány z infikované tkáně na živném agaru. Charakterizují je žluté, mukoidní a konvexní kolonie (Doidge, 1921). 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 na určení *X. euvesicatoria* a *X. vesicatoria*. Na rozlišení čtyř druhů patogenních xanthomonád vyvinuli Cuppels a kol. sady PCR primerů až v roce 2006.

Výzkumníci zhodnotili mnoho různých metod pro diagnostiku a analýzu patogenních xanthomonád. V roce 2000 byly porovnány výsledky amplifikace fragmentů délky polymorfismu (AFLP) 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, založených právě na výsledcích předchozích analýz AFLP. Pomocí těchto oligonukleotidových primerů byly schopné přesně detekovat všechny testované kmeny (Koenraad a kol., 2007). Jelikož byl počet testovaných kmenů *X. perforans* a *X. gardneri* omezený, bylo potřebné ještě provést kontrolu navržených primerů. Araújo a kol. (2012) otestovali tyto primery na více kmenech a potvrdili tak vhodnost primerů. Po validaci ještě navrhli multiplex PCR, kterou lze současně detekovat všechny čtyři druhy.

Mezi další detekční nástroje patří i celogenomové sekvenování, pomocí jehož výsledků lze porovnávat části genomů bakterií, a tím i rozlišovat patogenní bakterie. Potnis a kol. (2011) pro svou analýzu využili 454 pyrosekvenování, výsledky porovnávali se sekvencemi z databáze PAMDB, získané MLST analýzou (<http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>).

Od poloviny 90. let vědci zkoumali použití diagnostických metod založených na analýze oblastí genů *hrpB*, konkrétně *hrpB2* (Bogdanove a kol., 1996; Noël a kol., 2002). Leite a kol. (1994) byli první, kdo využil analýzu genů *hrp* k detekci 28 různých pathovarů *X. campestris*. 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* 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).

3.2 Užití metody pro detekci bakterií

3.2.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction; PCR) je jednoduchou metodou exponenciální amplifikace specifické sekvence DNA *in vitro* (Henson a French, 1993).

Techniku této metody poprvé popsal v roce 1983 v Kalifornii Kary Mullis v rámci jeho analýzy amplifikace oligonukleotidů v tzv. beta-globinovém programu. První popis PCR byl vydán roku 1985 v časopise *Science*, ale neměl pozitivní ohlas (Saiki a kol., 1985). Akceptovaný byl až roce 1987 v periodiku *Methods in Enzymology*. Metoda byla uvedena jako specifická syntéza DNA *in vitro* pomocí řetězové reakce katalyzované polymerázou. Použité oligonukleotidové primery byly syntetizovány v automatizovaném zařízení pro syntézu DNA za použití fosforamiditu (Mullis a kol., 1987). Za vynalezení PCR získal Mullis v roce 1993 Nobelovu cenu. Na vývoji se také podíleli Henry Erlich, Norman Arheim, Radall Saiki, Glen Horn, Corey Levenson, Stevn Scharf, Fred Faloon a Tom White (Rabinow, 2011).

Využití PCR metody se rapidně zvýšilo až po roce 1988, přispělo k tomu hlavně zavedení používání *Taq* DNA polymerázy. Tato polymeráza je izolovaná z bakterií *Thermus aquaticus* a běžně odolává vysokým teplotám, při nichž DNA denaturuje. Použitím tohoto enzymu se snížily náklady na PCR, jelikož nebylo nutné polymerázu po každém cyklu doplňovat. Tím se umožnilo automatické cyklování (Henson a French, 1993).

Vysokou specifitu reakce zajišťují oligonukleotidové primery, které jsou komplementární ke každému konci cílové sekvence, jež má být amplifikována. Tato cílová sekvence může být dlouhá desítky až desítky tisíc nukleotidů. V reakční směsi se ještě mimo polymerázu a specifické primery nachází reakční pufr s ionty Mg^{2+} , volné deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) a voda. Termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza katalyzuje reakci, ve které se využívá oligonukleotidového primerového páru a čtyř dNTPs ke vzniku milionů kopií cílové sekvence. Z jedné molekuly DNA můžeme teoreticky získat 2^n kopií dané sekvence při n cyklech (Kolmodin a kol., 2002).

PCR probíhá v termálním cyklu, který zajistí střídání tří teplotních fází. Optimální počet cyklů se odvíjí od výchozí koncentrace templátové DNA a většinou se pohybuje v rozmezí mezi 25–35 cykly. První fáze je denaturace vodíkových můstků, které denaturují při teplotě nad 90 °C. Nejčastěji se využívá teploty 94 °C, kdy dochází k rozpletení a oddělení jednotlivých řetězců DNA. Na denuraci navazuje annealing, kdy při vhodné teplotě na denaturovaná vlákna nasedají komplementární oligonukleotidové primery. Teplota annealingu závisí na délce primeru, obsahu GC párů a teplotě tání (T_m) primerů a pohybuje se mezi 55–65 °C. Prostřednictvím termostabilní DNA polymerázy se ve třetí fázi (elongace) syntetizují nová vlákna. Vlákno je prodlužováno od 3' konce primeru na základě komplementarity bází, a to při teplotě kolem 72 °C. Výsledným produktem jsou amplikony o známé délce, jejichž přítomnost lze prokázat stanovením velikosti pomocí elektroforézy (Kolmodin a kol., 2002; Pavlík, 1999; Saiki a kol., 1988; Šmarda a kol., 2005).

PCR je velmi rozšířená metoda amplifikace používaná k diagnostice infekčních onemocnění rostlin. V posledních letech je běžně využívána real-time PCR jako základní diagnostická metoda (Ravnikar a kol., 2016).

3.2.2 Elektroforéza

Elektroforetická pohyblivost, kterou můžeme definovat jako rychlost nabitých částic v kapalném prostředí, je velmi důležitou vlastností využívající se u separačních metod (Kašička, 1997). Elektroforetická frakcionace a purifikace směsí koloidních systémů poprvé realizoval Schwerin, který od roku 1914 popsal v řadě patentů experimentální zařízení a některé aplikace metody (Illig a Schwerin, 1915). První

elektroforetickou aparaturu vyvinul v roce 1937 Tiselius. Popsal metodu, která je známá jako zónová elektroforéza a využil ji k separaci proteinů (Tiselius, 1937).

Elektroforézu lze považovat za nejvíce používanou separační metodu využívanou k analýze nukleových kyselin či bílkovin. Nukleové kyseliny se v elektrickém poli pohybují k anodě, díky jejich fosfátovým skupinám s negativním nábojem (Šmarda a kol, 2005). Výběr nejvhodnější elektroforetické metody závisí na velikosti DNA fragmentů. Obecně platí, že čím vyšší je koncentrace agarózy, tím menší je velikost pórů. Tradiční agarózové gely jsou nejúčinnější při separaci DNA fragmentů o velikosti od 100 bp.

K oddělení fragmentů DNA větších než 25 kb slouží pulzní elektroforéza, při které se orientace směru proudu periodicky střídá (Lai a kol., 1989). Fragmenty DNA menší než 100 bp jsou nejúčinněji odděleny za použití elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Na rozdíl od agarózových gelů se matrice polyakrylamidového gelu vytváří chemickou reakcí řízenou volnými radikály (Lee a kol., 2012).

3.2.2.1 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza je jednoduchá a vysoce účinná metoda pro separaci, identifikaci a purifikaci DNA fragmentů různých velikostí v rozmezí od 100 bp do 25 kb (Lee a kol, 2012). Použití elektroforézy na agarózovém gelu způsobilo revoluci v analýze DNA. Dříve byla DNA primárně separována za použití gradientové centrifugace, která poskytovala pouze přibližnou informaci o velikosti (Helling a kol, 1974). Vzhledem k tomu, že DNA má konstantní poměr hmotnosti a elektrického náboje, molekuly DNA jsou v agarózovém gelu odděleny dle velikostí tak, že ujetá vzdálenost na gelu je nepřímo úměrná logaritmu jejich molekulové hmotnosti (Smith a kol., 1989).

Postup elektroforetického vyhodnocení je následující. Nejdříve je připraven gel s vhodnou koncentrací agarózy pro velikost fragmentů DNA, které mají být odděleny. Vzorky DNA se napipetují do jamek na gelu, který je umístěn do elektroforetické vany, kde probíhá oddělení fragmentů pomocí napětí (Johansson, 1972). Rychlost migrace molekuly DNA přes gel je určena velikostí a konformací molekuly DNA, koncentrací a typem agarózy, použitým napětím, přítomností ethidiumbromidu

a elektroforetickým pufrům (Lee a kol., 2012). Gel je vizualizován přímo při osvětlení UV zářením (Johansson, 1972).

Pro vizualizaci polohy separovaných molekul se využívá interkalační činidlo, ethidiumbromid (EtBr), SYBR Green či jiná barviva DNA (Westermeier, 2016). Molekuly EtBr se vmezeřují mezi sousední páry bází. Při expozici UV světla se aktivují elektrony v molekule ethidia, což vede k uvolnění energie (světla). Intenzita fluorescence jednotlivých fragmentů je poté úměrná koncentraci DNA (Lee a kol., 2012). EtBr má kladný elektrický náboj, čímž se snižuje míra migrace DNA o 15%. EtBr je také mutagen a karcinogen, proto je důležité pečlivě pracovat při manipulaci s agarózovými gely, které ho obsahují. Navíc je EtBr považován za nebezpečný odpad a musí být likvidován vhodným způsobem (Sharp a kol., 1973). Mezi další barviva můžeme zahrnout SYBR Gold, SYBR green, Crystal Violet a Methyl Blue. Z nich Methyl Blue a Crystal Violet nevyžadují pro vizualizaci UV záření, čímž se snižuje pravděpodobnost mutace, je-li potřebné získat DNA fragmenty z gelu. Nicméně jejich citlivost je nižší než citlivost EtBr. SYBR gold a SYBR green jsou vysoce citlivé barvy, závislé na UV záření, mají nižší toxicitu než EtBr, ale jsou podstatně dražší. Kvůli ceně, snadnosti použití a citlivosti zůstává EtBr stále nejvíce využívaným barvivem (Lee a kol., 2012).

3.2.3 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; Notomi a Hase, 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 $10^9 - 10^{10} \times$ za 15 – 60 minut, což může ve srovnání s PCR ušetřit i 1 hodinu (Nzelu a kol., 2016). Bylo zjištěno, že metoda LAMP je 10 - 100 \times 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 (Nagamine a kol., 2002). 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).

3.2.3.1 Princip LAMP

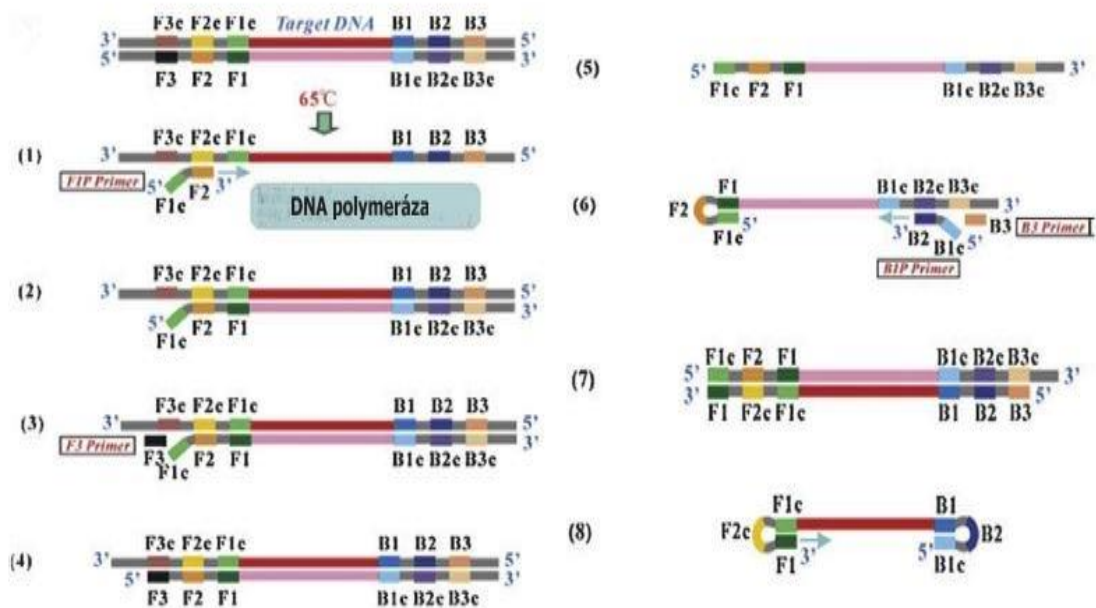
Metoda LAMP je charakteristická použitím šesti různých primerů, které jsou specificky určené k rozpoznání osmi odlišných oblastí na cílovém genu. Amplifikace a detekce genu může být dokončena v jediném kroku inkubace reakční směsi při konstantní teplotě cca 60–65 °C (Notomi a kol., 2000).

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 izolovaná z bakterie *Geobacillus stearothermophilus* (Hawwa a kol., 2009). Mezi další komponenty patří dNTP, jako zdroj potřebných nukleotidů a pufr. 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. 3).

Obr. 3: Necyklická fáze LAMP

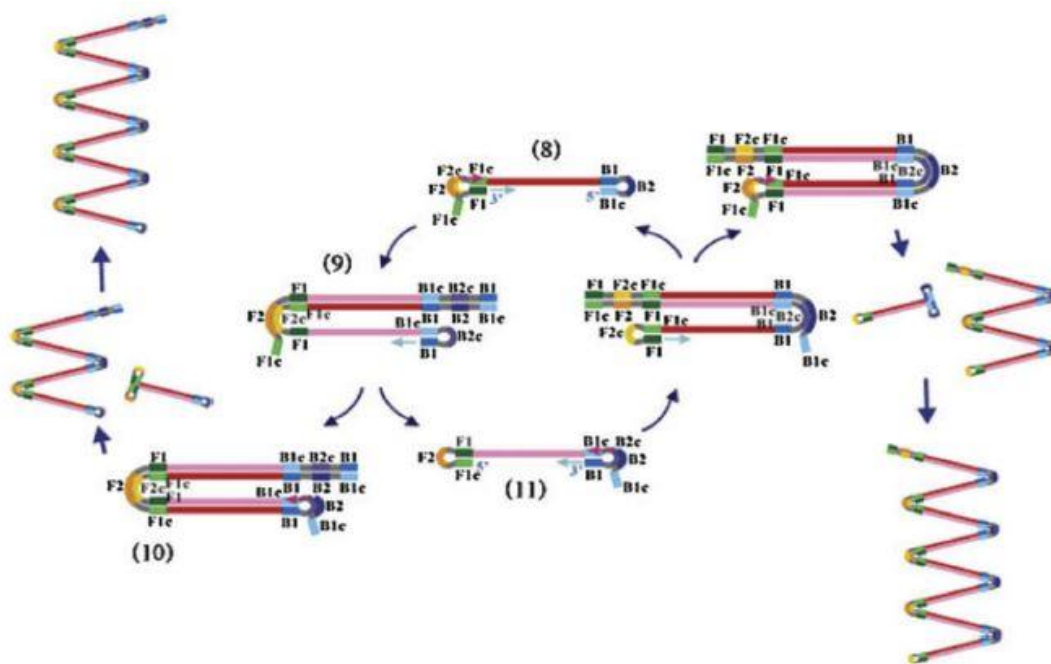


<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0882401017300748-gr2.jpg>

(1) Nasednutí termostabilní - DNA polymerázy, (2) prostřednictvím dislokázní 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. 4). 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.

Obr. 4: Cyklická fáze LAMP



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 B1 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 vlákně (Fang a kol., 2008; Li a kol, 2017; Nagamine a kol., 2001).

3.2.3.2 LAMP primery

Stěžejním krokem LAMP reakce je návrh vysoce citlivé a specifické sady LAMP primerů. Pro návrh je běžně používán online program Primer - Explorer V4/V5, dostupný na internetové stránce <https://primerexplorer.jp/e/> (Primer - Explorer, 2005).

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). Tyto primery odpovídají sekvenci 6 různých oblastí cílového genu. Na 3' konci to jsou oblasti F3c, F2c, F1c a na 5' konci oblasti B1, B2, B3. Pro urychlení reakce mohou být dále navrženy až dva smyčkové primery, a to zadní smyčkový primer (Backward loop primer; Loop B) a přední smyčkový primer (Forward loop primer; Loop F).

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. Loop F je navržen s použitím komplementárního vlákna odpovídajícího oblasti mezi F1 a F2. Loop B 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, jak sense, tak i antisense sekvenci tak, aby napomáhaly při vytváření smyčky. Loop F a Loop B jsou navrženy tak, aby zrychlily amplifikační reakci vazbou na další místa, která nejsou přístupná vnitřními primery (Notomi a kol., 2000; Nagamine a kol., 2001; Nagamine a kol., 2002).

3.2.3.3 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 %.

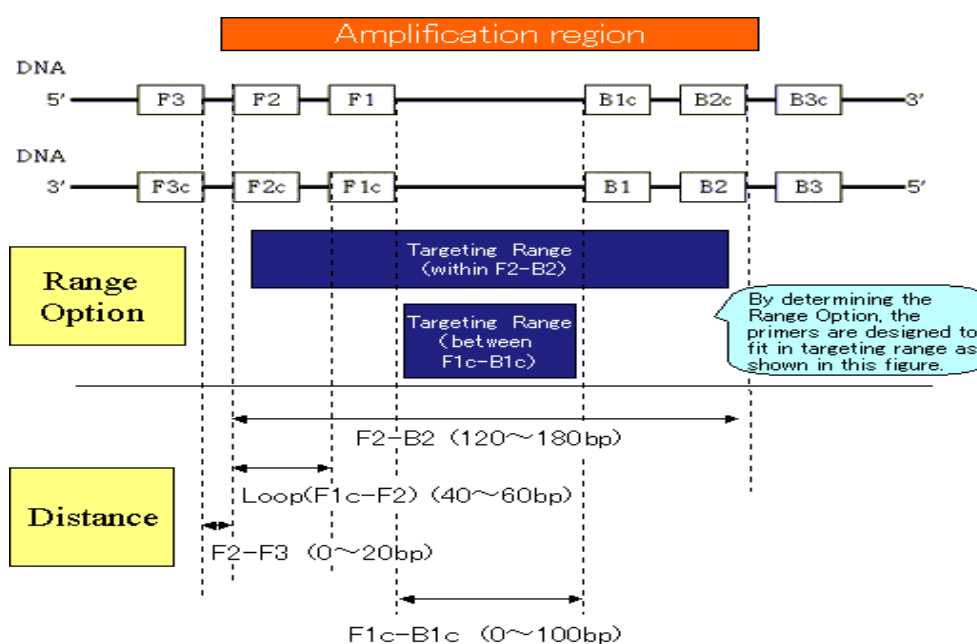
3' konec primeru by neměl obsahovat mnoho AT bází či být komplementární k jiným primerům. Je to důležité, zejména u vnitřních primerů, aby se netvořily

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 Loop F, Loop B 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 asi $60\text{--}65$ °C v případě bohatých na GC, a $55\text{--}60$ °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 ($64\text{--}66$ °C), přibližně 60 °C ($59\text{--}61$ °C) pro F2, B2, F3 a B3 a přibližně 65 °C ($64\text{--}66$ °C) pro smyčkové primery.

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

Obr. 5: Vzdálenosti oblastí navrhovaných primerů



https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/img/03_ch01.gif

3.2.3.4 Vyhodnocení LAMP

Prvotní posouzení amplifikace je možné vizuální detekcí zákalu pyrofosforečnanu hořčnatého 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, 2006). Mezi optické metody vyhodnocení lze zahrnout i monitorování LAMP amplifikace v reálném čase, které lze provést spektrofotometrickou analýzou nebo pomocí turbidimetru (Mori a kol., 2004).

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).

4 Materiál a metody

4.1 Návrh primerů

Primery pro LAMP analýzu byly navrženy *in silico* v programu Primer Explorer V5. Použity byly sekvence získané z databáze NCBI. Následně byly porovnány v programu MEGA software, kde byly zjištěny odlišnosti v genu *atpD* a genu *hrpB* bakterie *Xanthomonas gardneri* od ostatních xantomonád (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*) (Obr. 6 a Obr. 7). Pomocí těchto odlišností byly vybrány sady primerů s nejvyšší teoretickou specifičností. Specifita těchto vybraných primerů byla poté ověřována v databázi NCBI programem BLAST.

Obr. 6: Alignment části bakteriálních sekvencí genu *atpD*



1 – *Xanthomonas gardneri*, 2 – *Xanthomonas vesicatoria*, 3 – *Xanthomonas euvesicatoria*

Obr. 7: Alignment části bakteriálních sekvencí genu *hrpB*



1 – *Xanthomonas gardneri*, 2 – *Xanthomonas vesicatoria*, 3 – *Xanthomonas euvesicatoria*

Před návrhem primerů byly v programu PrimerExplorer V5 nastaveny následující podmínky. Délka mezi oblastí F1c/B1c byla 20–22 nukleotidů, délka F2/B2 byla 18–20 nukleotidů a délka F3/B3 byla 18–20 nukleotidů. Teplota tání oblastí F1c/B1c 64–66°C, F2/B2 59–61°C, F3/B3 59–61°C. Zastoupení GC bází 40–65 %. ΔG 5' konce byla -3, ΔG 3' konce byla -5. Vzdálenost mezi F2 a B2 byla nastavena na 120–180 nukleotidů, smyčka F1c-F2 byla 40–60 nukleotidů, vzdálenost mezi F2 a F3 byla 0–20 nukleotidů a vzdálenost mezi F1c a B1c byla 0–100 nukleotidů.

Po zadání podmínek program vygeneroval 1000 možných kombinací primerů. Poté bylo nutné ještě ověřit specifitu primerů v programu BLAST GenBank, dostupný na internetové stránce <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Tento program porovnává zadanou sekvenci se sekvencemi v databázi.

Takto lze vyselektovat primery, které by detekovaly i jiné xantomonády. Po ověření specifity byly vybrány dvě sady primerů, u kterých se předpokládá nejvyšší specifčnost (Tab. 1). Sekvence vybraných genů *atpD* a *hrpB* a umístění navržených LAMP primerů je znázorněno na Obr. 9 a Obr. 10.

Tab. 1: Navržené primery pro geny *atpD* a *hrpB*

Gen <i>atpD</i>					
Primer	Pozice 5' konce primeru	Pozice 3' konce primeru	Délka primeru (nukleotidy)	T_m (°C)	Sekvence
F3	75	90	16	59,23	CGGTGATGGCGTGGTG
B3	273	290	18	60,11	TCTTCGTACGACGGTGCA
FIP	-	-	35	F2 61,49/ F1c 65,67	GGCGCGCTCGGTATTGGTG- TTGCGCTCGGCTCCAC
BIP	-	-	34	B2 62,17/ B1c 64,84	GACGCTGGGCCGCATCAT- TGGTCCGAGGCCTGCA
LoopB	215	231	17	61,95	GCCCGATCGACGAAGCC
Gen <i>hrpB</i>					
Primer	Pozice 5' konce primeru	Pozice 3' konce primeru	Délka primeru (nukleotidy)	T_m (°C)	Sekvence
F3	9	24	16	61,60	CGGGGTGCAGGTCAGC
B3	177	191	15	61,13	ACCGGCACCGCCAAG
FIP	-	-	37	F2 62,89/ F1c 64,85	CCACCTCGGCACGTTGCA- GGCGAGGTATGCGAGTTGC
BIP	-	-	35	B2 61,41/ B1c 65,97	GCCGCCATCTCGCCTTGC- GCCCCGATCCGATCACG
LoopB	126	142	17	61,26	CGAGCTGGTGGGCTTGT

4.2 Laboratorní testování

4.2.1 Kultivace bakteriálních kmenů

K analýze byly použity bakteriální kmeny uchované při teplotě -80 °C (Tab. 2). Po vyjmutí z mrazáku byly bakterie naočkovány na pevné médium, masopeptonový agar s glukózou (MPAg) (Obr. 8). Roztěr bakterií byl křížový. Po naočkování byly bakterie kultivovány 48 hodin při teplotě 26°C.

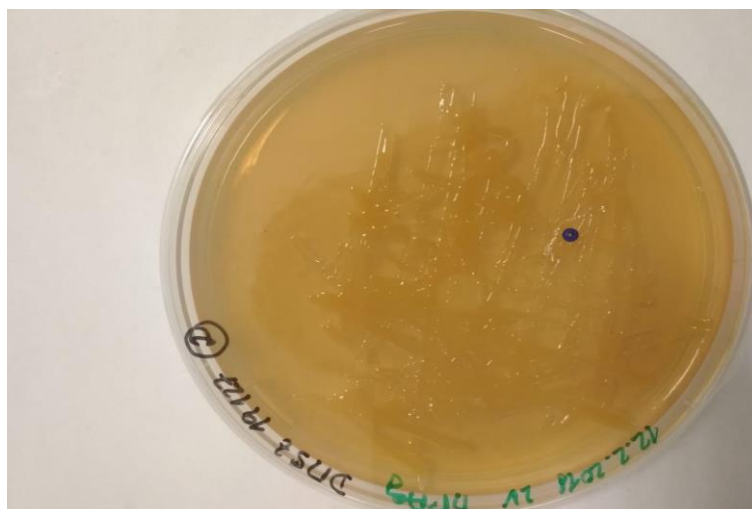
Na přípravu 250 ml MPAg média bylo použito 10 g živného agaru č. 2 dále pak 1,3 g kvasničního autolyzátu a 2,5 g glukózy. Poté bylo upraveno pH na 7,2 pomocí 1M NaOH. Po upravení pH bylo přidáno 5 g agaru.

Tab. 2: Použité kmeny bakterií

Použité bakterie	Sbírka	Číslo sbírky
<i>Bílá herbicola</i>	-	1/02-2009
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CRI	1032
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	RICP	T626/98
<i>Erwinia amylovora</i>	CRI	312/97
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CCM	4073
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI	8120
<i>Ralstonia solanacearum</i>	BCCM/LMG	2306
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	931
<i>Xanthomonas gardneri</i>	DSMZ	19127
<i>Xanthomonas perforans</i>	DSMZ	18975
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	BCCM/LMG	920

BCCM/LMG = Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms v Gentu, CCM = Česká sbírka mikroorganismů v Brně, CRI = sbírka mikroorganismů Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni, v.v.i., DSMZ = Deutsche Sammlung Microorganismen und Zellkulturen GmbH, RICP = Česká sbírka fytopatogenních mikroorganismů VÚRV

Obr. 8: Kultivované kolonie *Xanthomonas gardneri*



4.2.2 Izolace bakterií

DNA bakterií byla vyizolována pomocí komerčně dostupného kitu Genomic Mini od firmy A & A BIOTECHNOLOGY, Polsko. Nejdříve byly kolonie bakterií rozpuštěny ve 100 μ l TRIS BUFFER a poté centrifugovány 14000 g/ 8–10 minut. Poté byl odstraněn supernatant a přidáno 200 μ l LYSIS BUFFER a 20 μ l PROTEINAZY K.

Kolonka se směsí byla inkubována 20 minut při 37 °C a poté 5 minut při 70 °C. Směs byla zvortexována a poté byla dle přiloženého protokolu vyizolována bakteriální DNA. Vyizolovaná DNA byla uchovávána v Save-Lock Eppendorf zkumavkách při -20 °C.

4.2.3 PCR

Pomocí PCR byla zjišťována specifita F3 a B3 primerů, které jsou uvedené v Tab. 1. Reakční směs byla namíchána z 5,5 μ l vody (Top Bio, CZ), 0,5 μ l (5 mM) primeru F3 0,5 μ l (5 mM) primeru B3 a 7,5 μ l PPP MasterMixu (TopBio, CZ). K 14 μ l této reakční směsi byl přidán 1 μ l (50 ng/ μ l) DNA. Takto namíchaná a zvortexovaná směs byla vložena do termocykleru, ve kterém se 30 \times opakovaly fáze denaturace, annealingu a elongace (Tab. 3). PCR fragmenty byly separovány na 1% agarózovém gelu s 0,5 x TBE nejdříve 5 minut při 2V/cm a poté 80 minut při 5 V/cm. Jako standard

byl použit 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK). Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení InGenius3.

Tab. 3: Fáze PCR

	teplota	čas	
Úvodní denaturace	95 °C	5 minut	
Denaturace	94 °C	1 minuta	} 30×
Annealing	58 °C	40 sekund	
Elongace	72 °C	1 minuta	
Závěrečná elongace	72 °C	15 minut	
Chlazení	4 °C	-	

4.2.4 LAMP

Prvotní reakční směs pro LAMP analýzu byla připravena tak, aby celkový objem směsi byl 25 μ l (Tab. 4). Veškeré komponenty byly smíchány dohromady, zvortexovány a poté byla přidána vyizolovaná DNA. Následná LAMP reakce probíhala v termocykleru, na kterém byl nastaven teplotní program 64 °C na 60 minut a poté na 98 °C po dobu 2 minut. Pro vizualizaci byl použit 1% gel, který byl připraven ze 1,2 g agarózy a 120 ml TBE. Do gelu bylo přidáno 8 μ l Etidium bromidu, aby bylo možné později vizualizovat výsledky. Gel byl umístěn do malé elektroforetické vany. Elektroforéza probíhala 90 min při 4 V/cm. Po skončení elektroforézy byl gel vizualizován pomocí UV záření transiluminátorem a vyhodnocena v programu GeneSys (Syngene,UK). Jako standard byl použit 10000 bp DNA ladder (Sigma A, USA).

Tab. 4: Reakční směs LAMP

Komponenta	Koncentrace	Množství
Voda	-	5,3 μ l
Termostabilní pufr	10x	2,5 μ l
MgCl ₂	5 mM	4 μ l
Betain	5M	4 μ l
dNTPs	25mM	1,2 μ l
Primer F3	5 mM	0,8 μ l
Primer B3	5 mM	0,8 μ l
Primer FIP	40 mM	0,8 μ l
Primer BIP	40 mM	0,8 μ l
Loop B	20 mM	0,8 μ l
<i>Bst</i> DNA polymeráza	8U/ μ l	1 μ l
DNA	50 ng/ μ l	3 μ l
celkem		25 μ l

Jako další možnost reakční směsi byl pro analýzy realtime LAMP použit komerční izotermální Master Mix od firmy Optigene, UK. Reakční směs jednoho vzorku obsahovala 3,5 μ l vody, 12,5 μ l Isothermal Master Mixu (Optigene, UK), 1 μ l každého primeru (F3, B3, FIP, BIP, LoopB), 1 μ l SYBR Green (10000 \times v DMSO; Sigma Aldrich, USA) a jako poslední bylo přidáno 3 μ l (50 ng/ μ l) DNA. Analýzy probíhaly na zařízení QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). Teplotní program byl nastaven na 64°C 60 minut a poté na 98°C po dobu 2 minut.

5 Výsledky a diskuze

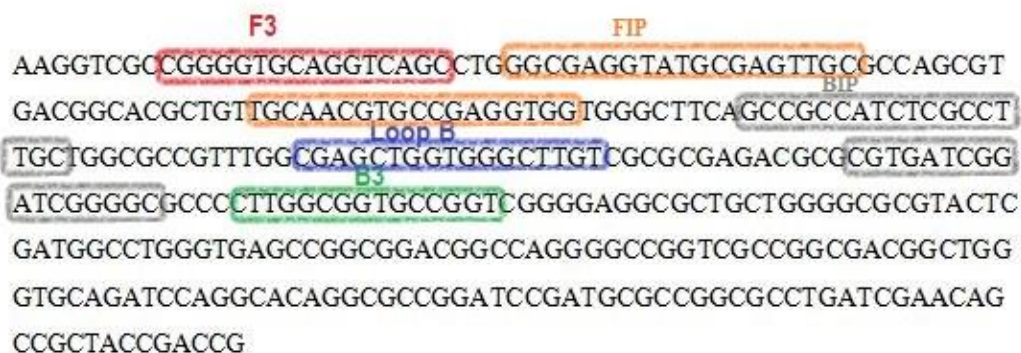
5.1 Návrh LAMP primerů

V rámci této diplomové práce byly navrženy dvě sady LAMP primerů z genů *atpD* a *hrpB* pro detekci patogenní bakterie *Xanthomonas gardneri* (Obr. 9 a 10). Geny *atpD* a *hrpB* byly vybrány na základě informací získaných z vědeckých článků popisující prvotní detekce patogenních bakterií pomocí těchto genů (Hansen a kol, 1981; Schulte a kol., 1992). Každá sada obsahovala pět navržených primerů (F3, B3, FIP, BIP, Loop B). Druhý smyčkový primer nebyl navržen, jelikož se v sekvenci genů *atpD* a *hrpB* nevyskytuje vhodné místo na umístění tohoto primeru.

Obr. 9: Sekvence genu *atpD* (GenBank číslo GU322790.1) a umístění navržených LAMP primerů

```
CATGAAGTGCCGAAGGTCTATCACGCGTTGAAGGTCGAAGGCACCGAAATCACC
CTGGAAGTGCAGCAGCAGCTCGGTGATGGCGTGGTGCGCACGATTGCGCTCGGCT
CCACCGACGGCCTGAAGCGCAACCTGCTGGCCACCAATACCGAGCGCGCCATTC
GGTGCCGGTTCGGCGCCGGGACGCTGGGCCGCATCATGGACGTGCTGGGTGCCCC
GATCGACGAAGCCGGCGATGTGCAGGCCCTCGGACCAATTGGGAAATCCATCGCGC
TGCACCGTCGTACGAAGACCAGTCCTCCAGCACCGAGCTGCTGGAAACCGGCATC
AAGGTCATCGACCTGATGTGCCGTTCCGCAAGGGCGGCAAGGTCGGCCTGTTCCG
GCGGCGCCGGCGTCGGCAAGACCGTCAACATGATGGAAATTGATCAACAACATCG
CCAAGGCGCACAGCGGTTTGTCCGTGTTTGCCGGCGTGGGCGAGCGTACCCGTGA
GGGCAACGACTTCTACCACGAGATGAAGGACTCCAACGTGCTGGACAAGGTCGC
GATGGTGTACGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGCAACCGTCTGCGCGTTGCGCT
GACCGGCCTGACCATGGCCGAGTACTTCGCGACGAGAAGGACGAGAACGGCAA
GGGCAAGGACGTGCTGCTGTTGTTGGACAACATCTACCGCTACACGCTGGCCGGT
ACCGAAGTGTCCGCGCTGCTCGGCCGCATGCCGTCGGCA
```

Obr. 10: Sekvence genu *hrpB* (GenBank číslo KF994870.1) a umístění navržených LAMP primerů

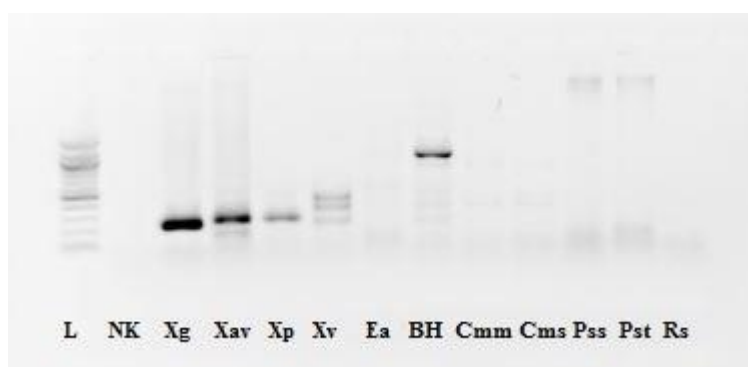


Pro usnadnění detekce patogenů napadající papriku a rajče bylo v minulosti navrženo několik párů specifických PCR primerů. Od devadesátých let vědci zkoumali sekvenci *hrpB* genů pro využití k detekci bakterií patogenních pro papriku a rajče. V roce 2004 vědci navrhli primery z oblastí *hrpB* genů detekující *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Olbradovic a kol, 2004). Park a kol (2009) zjistili další specifické primery pro detekci *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Moretti a kol. (2009) navrhli primery Xeu2.4 a Xeu2.5, poskytují specifickou a rychlou detekci *X. euvesicatoria* jak z kultur, tak z extraktů získaných z inokulovaných rostlin paprik a rajčat. V roce 2009 byly pomocí AFLP navrženy primery pro specifickou detekci a identifikaci xanthomonád při testování semen. Specifičnost sad primerů BS-Xv, BS-Xp a zejména BS-Xg byla stanovena omezeným počtem kmenů, proto musely být tyto sady ještě v roce 2012 verifikované (Araújo a kol, 2012; Koenraad a kol, 2007). V roce 2012 Hamza a kol. využili sekvenci *atpD* genu k detekci xanthomonád patogenních pro papriku a rajče pomocí analýzy MLSA. Na Jihočeské univerzitě byly navrženy na základě DNA sekvence *atpD* genu 2 páry specifických primerů (XV1F a XV1R), které umožňují rychlou detekci *X. vesicatoria* (Beran a Mráz, 2013).

5.2 Specifita primerů F3 a B3

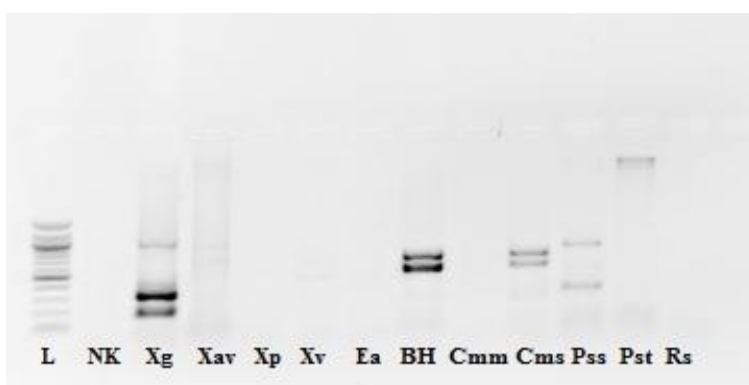
Pomocí PCR bylo zjištěno, že navržené primery F3 a B3 z genů *atpD* a *hrpB* detekovaly *Xanthomonas gardneri*. Jako prvotní testování je tato analýza dostačující, vzhledem k hypotéze, že se specifita při použití více primerů zvýší. Při PCR reakci s použitím F3 a B3 primerů navržených z genu *atpD* vznikal očekávaný produkt o velikosti 183 bp, ale primery z tohoto genu by pro odlišení xantomonád klasickou PCR vhodné nebyly (Obr. 11). Oproti tomu primery navržené z genu *hrpB* byly v rámci xantomonád specifické, avšak u některých ostatních bakterií tvoří nespecifické produkty (Obr. 12).

Obr. 11: Elektroforetické vyhodnocení PCR s *atpD* primery F3 a B3



L – mulekulární standard (ladder), NK – negativní kontrola, Xg – *Xanthomonas gardneri*, Xav – *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, Xp – *Xanthomonas perforans*, Xv – *Xanthomonas vesicatoria*, BH – *Bílá herbicola*, Cmm – *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*, Cms – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Pss – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Pst – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Rs – *Ralstonia solanacearum*

Obr. 12: Elektroforetické vyhodnocení PCR s *hrpB* primery F3 a B3

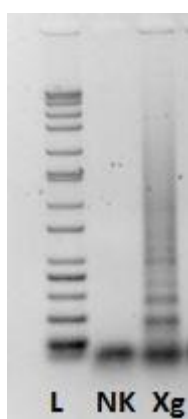


L – mulekulární standard (ladder), NK – negativní kontrola, Xg – *Xanthomonas gardneri*, Xav – *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, Xp – *Xanthomonas perforans*, Xv – *Xanthomonas vesicatoria*, BH – *Bílá herbicola*, Cmm – *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*, Cms – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Pss – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Pst – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Rs – *Ralstonia solanacearum*

5.3 LAMP reakce

Reakční mix LAMP reakce byl namíchán dle Tab. 4. LAMP reakce byla vyhodnocena na agarózovém gelu, Detekce bakterie *Xanthomonas gardneri* na agarózovém gelu byla pozitivní. LAMP reakce je zřetelně viditelná charakteristickými vícenásobnými pásy (Obr. 13). Pro další reakce byl dále použit izotermální Master Mix od firmy Optigene. Vzhledem k riziku zvýšené kontaminace u nanášení vzorku na gel, byla provedena vizualizace kromě elektroforetické i metodou real-time LAMP.

Obr. 13: Elektroforetické vyhodnocení LAMP reakce



L – molekulární standard (ladder), NK – negativní kontrola, Xg – *Xanthomonas gardneri*

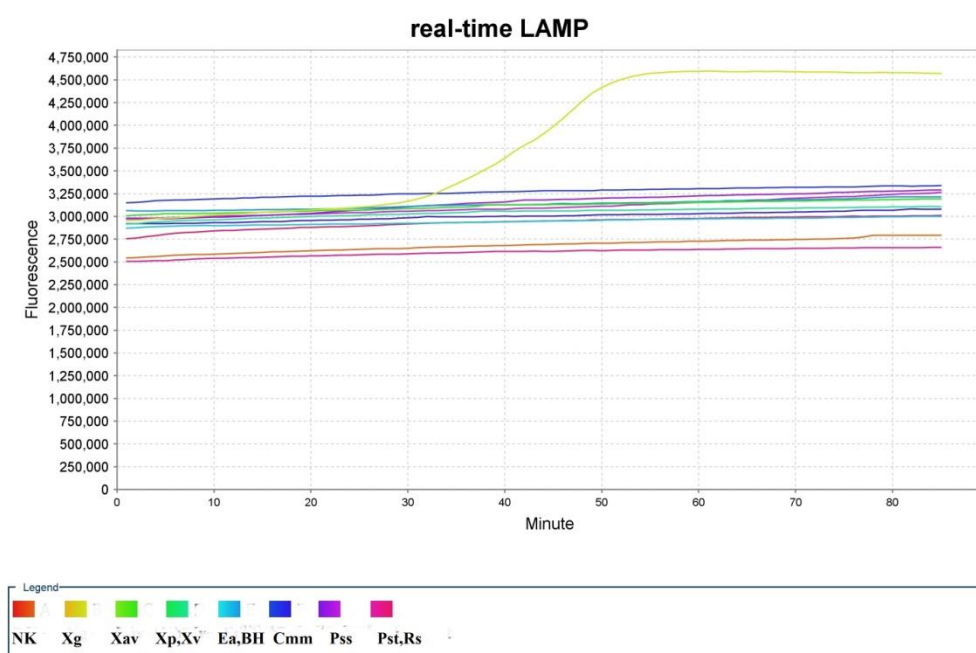
Při použití Master Mixu od firmy Optigene byly optimální výsledky dosaženy při teplotě reakce 64 °C, čímž se zajistila vysoká specifita navržených primerů. Amplifikace byla detekována během 40 - 60 minut.

V počátcích vývoje LAMP byly komerčně využívány LAMP kity pro detekci bakterií *Shigella Salmonella*, *Escherichia coli* (Hara-Kudo a kol., 2005; Song a kol., 2005; Maruyama a kol., 2003). Další detekční komerčně využívané LAMP postupy pro detekci bakterií jsou vivinuty pro *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* (Li a kol., 2017). Pomocí LAMP byla také detekována patogenní *Erwinia Amylovora* (Temple a kol. 2008). Jun-Hai a kol. (2015) optimalizovali LAMP reakci pro detekci *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* již v latetní podobě v rostlině. V dnešní době existují desítky vědeckých článků zabývajících se využitím LAMP metody k detekci patogenních bakterií.

5.4 Specifita LAMP primerů

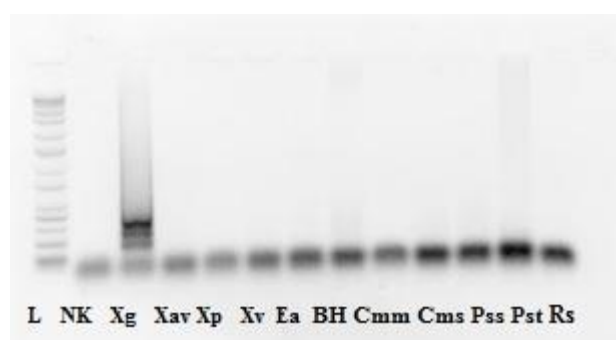
Specifita sad LAMP primerů byla testována u 11 patogenních bakterií. Za účelem zjištění, zda tyto sady primerů jsou schopny amplifikovat své cílové lokusy, byla provedena real-time LAMP reakce a kontrolní zobrazení elektroforézou na agarozovém gelu. Sada primerů navržená pomocí sekvence *atpD* genu amplifikovala mezi 40–50 minutou cílové sekvence pouze u bakterie *Xanthomonas gardneri*. Ostatní bakterie nebyly detekovány (Obr. 14 a Obr. 15). Sada primerů navržená pomocí sekvence *hrpB* genu amplifikovala mezi 30–40 minutou cílové sekvence pouze u bakterie *Xanthomonas gardneri* a ostatní bakterie nebyly detekovány (Obr. 16 a Obr. 17). Obě sady primerů byly vyhodnoceny jako specifické pro detekci patogenní bakterie *Xanthomonas gardneri*.

Obr. 14: Specifita navržených primerů ze sekvence *atpD*



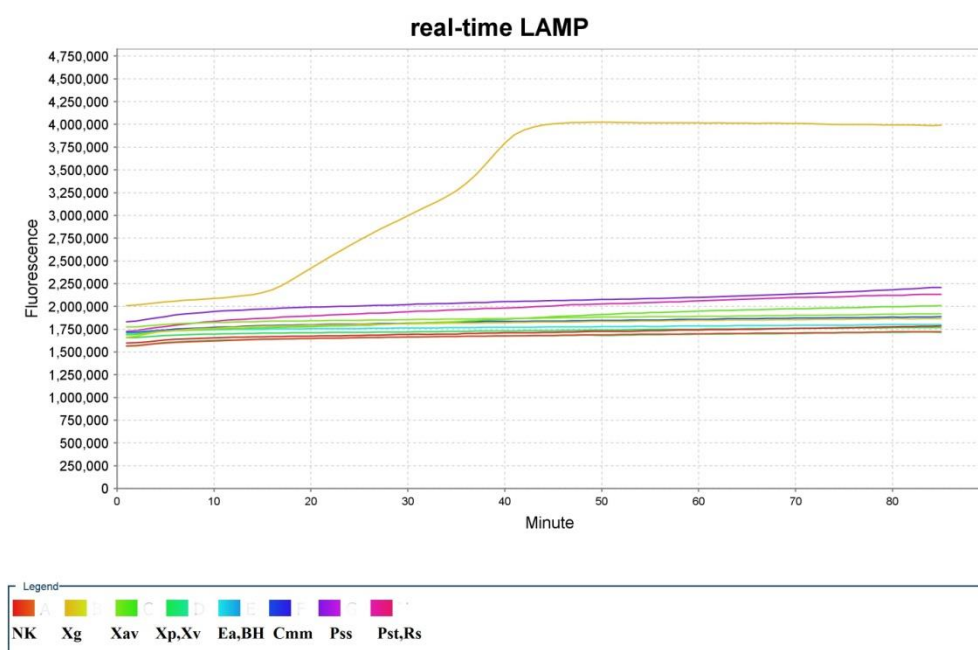
NK – negativní kontrola, *Xg* – *Xanthomonas gardneri*, *Xav* – *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xp* – *Xanthomonas perforans*, *Xv* – *Xanthomonas vesicatoria*, *BH* – *Bílá herbicola*, *Cmm* – *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*, *Cms* – *Cavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Pss* – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pst* – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Rs* – *Ralstonia solanacearum*

Obr. 15: Elektroforetické vyhodnocení specifity primerů z *atpD* sekvence



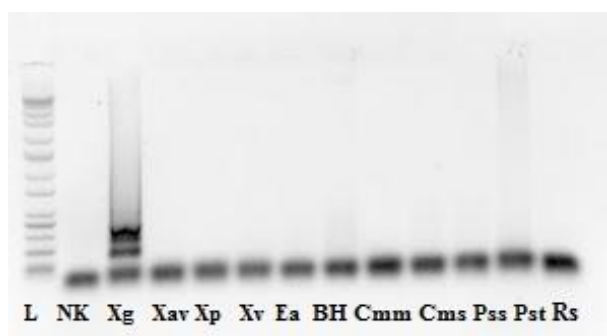
L – molekulární standard (ladder), NK – negativní kontrola, Xg – *Xanthomonas gardneri*, Xav – *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, Xp – *Xanthomonas perforans*, Xv – *Xanthomonas vesicatoria*, BH – *Bílá herbicola*, Cmm – *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*, Cms – *Cavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Pss – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Pst – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Rs – *Ralstonia solanacearum*

Obr. 16: Specifita navržených primerů z *hrpB* sekvence



NK – negativní kontrola, Xg – *Xanthomonas gardneri*, Xav – *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, Xp – *Xanthomonas perforans*, Xv – *Xanthomonas vesicatoria*, BH – *Bílá herbicola*, Cmm – *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*, Cms – *Cavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Pss – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Pst – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Rs – *Ralstonia solanacearum*

Obr. 17: Elektroforetické vyhodnocení specifity primerů z *hrpB* sekvence

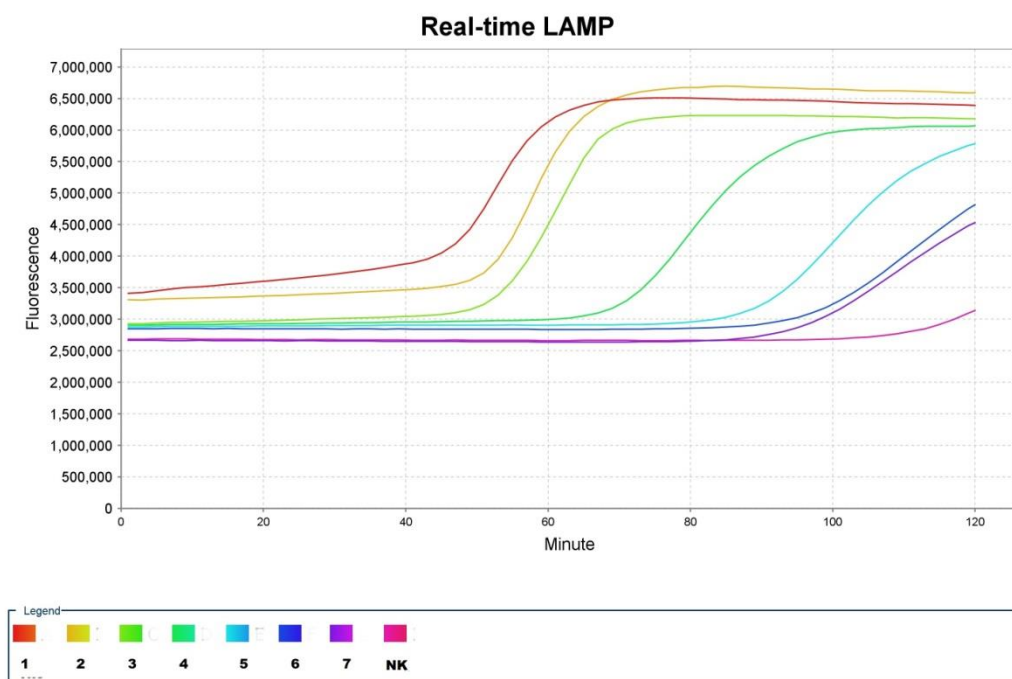


L – molekulární standard (ladder), NK – negativní kontrola, Xg – *Xanthomonas gardneri*, Xav – *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, Xp – *Xanthomonas perforans*, Xv – *Xanthomonas vesicatoria*, BH – *Bílá herbicola*, Cmm – *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*, Cms – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Pss – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Pst – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Rs – *Ralstonia solanacearum*

5.5 Senzitivita reakce

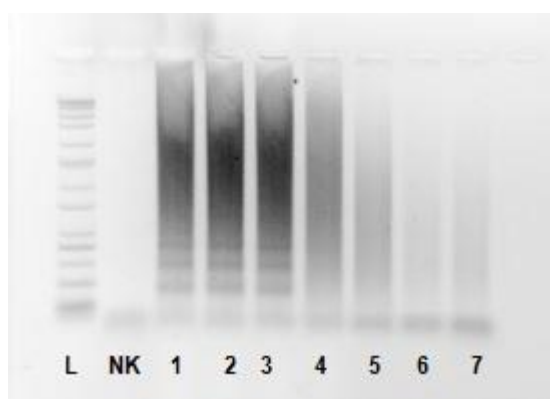
Pro stanovení analytické senzitivity LAMP reakce bylo provedeno desetinasobné ředění DNA, čímž byla stanovena dolní limitní hranice množství DNA ve vzorku, kterou lze pomocí LAMP detekovat. Ředící řada byla připravena pro obě sady primerů s vyizolovanou DNA bakterie *Xanthomonas gardneri*. Výchozí koncentrace byla 50 ng/μl. Pro optimální výsledky je vhodné využití koncentrace od 5 ng/μl DNA do 0,05 ng/μl DNA, kdy byla zaznamenána amplifikace mezi 40–60 minutou (Obr. 18 a Obr. 20). Při nižší koncentraci již byla DNA amplifikována po 60 minutě. Při koncentraci 0,0005 ng/μl DNA a 0,00005 ng/μl probíhala amplifikace až po 80 minutě u *hrpB* primerů a po 90 minutě u *atpD* primerů. Pomocí real-time LAMP byla stanovena nejvhodnější koncentrace DNA pro LAMP reakci do 0,05 ng/μl. Nižší koncentrace je méně vhodná, jelikož se tím snižuje rychlost reakce. Výsledky z real-time LAMP reakce byly potvrzeny pomocí elektroforézy (Obr. 19 a Obr. 21).

Obr. 18: Senzitivita LAMP reakce s použitím primerů navržených ze sekvence *atpD*



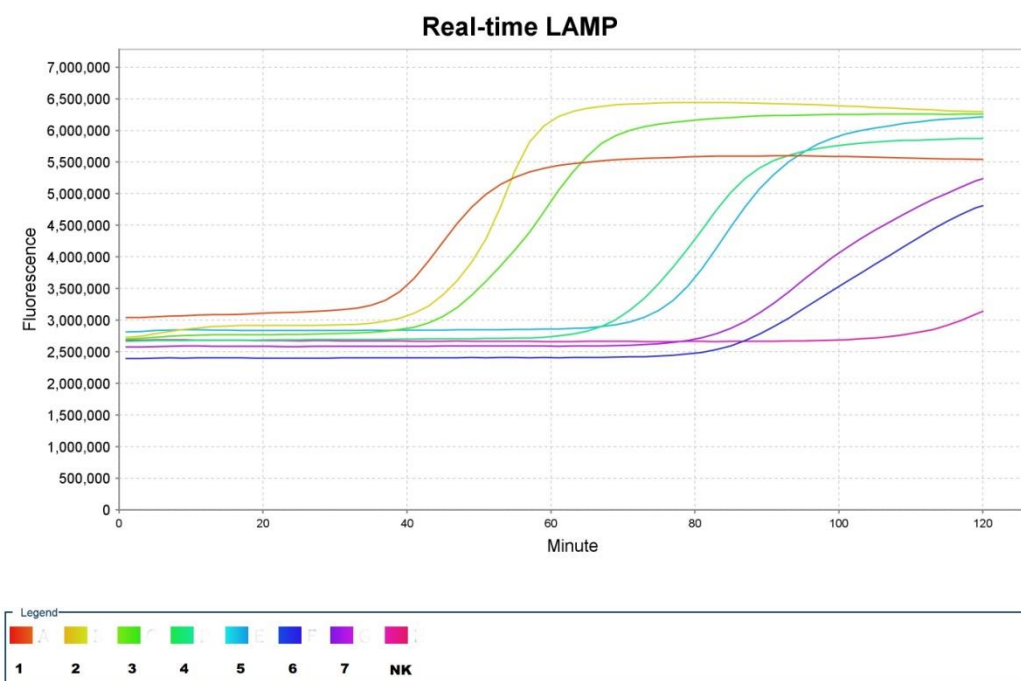
NK – negativní kontrola, 1 – 50 ng/μl DNA, 2 – 5 ng/μl DNA, 3 – 0,5 ng/μl DNA, 4 – 0,05 ng/μl DNA, 5 – 0,005 ng/μl DNA, 6 – 0,0005 ng/μl DNA, 7 – 0,00005 ng/μl DNA

Obr. 19: Elektroforetické vyhodnocení real-time LAMP reakce s použitím primerů navržených ze sekvence *atpD*



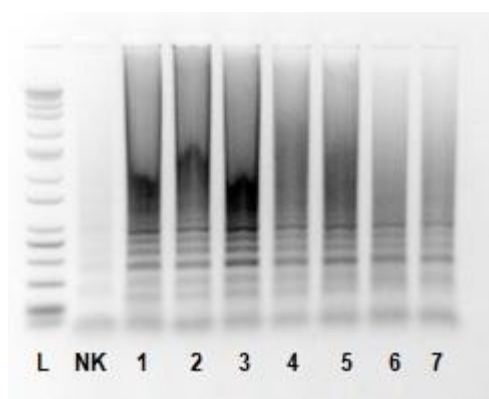
L – molekulární standard (ladder), NK – negativní kontrola, 1 – 50 ng/μl DNA, 2 – 5 ng/μl DNA, 3 – 0,5 ng/μl DNA, 4 – 0,05 ng/μl DNA, 5 – 0,005 ng/μl DNA, 6 – 0,0005 ng/μl DNA, 7 – 0,00005 ng/μl DNA

Obr. 20: Senzitivita LAMP reakce s použitím primerů navržených ze sekvenční *hrpB*



NK – negativní kontrola, 1 – 50 ng/μl DNA, 2 – 5 ng/μl DNA, 3 – 0,5 ng/μl DNA, 4 – 0,05 ng/μl DNA, 5 – 0,005 ng/μl DNA, 6 – 0,0005 ng/μl DNA, 7 – 0,00005 ng/μl DNA

Obr. 21: Elektroforetické vyhodnocení real-time LAMP reakce s použitím primerů navržených ze sekvenční *hrpB*



L – molekulární standard (ladder), NK – negativní kontrola, 1 – 50 ng/μl DNA, 2 – 5 ng/μl DNA, 3 – 0,5 ng/μl DNA, 4 – 0,05 ng/μl DNA, 5 – 0,005 ng/μl DNA, 6 – 0,0005 ng/μl DNA, 7 – 0,00005 ng/μl DNA

LAMP je vysoce citlivá metoda a je schopná detekovat velmi malé množství DNA v reakční směsi. Notomi a kol. (2000) potvrdili, že pomocí LAMP lze amplifikovat jen 6 kopií cílové DNA na detekovatelnou úroveň již po 45 minutách. Detekovatelnou koncentraci DNA ve vzorku také hodnotil Lang a kol (2014). Ve své studii detekce *Xanthomonas oryzae* zjistili limitní hodnotu koncentrace DNA mezi 1 pg – 10 fg. O rok později Wang a kol. (2015) porovnávali Touchdown LAMP s dříve popsanými testy LAMP. Zjistili, že Touchdown LAMP je až 100 x citlivější a detekuje DNA 11 kmenů *Listeria monocytogenes* o koncentraci 10 fg. Seki a kol. (2018) se zaměřili na srovnání senzitivity metody LAMP a PCR pro detekci bakteriální meningitidy. Zjistili, že metoda LAMP detekuje s více než stonásobnou citlivostí než PCR.

6 Závěr

Pomocí metody LAMP lze detekovat fytopatogenní bakterie *Xanthomonas gardneri* a odlišit je tak od ostatních druhů patogenních pro rajče a papriku. Při laboratorním testování byly optimalizovány podmínky tak, aby byla detekce co nejpřesnější a nejspolehlivější.

Na základě DNA sekvencí genů *atpD* a *hrpB* byly navrženy dvě sady LAMP primerů pro detekci fytopatogenní bakterie *Xanthomonas gardneri*.

Obě sady navržených primerů specificky detekovaly *Xanthomonas gardneri* a ostatní patogenní bakterie pro rajče a papriku nebyly detekovány. Limitní hranice koncentrace při LAMP detekci, kdy probíhala amplifikace je až 0,0005 ng/μl DNA, ale nejvhodnější koncentrace byla stanovena na 5 – 0,05 ng/μl DNA.

7 Seznam zkratek

AFLP	Amplified fragment length polymorphism; Amplifikace fragmentů délky polymorfismu
<i>AtpD</i>	Gene ATP synthase subunit beta; gen ATP syntázy podjednotka beta
B3	Backward outer primer; vnější zadní primer
BIP	Backward inner primer; vnitřní zadní primer
bp	Pár komplementárních nukleových bází
DNA	Deoxynucleotide acid; deoxynukleotidová kyselina
DMSO	Dimethyl sulfoxid
dNTP	Deoxynucleotid; deoxynukleotid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; Enzymoimunoanalýza
EtBr	Ethidium bromid
F3	Forward outer primer; vnější přední primer
FIP	Forward inner primer; vnitřní přední primer
<i>HrpB</i>	Gene hrpB; gen hrpB
kb	Kilobáze = 1000 bp
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification; Izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkami
Loop B	Backward loop primer; zadní smyčkový primer
Loop F	Forward loop primer; přední smyčkový primer
MLSA	Multilocus sequence analysis; multilokusová sekvenční analýza
MLST	Multilocus Sequence Typing; multilokusová sekvenční typizace
NK	Negativní kontrola
PCR	Polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce
SDS - PAGE	SDS Protein Acrylamide Gel. Electrophoresis; elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
T _m	Temperature melting; Teplota tání
UV	Ultraviolet; Ultrafialové

8 Seznam použité literatury

- 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., Vinatzer, B. A. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 2010, 100.3: 208–215.
- Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V., Quezado-Duval, A. M. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *Journal of applied microbiology*, 2012, 113.6: 1479–1490.
- Barak, M. E. M. Managing diversity: Toward a globally inclusive workplace. Sage Publications, 2016, ISBN 978-1-4833-86126.
- Beran, P., Mráz, I. Species-specific PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. *Crop protection*, 2013, 43: 213–215.
- 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., Gijsegem, F. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular microbiology*, 1996, 20.3: 681–683.
- Bouzar, H., Jones, J. K., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Scott, J. W. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology*, 1994, 84: 39–44.
- Constantin, E. C., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghem, C., De Vos, P., Cottyn, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology*, 2016, 65.5: 792–806.
- Cuppels, D. A., Louws, F. J., Ainsworth, T. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease*, 2006, 90: 451–458.
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A., Thomas, P. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 2014, 17: 151–166.
- Doidge, E. M. A. tomato canker. *Journal of the Department of Agriculture, Union of South Africa*, 1920, 1: 718–721.
- Doidge, E. M. A. tomato canker. *Annals of Applied Biology*, 1921, 7: 407–430.

- Dowson, D. W.** On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, 1939, 100: 177–193.
- Dye, D. W., Starr, M. P., Stolp, H.** Taxonomic clarification of *Xanthomonas vesicatoria* based upon host specificity, bacteriophage sensitivity, and cultural characteristics. *Journal of Phytopathology*, 1964, 51: 394–407.
- Dye, D. W.** Genus IX *Xanthomonas* Dowson 1939. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1978, 21: 153–177.
- Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., Schroth, M. N.** International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 1980, 59: 153–168.
- Fang, X., Li, J., Chen, Q.** One new method of nucleic acid amplification—loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Virologica Sinica*, 2008, 23.3: 167–172.
- Gardner, M. W., Kendrick, J. B.** Bacterial spot of tomato. *Journal of Agricultural Research*, 1921, 21: 123–156.
- Gardner, M. W., Kendrick, J. B.** Bacterial spot of tomato. *Phytopathology*, 1923, 13: 307–315.
- Hamza, A. A., Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Lefevre, P., Chiroleu, F., Fisher-Le Saux, M., Gagnevin, L., Pruvost, O.** MultiLocus Sequence Analysis and Amplified Fragment Length Polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35.3: 183–190.
- Hansen, F. G., Nielsen, J., Riise, E., Meyenburg, K.** The genes for the eight subunits of the membrane bound ATP synthase of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1981, 183.3: 463–472.
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., Ikedo, M.** (2005). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella. *FEMS microbiology letters*, 2005, 253: 155–161.
- Hayward, A. C., Waterston, J. M.** *Xanthomonas vesicatoria*. *CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, 1964, 20.
- Hayward, A. C.** Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Microbiology*, 1964, 27.2: 265–277.
- Hawwa, R., Aikens, J., Turner, R. J., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D.** Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase-like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2009, 488.2: 109–120.

- Helling, R. B., Goodman, H. M., Boyer, H. W.** Analysis of endonuclease R· EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *Journal of virology*, 1974, 14.5: 1235–1244.
- Henson, J. M., French, R.** The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual review of phytopathology*, 1993, 31.1: 81–109.
- Higgins, B. B.** The bacterial spot of pepper. *Phytopathology*, 1922, 12: 501–517.
- Illig, H., Schwerin, B.** Apparatus for electro-osmotic processes. U. S. Patent No 1,133,967, 1915.
- Johansson, B. G.** Agarose gel electrophoresis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 1972, 124: 7–19.
- Jones, J. B., Pohronezny, K. L., Stall, R. E., Jones, J. P.** Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology*, 1986, 76: 430–434.
- Jones, J. B.** Bacterial speck. *Compendium of Tomato Diseases*. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1991, 26–27
- Jones, J. B., Bouzar, H., Stall, R. E., Almira, E. C., Roberts, P. D., Bowen, B. W., Sudberry, J., Stricker, J., Chun, J.** Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50.3: 1211–1219.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., Schaad, N. W.** Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27.6: 755–762.
- Jun-Hai, N., Yue-rong, G., Jun-mei, Y., Qing-yun, L., Guang-sui, Y., Cun, W., Yu, R.** Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bacterial blight pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) in anthurium. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 142.4: 801–813.
- Kašička, V.** Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické Listy*, 1997, 91.5: 321–325.
- Koenraad, H., Van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J. B., Oosterhof, J.** Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *II International Symposium on Tomato Diseases 808*. 2007, 99–102.
- Kolmodin, L. A., Birch, D. E.** Polymerase Chain Reaction. In: *PCR Cloning Protocols*. Humana Press, 2002, 3–18.
- Kůdela, V., Novacky, A., Fucikovsky.** Rostlinolékařská bakteriologie. Academia, 2002, ISBN 80-200-0899-3.

Kufu, K. M., Cuppels, D. A. Development of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63.11: 4462–4470.

Lang, J. M., Langlois, P., Nguyen, M. H. R., Triplett, L. R., Purdie, L., Holton, T. A., Djikeng, A., Cruz V. C. M., Verdier, V., Leach, J. E. Sensitive detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola* by loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80.15: 4519–4530.

Lai, E., Davi, N. A., Hood, L. E. Effect of electric field switching on the electrophoretic mobility of single-stranded DNA molecules in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1989, 10.1: 65–67.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2012, 62.

Leite, R. P., Minsavage, G. V., Bonas, U., Stall, R. E. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60.4: 1068–1077.

Li, Y., Fan, P., Zhou, S., Zhang, L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 54–61.

Lindemann, J., Upper, C. D. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50.5: 1229–1232.

Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69.8: 5023–5028.

McGuire, R. G., Jones, J. B., Stanley, C. D., Cszinsky, A. A. Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and bacterial spot of tomato as influenced by nitrogen and potassium fertilization. *Phytopathology*, 1991, 81: 656–660.

McInnes, T. B., Gitaitis, R. D., Mccarter, S. M., Jaworski, C. A., Phatak, S. C. Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Disease*, 1988, 72: 575–579.

Moretti, C., Amatulli, M. T., Buonauro, R. PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Letters in applied microbiology*, 2009, 49.4: 466–471.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., Notomi, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 289.1: 150–154.

Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., Notomi, T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 2004, 59.2: 145–157.

- Mullis, Kary B.** Process for amplifying nucleic acid sequences. U. S. Patent No 4,683,202, 1987.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., Notomi, T.** Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clinical Chemistry*, 2001, 47.9: 1742–1743.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T.** Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16.3: 223–229.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U.** Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the hrp pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184.5: 1340–1348.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28.12: 63–63.
- Notomi, T., Hase, T.** Process for synthesizing nucleic acid. U. S. Patent No 6,410,278, Eiken kagaku kabushiki Kaina, 2002-06-25.
- Nzulu, 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., Kato, H.** 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 Tropica*, 2016, 153: 116–119.
- Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., Arsenijevic, M., Jones, J. B., Minsavage, G. V., Wang, J. F.** Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, 110.3: 285–292.
- Park, D. S., Shim, J. K., Kim, J. S., Lim, C. K., Shrestha, R., Hahn, J. H., Kim, H. G.** Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on rhs family gene sequences. *Microbiological research*, 2009, 164.1: 36–42.
- Parida, M. M., Santhosh, S. R., Dash, P. K., Tripathi, N. K., Saxena, P., Ambuj, S., Sahni, K. A., Lakshmana Rao, V. P., Morita, K.** Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44.11: 4172–4178.
- Pavlik, E.** Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 3. *Labor aktuell Czech*, 1999, 22–25.
- Pohronezny, K., Stall, R. E., Canteros, B. I., Kegley, M., Datnoff, L. E., Subramanya, R.** Sudden shift in the prevalent race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper fields in southern Florida. *Plant disease*, 1992, 76.2: 118–120.

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., Jones, J. B. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics*, 2011, 12.1: 146.

Primer-Explorer V5. PrimerExplorer V5 [online]. 2015 [cit. 2018-03-11]. Dostupné z: <http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>

Rabinow, P. Making PCR: A story of biotechnology. University of Chicago Press, 2011.

Rademaker, J. L., Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50.2: 665–677.

Ravnikar, M., Mehle, N., Gruden, K., Dreo, T. Real-time PCR. *Molecular Methods in Plant Disease Diagnostics: Principles and Protocols*, 2016, 28.

Ritchie, D. F., Averre, C. W. Bacterial spot of pepper and tomato. *The Plant Health Instructor*, 2000, 10.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Hoorn, G. T., Arnheim, N. Polymerase chain reaction. *Science*, 1988, 230: 1350–1354.

Schulte, R., Bonas, U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174.3: 815–823.

Seki, M., Kilgore, P. E., Kim, E. J., Ohnishi, M., Hayakawa, S., Kim, D. W. Loop-Mediated Isothermal Amplification Methods for Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Frontiers in Pediatrics*, 2018, 6: 57.

Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook, J. Detection of two restriction endonuclease activities in *H. parainfluenzae* using analytical agaroseethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*. 1973, 12: 3055-3063.

Smith, R. P., Udseth, H. R., Olivares, J. A. Combined electrophoresis-electrospray interface and method. U. S. Patent No 4,885,076, 1989.

Song, T., Toma, C., Nakasone, N., Iwanaga, M. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243.1: 259–263.

Stall, R. E., Jones, J. B., Minsavage, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47: 265–284.

Stephens, W. L., Starr, M. P. Localization of carotenoid pigment in the cytoplasmic membrane of *Xanthomonas juglandis*. *Journal of Bacteriology*, 1963, 86.5: 1070–1074.

Strayer, A., Paret, M. L., Jones, J. B., Jeyaprakash, A. Multiplex qPCR assay for detecting the four causal agents of bacterial spot of tomato. *Phytopathology*, 2014, 3340: 114–115.

- Strayer, A. L., Jeyaprakash, A., Minsavage, G. V., Timilsina, S., Vallad, G. E., Jones, J. B., Paret, M. L.** A multiplex real-time PCR assay difentiates four *Xanthomonas* species associated with bacterial spot of tomato. *Plant Disease*, 2016, 100: 1660–1668
- Sun, X., Nielsen, M. C., Miller, J. W.** Bacterial Spot of Tomato and Pepper. *Plant Pathology*, 2002
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.** Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita, Brno, 2005, 54–55.
- Temple T. N., Stockwell V. O., Johnson K. B.** Development of a rapid detection method for *Erwinia Amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (Lamp). *Acta Horticulturae (ISHS)*, 2008, 793: 497–503.
- Tiselius, A.** A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*, 1937, 33: 524–531.
- Vallad, G., Pernezny, K., Momol, T.** A Series on Diseases in the Florida Vegetable Garden: Tomato. [Online] 2004 [cit. 2018-03-30]. University of Florida Plant Pathology Department. Dostupné z: http://www.growables.org/informationVeg/documents/Disease_SeriesTomatoEdis.pdf
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J.** Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995, 45.3: 472–489.
- Wang, D., Brewster, J. D., Paul, M., Tomasula, P. M.** Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*, 2015, 20.4: 6048–6059.
- Westermeier, R.** Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. *John Wiley & Sons*, 2016.
- Woźniakowski, G., Kozdruń, W., Samorek-Salamonowicz, E.** Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Virology Journal*, 2012, 9.1: 110.
- Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., Fargier, E.** A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied microbiology*, 2008, 31.5: 366–377.
- Zhang, X., Lowe, S. B., Gooding, J. J.** Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 61: 491–499