



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Bakalářská práce

Detekce bakterií rodu *Xanthomonas* patogenních pro rajče a papriku
metodou multiplex PCR

Autorka práce: Mariia Ragozina

Vedoucí práce: Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.

Konzultant práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.

České Budějovice

2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce je optimalizace multiplex PCR pro detekci patogenních bakterií rodu *Xanthomonas*. S použitím primerových párů Bs-Xg (Koenraad et al., 2007), Bs-Xp (Koenraad et al., 2007), Xe_330CG1,2 (Stehlíková a Beran, nepublikováno) a Xv_367CG1-1,9 (Stehlíková a Beran, nepublikováno) byla úspěšně optimalizována multiplex PCR reakce pro detekci *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas euvesicatoria* a *Xanthomonas vesicatoria* v jedné reakci. Vybrané primerové páry byly testované na rozsáhlém souboru jiných bakterií patogenních pro rajče a papriku.

Klíčová slova: *Xanthomonas vesicatoria*, *euvesicatoria*, *gardneri*, *perforans*, multiplex PCR

Abstract

The subject of this work is the optimization of multiplex PCR for the detection of pathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas*. Were successfully managed to optimized multiplex PCR reaction for simultaneous detection of *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas euvesicatoria*, and *Xanthomonas vesicatoria* using four primer pairs: Bs-Xg (Koenraad et al., 2007), Bs-Xp (Koenraad et al., 2007), Xe_330CG1,2 (Stehlíková a Beran, unpublished) and Xv_367CG1-1,9 (Stehlíková a Beran, unpublished). The selected primer pairs were also tested on a wide scale of other bacteria of *Xanthomonas* genus and non-*Xanthomonas* pathogens for tomatoes and peppers.

Key words: *Xanthomonas vesicatoria*, *euvesicatoria*, *gardneri*, *perforans*, multiplex PCR

Obsah

Úvod.....	5
1. Literární přehled.....	6
1.1. Fytopatogenní bakterie rodu <i>Xanthomonas</i>	6
1.1.1. Morfologie.....	6
1.1.2. Klasifikace.....	6
1.1.3. Rozšíření	7
1.1.4. Hostitelé	8
1.1.5. Symptomy	8
1.1.6. Metody ochrany a prevence	9
1.2. Použité metody.....	11
1.2.1. PCR	11
1.2.2. Multiplex PCR	14
1.2.3. Gelová elektroforéza	16
1.2.4. Čipová elektroforéza	17
2. Cíl práce	18
3. Materiál a metody	19
3.1. Bakteriální kmeny	19
3.2. Primery.....	20
3.3. Singleplex PCR.....	21
3.4. Multiplex PCR	21
3.5. Gelová elektroforéza	22
3.6. Čipová elektroforéza	22
4. Výsledky	23
4.1. Bakteriální kmeny	23
4.2. Primery.....	23
4.3. Multiplex PCR	26
5. Diskuse.....	29
Závěr	32
Seznam použité literatury.....	33
Seznam obrázků	39
Seznam tabulek	40
Seznam použitých zkratk.....	41

Úvod

Bakteriální skvrnitost byla poprvé popsána u rajčat (*Lycopersicum spp.*) v roce 1914 v Jižní Africe. Původní bakterie byla popsána pod názvem *Bacterium vesicatorium* (Doidge, 1920).

V současné době bakteriální skvrnitost rajčat a paprik (*Capsicum spp.*) je celosvětově rozšířeným problémem. Fytopatogen působí velké ekonomické ztráty napadených plodin, které není možné uplatnit na trhu. Pro kontrolu rozšíření tohoto onemocnění je zejména důležitá včasná a spolehlivá detekce patogenu v primárním inokulu, tedy v kontaminovaném osivu. (Potnis et al., 2015; Cuppels a Abbasi, 2013).

Hlavními původci bakteriální skvrnitosti rajčat a paprik jsou především fytopatogenní bakterie rodu *Xanthomonas*, a konkrétně druhy: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri* a *Xanthomonas perforans* (Jones et al., 2004). Pro detekci výše uvedených patogenů lze použít moderní molekulární metodu multiplex PCR. Tato metoda umožňuje rychlou detekci všech čtyř bakteriálních druhů v jedné reakční směsi. Pro spolehlivý výsledek reakce je ale důležité použít specifické primery a optimalizovat podmínky reakce (Araújo et al., 2012). Předmětem této bakalářské práce je optimalizace podmínek reakce singleplex a multiplex PCR jak pro současnou tak i samostatnou detekci bakteriálních druhů *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* a *X. perforans*.

1. Literární přehled

1.1. Fytopatogenní bakterie rodu *Xanthomonas*

1.1.1. Morfologie

Bakterie rodu *Xanthomonas* jsou nesporulující, tyčinkovité, gramnegativní bakterie o přibližné velikosti 0,4-0,6 x 1,0-1,8 μm . Jsou schopné pohybu a mají jeden polární bičík. Mají aerobně respirační metabolismus a vyžadují přítomnost kyslíku.

Celý bakteriální rod *Xanthomonas* je charakteristický produkcí žlutého pigmentu xanthomonadinu a exopolysacharidu xanthanu. Většina druhů tvoří žluté hladké mukoidní kolonie. Některé druhy, například *X. vesicatoria*, mají pektinolytickou aktivitu. Nevytváří poly- β -hydroxybutyrátové inkluze (Kúdela et al., 2002). Optimální teplota růstu je mezi 25 a 30 °C. (Bradbury, 1984)

1.1.2. Klasifikace

Druhy *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas perforans* a *Xanthomonas gardneri* jsou považované za hlavní původce bakteriální skvrnitosti rajčat (*Lycopersicum spp.*) a paprik (*Capsicum spp.*) (Potnis et al., 2015).

Tyto fytopatogenní kmeny byly považovány za jednu skupinu až do poloviny 90. let 20. století, kdy nezávislé studie prokázaly, že *Xanthomonas campestris* se skládala ze dvou geneticky a fenotypově odlišných skupin A (*X. euvesicatoria*) a B – (*X. vesicatoria*) (Vauterin et al., 1995). Dva další patogenní kmeny byly později charakterizovány jako skupina D, do které patřila *X. gardneri*, a skupina C, zahrnující *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, rozdělené na základě DNA–DNA hybridizací, testování patogenity, analýzy 16S rRNA a analýzy restričních fragmentů celého genomu (Jones et al., 2000). Na základě výsledků DNA–DNA hybridizace bylo zjištěno, že bakteriální skvrnitost je způsobena čtyřmi různými druhy: *X. euvesicatoria* (skupina A), *X. vesicatoria* (skupina B), *X. perforans* (skupina C) a *X. gardneri* (skupina D) (Jones et al., 2004).

Taxonomie původců bakteriální skvrnitosti rajčat a paprik však stále není plně vyřešena. Výsledky multilokusové sekvenční analýzy (MLSA) naznačují úzký fylogenetický vztah mezi *X. perforans* a *X. euvesicatoria*. Almeida et al. (2010) navrhnul použití šesti housekeeping genů (*fusA*, *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *lacF* a *lepA*) pro rozlišování mezi druhy *Xanthomonas*. U kmenů byly pozorovány mnohonásobné

rekombinace v genech mezi kmeny *X. euvesicatoria* a *X. perforans* (Timilsina et al., 2015). Na základě celogenomové sekvenční analýzy Barak et al. (2016) navrhli, že kmeny *X. euvesicatoria* a *X. perforans* by měly být seskupeny do jednoho druhu *X. euvesicatoria*. Constantin et al. (2016) v rámci taxonomické revize *X. euvesicatoria* pomocí MLSA byla navržena reklasifikace těchto druhů na patovary: *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* a *X. euvesicatoria* pv. *perforans*.

Další taxonomický výzkum byl věnován *X. gardneri*. Byla zjištěna sekvenční shoda *Xanthomonas cynarae*, která je patogenní pro artyčoky (*Cynara spp.*), s *X. gardneri* (Timilsina et al., 2019).

1.1.3. Rozšíření

Bakterie rodu *Xanthomonas* z infikované rostliny mají několik možných způsobů šíření:

- mohou infikovat primární nebo alternativní hostitelské rostliny přes vektory;
- mohou přežívat různé časové období v životaschopném nebo alespoň obnovitelném stavu v osivu a na jiných sklizených částech rostliny;
- mohou se dostat do půdních nebo povrchových vod, když všechny zbytky infikované rostliny odumrou nebo jsou sklizeny (Starr, 1981).

Faktory prostředí, které usnadňují rozptýlení patogenů, mohou určovat, proč jsou náchylné plodiny v některých oblastech běžně infikovány, ale v jiných zůstávají bez patogenů. Bakterie rodu *Xanthomonas* se šíří lépe při mírně vyšších teplotách a jsou schopny dosáhnout dostatečně vysokého množství inokula v hostiteli. Kromě toho bylo zjištěno, že pro epifytické přežití a přenos je vyžadována vysoká vlhkost. V těchto podmínkách vysoké množství bakterií na povrchu napadeného hostitele bude velmi významným zdrojem inokula pro rozšíření a pro epifytické přežití bakterií po vniknutí do listu nového hostitele (An et al., 2020).

Původci bakteriální skvrnitosti rajčat a papriky jsou rozšířeny celosvětově. Bakterie rodu *Xanthomonas* byli zaznamenány v pěstitelských oblastech v Africe, Asii, Evropě, severní a jižní Americe a oceánii (Cabi.org). Velké rozšíření v různých zeměpisných regionech je pravděpodobně způsobováno transportem s kontaminovaným osivem (Kebede et al., 2014).

V České Republice patogen škodí především v oblasti centrální a jižní Moravy a v Středočeském kraje (Kůdela et al., 2002; Beran et al., 2015).

1.1.4. Hostitelé

Všechny dosud známé bakterie rodu *Xanthomonas* jsou fytopatogenní. Vyskytují se pouze s živými rostlinami nebo rostlinným materiálem (Kůdela et al., 2002).

Hostitelské spektrum bakterií rodu *Xanthomonas*, způsobujících bakteriální skvrnitost, zahrnuje širokou škálu rostlin, které patří do čeledi *Solanaceae*, ale hlavně rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*), lilek rajčete (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), divoké rajče rybízové (*Solanum pimpinellifolium*), paprika setá (*Capsicum annuum*) a chilli paprika (*Capsicum frutescens*) (Potnis et al., 2015).

1.1.5. Symptomy

Bakterie rodu *Xanthomonas* mohou napadat všechny nadzemní části rostliny. Je třeba dbát na zaznamenání prvních příznaků a včas detekovat infekci (Sun et al., 2002).

Na listech rajčat tyto patogeny produkují nepravidelné, tmavě hnědé až černé léze, které mají tendenci se soustředit na okraje a špičky listů. Na paprice jsou první příznaky onemocnění malé, nazelenalé, vodnaté léze, které se nakonec mohou vyvinout do velké, hranaté, vodou nasáklé, hnědé léze. Silně infikované rostliny se defoliují. Na plodech rajčat jsou léze tmavě hnědé až černé, mohou dosáhnout průměru 4-6 mm a někdy jsou pokryty strupy. Na plodech papriky bakterie rodu *Xanthomonas* tvoří světle hnědé léze se zdrsňeným vzhledem (Obr. 1) (Cuppels a Abbasi, 2013).



Obrázek 1: Symptomy bakteriální skvrnitosti rajčat a paprika na listech (A) a plodech (B). (Potnis et al., 2015)

Ačkoli skvrny zůstávají malé a nepronikají velmi hluboko do plodů, velké množství takových skvrn značně snižuje kvalitu sklizně. Různé sekundární patogeny jako houby a jiné bakterie mohou kolonizovat léze a způsobit hnilobu (Sun et al., 2002).

Patogen způsobí velmi značné škody při napadení listu a plodu, zvláště u mladých semenáčků. Poškozené plody, které není možné uplatnit na trhu, přinášejí pěstitelům velké ekonomické ztráty (Kúdela et al., 2002).

1.1.6. Metody ochrany a prevence

Bakteriální původci skvrnitosti rajčat a paprik, *X. vesicatoria* a *X. euvesicatoria*, jsou v rámci Evropské unie karanténní organismy (EPPO/CABI, 1997).

Kontaminované osivo je považováno za primární zdroj inokula pro bakteriální skvrnitost rajčat a papriky (Cuppels a Abbasi, 2013). Běžné ošetření osiva lze použít ke snížení nebo odstranění patogenů. Mezi tyto základní způsoby boje s infekcí patří termoterapie, kyselé moření, chlorování (Cuppels, 2004).

Nejvíce účinná proti bakteriální skvrnitosti je včasná prevence. Detekce patogenu v semenech a semenáčcích hraje klíčovou roli pro snížení potenciálních zdrojů inokula (Potnis et al., 2015).

Dalším možným způsobem eliminace patogenních bakterií rodu *Xanthomonas* může být šlechtění na rezistenci. Generace odrůd odolných vůči chorobám je jedním z nejúčinnějších, udržitelných a šetrných k životnímu prostředí. Odolnost rostlin nebo náchylnost k určitým patogenům je dědičná vlastnost. Různé geny pro rezistence vůči bakteriálnímu rodu *Xanthomonas* byly identifikovány v rostlinách. Odolnost vůči patogenům je hlavní vlastnost, kterou je třeba vzít v úvahu při šlechtění nových odrůd (An et al., 2020).

Měďnaté přípravky také vykazují velký úspěch. Více než století byly antimikrobiální sloučeniny na bázi mědi hlavními chemickými činidly, využívanými v boji proti bakteriím rodu *Xanthomonas*. V současné době se široce používá aplikace měděných přípravků, kdy jsou stále považovány za nejúčinnější prostředek pro eliminaci bakteriálních onemocnění (Lamichhane et al. 2018).

Zájem o využití bakteriofágů jako alternativa k mědi vznikl v posledních dvou desetiletích. Mnoho studií bylo věnováno identifikaci bakteriofágů a jejich využití proti bakteriálním patogenům (Buttimer et al. 2017). Bylo skutečně zjištěno, že bakteriofágy jsou velmi účinné při potlačení patogenních bakterií rodu *Xanthomonas*, způsobujících bakteriální skvrnitost rajčat (Obradovic et al., 2004).

1.2. Použité metody

1.2.1. PCR

PCR, neboli polymerázová řetězová reakce, je základní molekulární metoda, velmi často používaná pro detekci fytopatogenních bakterií. Objevitelem této metody byl Kary B. Mullis, který v roce 1993 za její vývin získal Nobelovou cenu za chemie (Mullis, 1994). Metoda byla popsána jako enzymatická amplifikace DNA *in vitro* a znamenala velký pokrok v molekulární diagnostice (Mullis et al., 1986). Základní princip replikace DNA pomocí dvou primerů však již před tím byl popsán Kleppe et al. (1971), ale tehdy byl progres omezen nemožností syntézy primerů a problematikou purifikace polymerázy.

Historicky druhy organismů byly popisovány a charakterizovány na základě morfologických kritérií, které jsou úzce spojeny s podmínkami prostředí. Potřeba porozumět molekulárním mechanismům u druhů učinila z PCR nepostradatelný nástroj pro pochopení fungování těchto biologických systémů (Kadri, 2020). PCR také umožňuje identifikaci nekultivovatelných nebo pomalu rostoucích mikroorganismů, jako jsou mykobakterie, anaerobní bakterie nebo viry z tkáňových kultur a zvířat (Rahman et al., 2013).

PCR je velmi citlivá technika, která umožňuje rychlou amplifikaci specifického úseku DNA (Garibyan a Avashia, 2013). PCR umožňuje získat replikací *in vitro* více kopií fragmentu DNA (Kadri, 2020). Počet amplifikovaných kopií exponenciálně roste, což umožňuje během několika hodin získat studovaný úsek DNA ve více než 100 miliardách kopií (Mullis, 1990).

V současné době je PCR běžnou a často nepostradatelnou technikou používanou ve výzkumných laboratořích pro různé aplikace. Dokonce i další techniky, jako jsou DNA čipy, často vyžadují amplifikaci DNA pomocí PCR jako nezbytný předběžný krok. Polymerázová řetězová reakce je používána širokým spektrem vědců ve stále se zvyšující škále vědeckých disciplín (Joshi & Deshpande, 2010).

Principem PCR je zjednodušená verze replikačního procesu DNA, ke kterému dochází během buněčného dělení ve všech živých organismech. Základní proces PCR se skládá ze tří kroků, cyklicky se opakujících během reakce: denaturace cílové DNA, annealing – nasednutí syntetických oligonukleotidových primerů, a prodlužování nového řetězce DNA polymerázou neboli elongace (Lo a Chan, 2006).

Prvním krokem je denaturace, která se provádí při teplotě 94 °C přibližně 1–2 minuty. Dvoušroubovice DNA, která slouží jako matrice během replikace, je za těchto podmínek denaturována. Vodíkové vazby nemohou být udržovány při teplotě vyšší než 80 °C a dvouvláknová DNA je denaturována do jednovláknové DNA (Kadri, 2020).

Fáze annealingu probíhá při nižší teplotě, 50–60 °C a kratší dobu, 30–60 sekund. To umožňuje primerům hybridizovat k jejich příslušnému komplementárnímu templátu. (Joshi & Deshpande, 2010). Čím vyšší je teplota hybridizace, tím selektivnější a specifitější je nasednutí primeru.

Třetí krok, elongace, se provádí při teplotě 72°C. Jedná se o syntézu komplementárního řetězce. Při teplotě 72 °C se *Taq* polymeráza váže na primární jednovláknovou DNA a katalyzuje replikaci pomocí deoxyribonukleosidtrifosfátů přítomných v reakční směsi (Kadri, 2020). Nově vytvořený řetězec DNA primeru připojeného k templátu je pak používán k vytvoření identických kopií z původního vlákna. Syntéza nových řetězců *Taq* polymerázou trvá přibližně 2–5 minut.

Častou příčinou neúspěchu PCR může být nedostatečná denaturace templátu DNA. Pro vyloučení tohoto problému, před zahájením cyklické části PCR je zařazena počáteční denaturace při teplotě 94°C po dobu 8 minut (Lo & Chan, 2006). Po posledním cyklu obvykle následuje závěrečná elongace při teplotě 72 °C po dobu 5 minut (Joshi & Deshpande, 2010).

Pro správný průběh reakce PCR vyžaduje několik základních komponent.

- DNA templát
- pár primerů, které určují začátek a konec amplifikované oblasti (forward a reverse)
- termostabilní *Taq* polymeráza
- volné nukleotidy, ze kterých bude DNA-polymeráza syntetizovat novou DNA
- pufr, který poskytuje vhodné chemické prostředí pro DNA-polymerázu, jako jsou pH a iontová síla roztoků (Rahman et al., 2013).

Reakce probíhá obvykle v objemu mezi 10 a 100 µl (Kadri, 2020).

Pro úspěšný výsledek reakce je třeba dát pozor na dvě kritické složky PCR. První je templát nukleové kyseliny, který by měl mít dostatečnou kvalitu a neobsahovat žádné inhibitory *Taq* DNA polymerázy. Druhým důležitým faktorem je výběr oligonukleotidových primerů. Tento proces je často rozhodující pro celkový úspěch

PCR, protože bez funkční sady primerů není možné získat požadovaný produkt ačkoliv výběr jedné sady primerů může být docela triviální, návrh primerových sad pro komplikovanější metodiky, jako je multiplex PCR nebo Nested PCR je náročnější (Dieffenbach et al., 1993)

Fragment DNA, který má být amplifikován, je určen vhodnými primery. Primery jsou krátké, umělé řetězce DNA (obvykle 18-25 NT), které jsou komplementární k začátku a konci zkoumaného fragmentu DNA. Primery nasedají k DNA templátu v tom místě, kde se DNA-polymeráza pak naváže a začne syntetizovat nový řetězec DNA (Rahman et al., 2013). Takovým způsobem, sekvence primerů používaných pro amplifikaci PCR bude mít přímý vliv na specificitu a citlivost reakce.

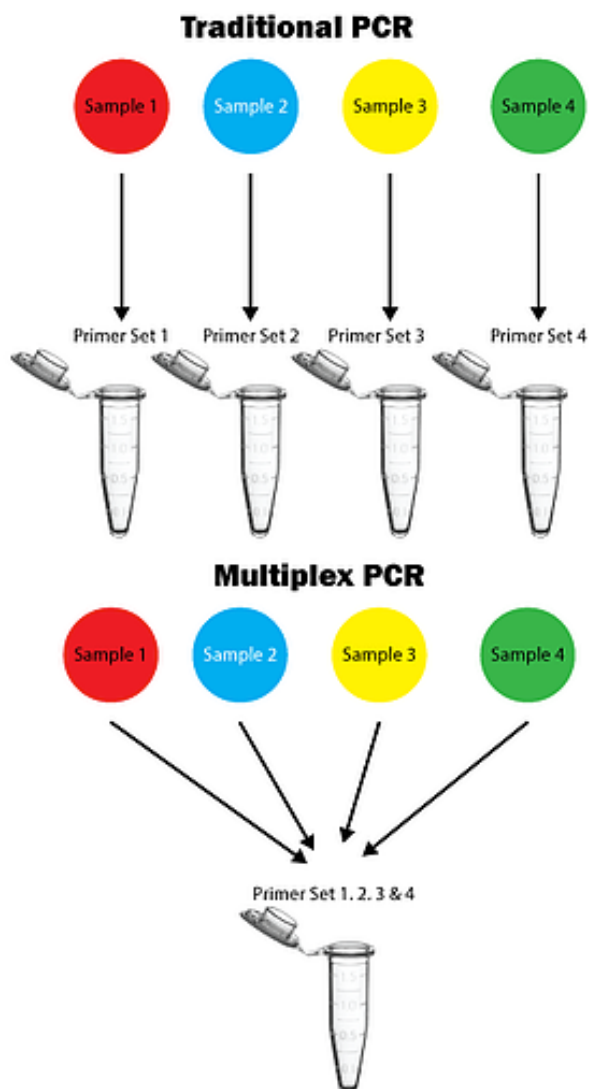
Při návrhu primerů pro PCR reakce je třeba vzít v úvahu následující kritéria:

- Délka primerů. Pro široké spektrum studií jsou nejvhodnější primery o délce typicky 18-30 nukleotidů. Primery by měly mít délku nejméně 18 nukleotidů, aby se minimalizovala pravděpodobnost výskytu problémů se sekundárním hybridizačním místem.
- Teplota tání (T_m). Optimální teploty tání pro primery jsou v rozmezí 52-58°C (Abd-Elsalam, 2003).
- Obsah GC. Procentuální obsah GC bází je důležitou charakteristikou DNA a poskytuje informace o síle annealingu. Primery by měly mít obsah GC mezi 45 a 60 % (Dieffenbach et al., 1993).
- 3' konec sekvence. Je prokázáno, že 3' konec v sekvenci PCR primeru je nezbytný pro kontrolu mis-primingu. Primery by měly být "lepivější" na svých 5' koncích než na jejich 3' koncích (Kwok et al., 1990).
- Specificita. Správný primerový pár nesmí být komplementární k jakémukoliv jinému než zkoumanému místu na DNA templátu (Abd-Elsalam, 2003).

Jednou z hlavních výhod procesu PCR je možnost automatizace. Dnes je na trhu dostupná celá řada termocyclerů od různých výrobců. Tyto termocyklery se liší konstrukcí chladicích systémů, kapacitou jamek pro vzorky, počtem tepelných bloků, programovou pamětí a tepelnou rovnoměrností. Většina termocyklerů má dnes vyhřívaná víka. Jsou také široce používané termocyklery se zařízením pro změření absorbance vlnové délky fluorescentních barviv během reakce, například při používání real-time PCR. (Weier a Gray, 1988; Higgins et al., 2003; Wheeler et al., 2004).

1.2.2. Multiplex PCR

Multiplex PCR je varianta polymerázové řetězové reakce, ve které mohou být dvě nebo více cílových sekvencí amplifikovány zahrnutím více než jednoho páru primerů do stejné reakce (Obr. 2). Multiplex PCR přináší v laboratoři značné úspory času a práce (Markoulatos et al., 2002). Metoda byla poprvé popsána Chamberlain et al. (1988) a využita pro detekci delece v genu pro dystrofin. Dalším významným využitím bylo studium Hayden et al. (2008) zaměřené na sledování mikrosatelitů a SNP. Tato metoda má velký potenciál nejen v diagnostice bakteriálních fytopatogenů, ale i například při biomedicínských výzkumech bakterií a virů.



Obrázek 2: Porovnání klasické PCR reakce a multiplex PCR.

(www.info.gbiosciences.com)

Ng et al. v roce 2001 popsali multiplex PCR test pro detekci 14 různých genů rezistence na tetracyklin na 25 klinických izolátech *Salmonella enterica serovar Typhimurium* DT104. Multiplex PCR měla za následek značné úspory z hlediska práce a nákladů při analýze velkého počtu kmenů ve srovnání s použitím individuální PCR cílené na každý z genů.

Dnes různí výrobci nabízejí hotové multiplex PCR kity. Často je popisují jako "ready-to-use", neboli "není nutná žádná optimalizace". Zatímco toto obvykle platí pro činidla, jako jsou pufrы (včetně koncentrací KCl a MgCl₂), dNTPs nebo DNA polymerázy, a je stále nutné optimalizovat koncentraci primeru nebo podmínky cyklování, aby se podařilo dosáhnout vyvážených a stabilních reakcí (Sint et al., 2012)

Nicméně, optimalizace multiplex PCR testů je náročná, protože zahrnuje rozsáhlé analýzy, je nutné vymezit nežádoucí interakce mezi různými páry primerů (Rachlin et al., 2005). Při plánování multiplexního systému by měly být primery kontrolovány ještě během návrhu ve všech kombinacích, aby se zabránilo potenciální tvorbě křížových dimerů. Kromě toho, musí být teploty tání vybalancovány pro všechny primery, aby se dosáhlo rovnoměrné účinnosti amplifikace (Sint et al., 2012).

Jedním z nejdůležitějších konceptů v multiplex PCR je také optimální poměr primerů k templátu. Pokud je poměr příliš vysoký, vytvářejí se dimery primerů, které se také vyskytují i v podmínkách velmi zředěné DNA nebo přebytečného množství primerů (Markoulatos et al., 2002).

Díky velkému pokroku v bioinformatice, návrh primerů pro multiplex PCR lze provést pomocí jednoduchých a spolehlivých softwarů. Jedním z takových programů je MPprimer, který byl speciálně vyvinut pro spolehlivý návrh multiplex PCR primerů. Hlavním úkolem tohoto softwaru je ohodnocení primerů na základě genomických nebo transkripčních DNA databází, a následné otestování pro zabránění primerové dimerizace. Kromě toho MPprimer poskytuje virtuální elektroforeogram, který umožňuje snadno vybrat nejlepší primerové páry (Shen et al., 2010).

Multiplex PCR má také svoje modifikace. Moderní metodika Anchored Multiplex PCR (AMP) pro cílový next-generation sequencing (NGS) byla poprvé popsána ve výzkumu Zheng et al. (2014), kdy tato metodika byla použita k identifikaci nových terapeuticky důležitých genových fúzí: v glioblastomu, u rakoviny plic, cholangiokarcinom a karcinom štítné žlázy. AMP je efektivní v detekci genových přestaveb (bez předchozí znalosti fúzových párů), single nucleotide variants (SNV), insercí, delecí a změn v počtu kopií zejména v oblasti klinického výzkumu.

Často používaná je také real-time multiplex PCR. Pro eliminaci falešného signálu fluorescenčního barviva kvůli nespecifickým produktům a dimerizaci primerů, při real-time multiplex PCR se nejvíc používají fluorogenní oligosondy (Mackay, 2002). TaqMan multiplex PCR je široce využíván pro detekci fytopatogenních kmenů bakterií. Studie Weller et al. (2000) ukázaly skvělé výsledky pro detekci kmenů *Ralstonia solanacearum*, způsobující hnědou hnilobu rostlin. Postup byl hodnocen jako velmi rychlý, automatizovaný a měl vysokou citlivost.

1.2.3. Gelová elektroforéza

Elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu je standardní metoda používaná k oddělení, identifikaci a purifikaci nukleových kyselin. Je to velmi jednoduchá a vysoce účinná metoda. Podstatou metody je schopnost DNA pohybovat se ke kladnému náboji v elektrickém poli (Voytas, 1992; Barril a Nates, 2012).

Agaróza je izolovaná z mořských řas rodů *Gelidium* a *Gracilaria* a skládá se z opakovaných agarobiosových podjednotek (L- a D-galaktóza) (Kirkpatrick, 1991). Během gelace se agarózové polymery spojují nekovalentně a tvoří síť, která funguje jako molekulární síť.

Rychlost migrace DNA molekuly prostřednictvím gelu je určena:

- velikostí molekuly DNA;
- koncentrací agarózového gelu;
- DNA konformací;
- silou napětí (Lee et al., 2012).

Lokalizace DNA v agarózovém gelu lze určit přímo pomocí barvení nízkou koncentrací interkalačního činidla a následně vizualizovat pod ultrafialovým světlem (Barril a Nates, 2012).

Agarózový gel je nejvíce používaný pro separaci nukleových kyselin kvůli jednoduchosti, má vysokou separační schopnost, ale relativně nízkou rozlišovací schopnost kvůli velikosti pórů (Barril a Nates, 2012). Ačkoli polyakrylamidové gely jsou obecně více obtížné na přípravu, mají významné výhody oproti agarózovému gelu. Mají větší rozlišovací schopnost a DNA získaná z polyakrylamidových gelů je velmi čistá (Guilliatt, 2002).

1.2.4. Čipová elektroforéza

Gelová elektroforéza se obvykle používá pro separaci PCR produktů, ale technika má několik nedostatků a nízkou schopnost kvantitativní analýzy. Čipová elektroforéza má vyšší citlivost, vysokou přesnost a rychlost pro určení velikosti produktu PCR (Xu et al., 2004).

U čipové elektroforézy jsou PCR produkty transportovány pneumatickou mikropumpou do zásobníku vzorku. Vzorky jsou následně elektrokineticky vedeny do mikrokanálu, kde jsou separovány a pak opticky vizualizovány (Huang et al., 2006).

Zařízením pro takovou analýzu může být elektroforézní systém MultiNa (Shimadzu, Japonsko). Tento přístroj používá až čtyři mikročipy paralelně pro elektroforézu vzorků DNA nebo RNA ve formátu desky. Přičemž, velkou výhodou systému je možnost zobrazení výsledků hned po každém vzorku, bez nutnosti vyčkat na plné ukončení separace cele desky, jak to je u gelové elektroforézy. Detekce nukleové kyseliny probíhá pomocí SYBR Gold barviva a výsledky jsou zobrazeny jako digitální elektroforeogram (Bekaert et al., 2009).

2. Cíl práce

Hlavním cílem této bakalářské práce byl výběr ideálních podmínek pro správnou a spolehlivou detekci čtyř různých bakteriálních druhů rodu *Xanthomonas* patogenních pro rajče a papriku – *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* a *X. perforans* současně v jedné reakci pomocí molekulární metody multiplex PCR s následnou vizualizací s použitím elektroforetických technik. Dílčími cíli byla optimalizace singleplex PCR nově navřených primerů i dříve publikovaných.

3. Materiál a metody

3.1. Bakteriální kmeny

V této práci byly použity bakteriální izoláty *Xanthomonas* z následujících sbírek: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Collection Francaise de Bactéries Phytopathogènes v Beaucouzé (CFBP) a Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms v Gentu (BCCM/LMG), Česká sbírka mikroorganismů v Brně (CCM), National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP), Horticulture Research International ve Wellesborne (HRI-W), National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM), Crop Research Institute Collection (CRI), Collections of Phytopathogenic Microorganisms of RICP (CPP) (Tab. 1). Před samotným testováním byla u všech izolatů změřena koncentrace DNA na spektrometrickém zařízení NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA) a naředěna na 50 ng/μl.

Číslo vzorků	Bakterie	Sbírka	Číslo sbírky	Naměřená koncentrace (ng/μl)
<i>Xanthomonas gardneri</i>				
1	<i>X. gardneri</i>	DSMZ	19127	67,19
2	<i>X. gardneri</i>	CFBP	8588	111,34
3	<i>X. gardneri</i>	CFBP	7992	65,42
4	<i>X. gardneri</i>	CFBP	8120	52,96
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>				
5	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	667	13,58
6	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	668	670,46
7	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	909	54,68
8	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	922	228,46
9	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	933	311,51
10	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	918	683,95
11	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	927	618,49
12	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	BCCM/LMG	928	657,89
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>				
13	<i>X. vesicatoria</i>	BCCM/LMG	916	139,59
14	<i>X. vesicatoria</i>	BCCM/LMG	919	553,11
15	<i>X. vesicatoria</i>	BCCM/LMG	920	103,69
16	<i>X. vesicatoria</i>	BCCM/LMG	925	338,24
17	<i>X. vesicatoria</i>	BCCM/LMG	934	334,65
18	<i>X. vesicatoria</i>	CFBP	2537	141,39
19	<i>X. vesicatoria</i>	CFBP	6827	117,55
<i>Xanthomonas perforans</i>				
20	<i>X. perforans</i> 9.2	CFBP	7293	99,89
21	<i>X. perforans</i> 9.2	CFBP	8122	153,21
22	<i>X. perforans</i> 9.2	CFBP	8004	28,74
23	<i>X. perforans</i>	DSMZ	18975	39,73
Jiné <i>Xanthomonas</i>				
24	<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>alfalfae</i>	CFBP	3836	81,56

25	<i>X. arboricola</i> pv. <i>populi</i>	CFBP	3123	155,05
26	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>allii</i> 9.2	CFBP	6369	147,84
27	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>carotoae</i>	NCPPB	3440	16,27
28	<i>X. campestris</i> pv. <i>incanae</i>	HRI-W	6377	70,61
29	<i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	NCAIM	B.01695	32,59
30	<i>X. campestris</i> pv. <i>pisi</i>	NCAIM	B.01393	100,27
31	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	HRI-W	8503	740,29
32	<i>X. citri</i> pv. <i>glyccines</i> 9.5	CFBP	2526	139,46
33	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	CFBP	2286	106,32
Non Xanthomonas				
34	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	CCM	2835	346,46
35	<i>Burkholderia glumae</i>	BCCM/LMG	2196	39,94
36	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CCM	1247	73,17
37	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	BCCM/LMG	5093	343,11
38	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NCPPB	2859	1447,48
39	<i>Erwinia amylovora</i>	CCM	1133	11,89
40	<i>Ralstonia solanacearum</i>	CRI	2306	3842,33
41	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CPP	1075	853,06
42	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>supedonicus</i>	NCPPB	3467	60,11
43	<i>Pantoea agglomerans</i>	CFBP	3845	75,51

Tabulka 1: Seznam použitých bakteriálních kmenů

3.2. Primery

Doporučené primerové páry (Tab. 2) byly nejprve testovány samostatně v teplotním gradientu annealingu 55 - 66 °C. Na základě vhodné teploty, velikosti produktu a specificity pro multiplex PCR byly vybrány následující primery: Xe_330CG1,2 (Stehlíková a Beran, nepublikováno), Xv_367CG1-1,9 (Stehlíková a Beran, nepublikováno), Bs-Xg (Koenraadt et al., 2007), Bs-Xp (Koenraadt et al., 2007).

Název primeru	Sekvence forward	Sekvence reverse	Velikost produktu	Autor
<i>X. gardneri</i>				
Bs-Xg	TCAGTGCTTAGT TCCTCATTGTC	TGACCGATAA AGACTGCGAA AG	154 bp	Koenraadt et al., 2007
XgM_hrpB	CGGGGTGCAGG TCAGC	ACCGGCACCG CCAAG	200 bp	Stehlíková et al., 2020
XgM_atpD	CCATTGGGAAA TCCATCGCAC	CTTGCCGTTCT CGTCCTTCT	210 bp	Stehlíková a Beran
<i>X. perforans</i>				
Bs-Xp	GTCGTGTTGATG GAGCGTTC	GTGCGAGTCA ATTATCAGAA TGTGG	197 bp	Koenraadt et al., 2007
<i>X. vesicatoria</i>				
Xv_367CG1-1,9	AGAACCATCAA CAATGCTGT	CAAGGTGTCT CATGTCAATTG	280 bp	Stehlíková a Beran
<i>X. euvesicatoria</i>				

Xe_330CG1,2	ACAAATGCGGT GAGTACG	GCTATCCGAT AAGCTGTTGT	215 bp	Stehlíková a Beran
Xe_330CG9	CCGACCAAGAT CACGATG	CCTGGAGGGT CATCTTCA	224 bp	Stehlíková a Beran
ZnDoF/ZnDoR	GGTGACAAACC GTCAGGAATAG	CGCACTGGCA CGTTATCA	100 bp	Pečenka et al., 2020
XeRec-F3/B3	CCATGTAGGGC TTGTTGACG	GGTGGTCGCA TCTTCATTGG	200 bp	Larrea-Sarmiento et al., 2018

Tabulka 2: Seznam testovaných primerů

3.3. Singleplex PCR

Složení reakční směsi PCR pro každý vzorek o celkovém objemu 25 μ l bylo následující: 12,5 μ l PPP MasterMix (TopBio, Česká Republika); 9,5 μ l PCR H₂O (TopBio, Česká Republika); 1 μ l forward a 1 μ l reverse primerů o koncentraci 10 pmol/ μ l; 1 μ l bakteriální DNA o koncentraci 50 ng/ μ l. Pro každou reakci také byla připravena negativní kontrola, tedy vzorek se stejným složením ale neobsahující bakteriální DNA.

PCR reakce probíhaly v jednoblokových gradientových termocyclerech LifeECO a XP-G (Bioer Technology, Čína) dle následujícího programu (Tab. 3).

Krok	Fáze	Teplota	Čas
1	Počáteční denaturace	94 °C	5 minut
2	Denaturace	94 °C	30 sekund
3	Annealing	61 °C	1 minuta
4	Elongace	72 °C	1 minuta
5	Závěrečná elongace	72 °C	7 minut

Tabulka 3: Program pro PCR a multiplex PCR

Kroky 2 až 4 se opakovaly 30 \times . Po ukončení PCR vzorky byly chlazeny a uchovávány při 4 °C.

3.4. Multiplex PCR

Pro vlastní multiplex PCR byl zvolen stejný program jako při singleplex PCR (Tab. 3). Složení reakce ale bylo upraveno. Do vzorků pro multiplex PCR o celkovém objemu 25 μ l bylo přidáno: 12,5 μ l PPP MasterMix (TopBio, Česká Republika); 3,5 μ l PCR H₂O (TopBio, Česká Republika); 1 μ l forward a 1 μ l reverse každého z čtyř párů primerů o koncentraci 10 pmol/ μ l; 1 μ l příslušné bakteriální DNA o koncentraci 50 ng/ μ l.

Pro kontrolu byly testované také všechny 4 bakteriální DNA v jedné reakci o celkovém objemu 25 μ l s následujícím složením: 12,5 μ l PPP MasterMix (TopBio, Česká Republika); 3,5 μ l PCR H₂O (TopBio, Česká Republika); 1 μ l forward a 1 μ l reverse každého z čtyř párů primerů o koncentraci 10 pmol/ μ l; 0,25 μ l všech 4 bakteriálních DNA o koncentraci 50 ng/ μ l. Negativní kontrola měla stejné složení, ale neobsahovala bakteriální DNA.

3.5. Gelová elektroforéza

Vizualizace PCR produktů probíhala pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Byla použita horizontální vana pro gel o objemu 50 ml a 120 ml s hřebínky pro 10 a 16 vzorků. Pro produkty singleplex PCR byl připraven 2% agarózový gel s TBE, pro produkty multiplex PCR byl připraven 3% agarózový gel s TBE. V obou případech byl do gelu přidán ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA) jako obarvující činidlo. Gel o objemu 50 ml obsahoval 2 μ l činidla a do gelu o objemu 120 ml bylo přidáváno 4 μ l. Po ztuhnutí gelů byly vloženy do elektroforetických nádob, do jamek se přidávalo 10 μ l vzorku, a následně byly gely separovány 45 minut při napětí 90 V v případě 2% gelu a 80 minut při 120 V v případě 3% gelu. Po ukončení separace PCR produktů byly prosvícovány pod UV zářením pomocí přístroje InGenius3 (Syngene, Velká Británie).

3.6. Čipová elektroforéza

Z důvodu podobné velikosti fragmentů *X. euvesicatoria* a *X. perforans* byl využit ještě jeden způsob vizualizace, a to čipová elektroforéza. Celý proces probíhal pomocí automatizovaného zařízení MultiNa (Shimadzu, Japonsko) s použitím DNA-1000 Kit a markeru Φ X174 DNA-Hae III Digest. Postupováno bylo dle manuálu příslušného kitu. Do přístroje byly vloženy mikrozkušavky s ladderem a testované vzorky. Následné míchaní reagentů a měření PCR produktů probíhalo automaticky.

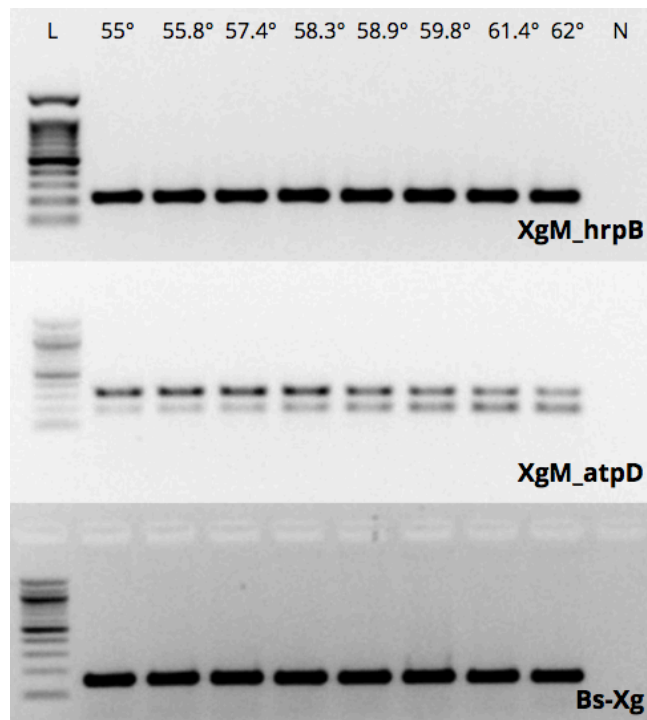
4. Výsledky

4.1. Bakteriální kmeny

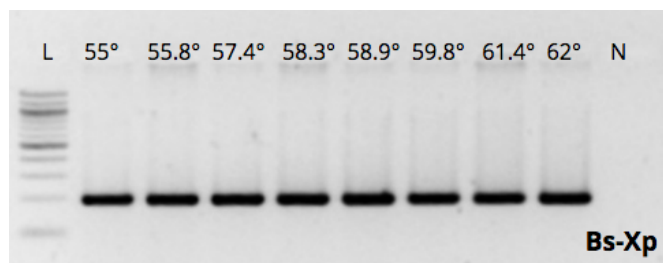
Naměřené hodnoty koncentrací bakteriálních DNA (Tab 1.) ve většině případů odpovídaly vysoce koncentrované DNA. Výjimku měly vzorky s koncentrací s nižší hodnotou než 50 ng/μl (č. 5, 22, 23, 27, 39). Z důvodu časté manipulace DNA ve vzorcích *X. vesicatoria* č. 13, 14, 16, 17, 19 degradovala, a proto nebyla pozorována při PCR reakcích (Obr. 6). Konkrétní vzorky s nenaamplifikovanou DNA byly stanoveny na základě pozorování agarózových gelů a měření koncentrací. Tyto vzorky dále nebyly používány. Jako nejvhodnější vzorky pro testování singleplex a multiplex PCR byly vybrány: vzorky č. 2 *X. gardneri*, vzorek č. 6 *X. euvesicatoria*, vzorek č. 15 *X. vesicatoria*, vzorek č. 21 *X. perforans*.

4.2. Primery

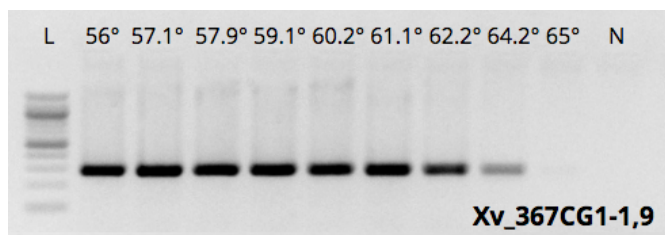
První byly testovány primerové páry pro bakterie *X. gardneri*. Primery XgM_hrpB (Stehlíková et al., 2020), XgM_atpD (Stehlíková a Beran, nepublikováno), Bs-Xg (Koenraadt et al., 2007) byly optimalizovány v teplotním gradientu annealingu (Obr. 3). U primerů XgM_atpD (Stehlíková a Beran, nepublikováno) byly pozorovány dva produkty, což by nebylo vhodné při PCR. Dále u primerových párů XgM_hrpB (Stehlíková et al., 2020) a Bs-Xg (Koenraadt et al., 2007) byla testována specificita. U ostatních testovaných bakterií rodu *Xanthomonas* a non-*Xanthomonas* patogenů nebyla pozorována amplifikace za použití těchto primerových párů.



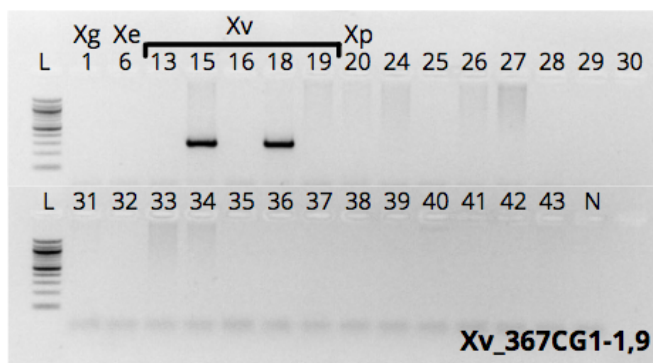
Obrázek 3: Teplotní gradienty primerů pro *X. gardneri*. Testovaný vzorek č. 2. Teplota annealingu je uvedena ve stupních celsia (°C). (L) – 100 bp DNA ladder, (N) – negativní kontrola. Dále byl testován primer pro *X. perforans*, Bs-Xp (Koenraadt et al., 2007). Byl testován gradient teploty annealingu (Obr. 4) a specificita. U jiných testovaných bakterií rodu *Xanthomonas* a non-*Xanthomonas* patogenů nebyla pozorována amplifikace za použití primerů Bs-Xp (Koenraadt et al., 2007).



Obrázek 4: Teplotní gradient primerů pro *X. perforans*. Testovaný vzorek č. 21. Teplota annealingu je uvedena ve stupních celsia (°C). (L) – 100 bp DNA ladder, (N) – negativní kontrola. Následně byl testován primerový pár pro *X. vesicatoria*. U primerů Xv_367CG1-1,9 (Stehlíková a Beran, nepublikováno) byl testován teplotní gradient (Obr. 5) a specificita (Obr.6).

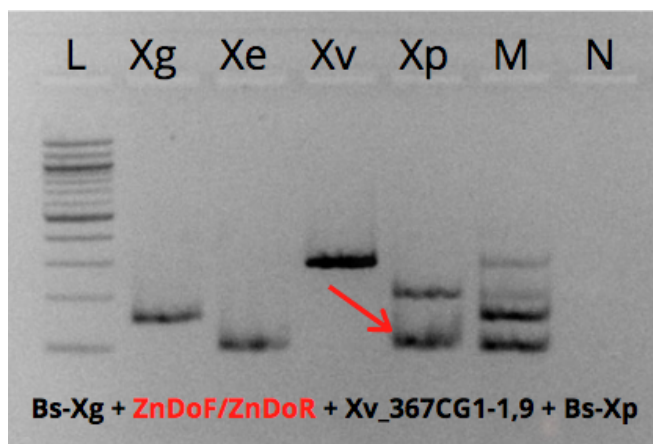


Obrázek 5: Teplotní gradient primerů pro *X. vesicatoria*. Testovaný vzorek č. 18. Teplota annealingu je uvedena ve stupních celsia (°C). (L) – 100 bp DNA ladder, (N) – negativní kontrola.



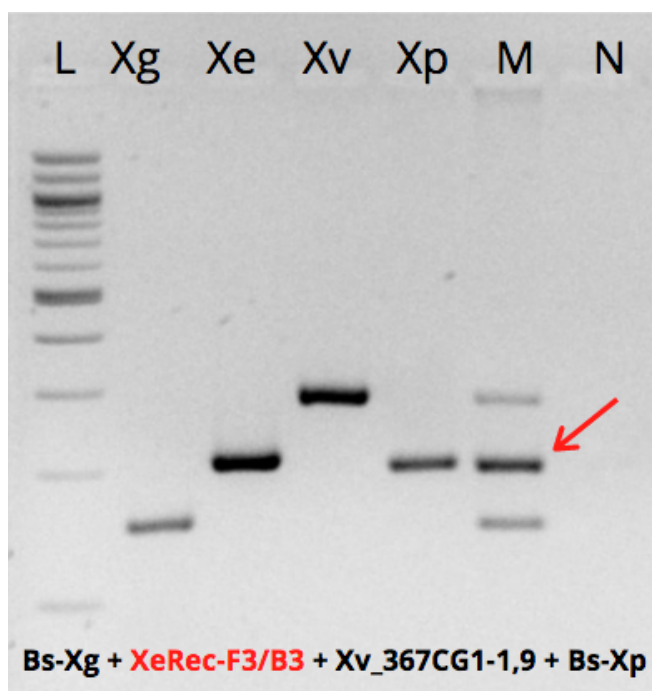
Obrázek 6: Testování specifity primeru pro *X. vesicatoria*. Vzorky č. 13, 16, 19 – degradovaná DNA. (L) – 100 bp DNA ladder, (N) – negativní kontrola.

Jako poslední byly testované primerové páry pro *X. euvesicatoria*. Na základě výsledků testování teplotních gradientů pro *X. gardneri*, *X. perforans* a *X. vesicatoria* byla stanovena vhodná teplota annealingu pro multiplex PCR na 61 °C. Primerové páry pro *X. euvesicatoria* byly testovány přímo v multiplex PCR za použití primerů Bs-Xg (Koenraadt et al., 2007), Bs-Xp (Koenraadt et al., 2007) a Xv_367CG1-1,9 (Stehlíková a Beran, nepublikováno). Primerový pár ZnDoF/ZnDoR (Pečenka et al., 2020) nebyl specifický pro *X. euvesicatoria*, jelikož byl také pozorován produkt u *X. perforans* (Obr. 7).



Obrázek 7: Nespecifický produkt u *X. perforans* při použití primerů ZnDoF/ZnDoR. (L) – 100 bp DNA ladder, (M) – vzorky č. 2, 6, 15, 21 v jedné reakční směsi, (N) – negativní kontrola.

Primerové páry Xe_330CG9 (Stehlíková a Beran, nepublikováno) a XeRec-F3/B3 (Larrea-Sarmiento et al., 2018) (Obr. 8) nebyly vhodné pro multiplex PCR kvůli příliš podobné velikosti produktu *X. euvesicatoria*.



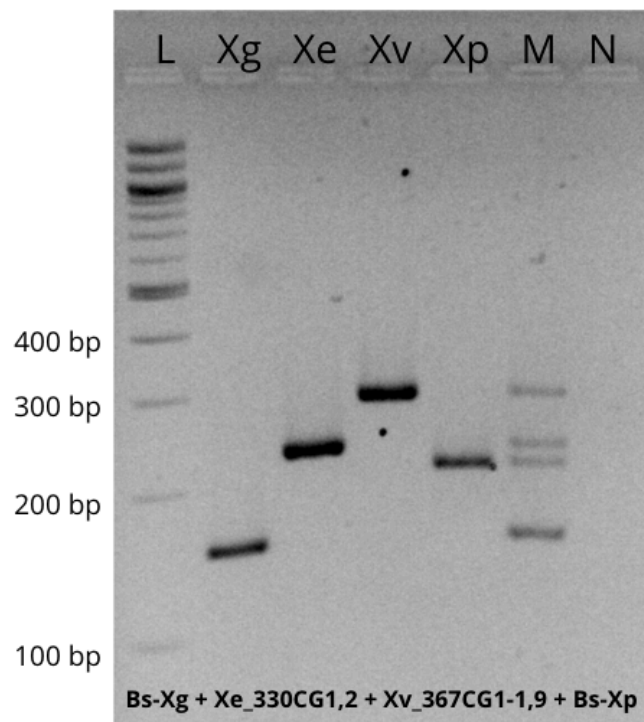
Obrázek 8: Výsledek testování primeru XeRec-F3/B3. (L) – 100 bp DNA ladder, (M) – vzorky č. 2, 6, 15, 21 v jedné reakční směsi, (N) – negativní kontrola.

Dále byl testován primer Xe_330CG1,2 (Stehlíková a Beran, nepublikováno). Tento primerový pár byl specifický a měl vhodnou velikost produktu pro multiplex

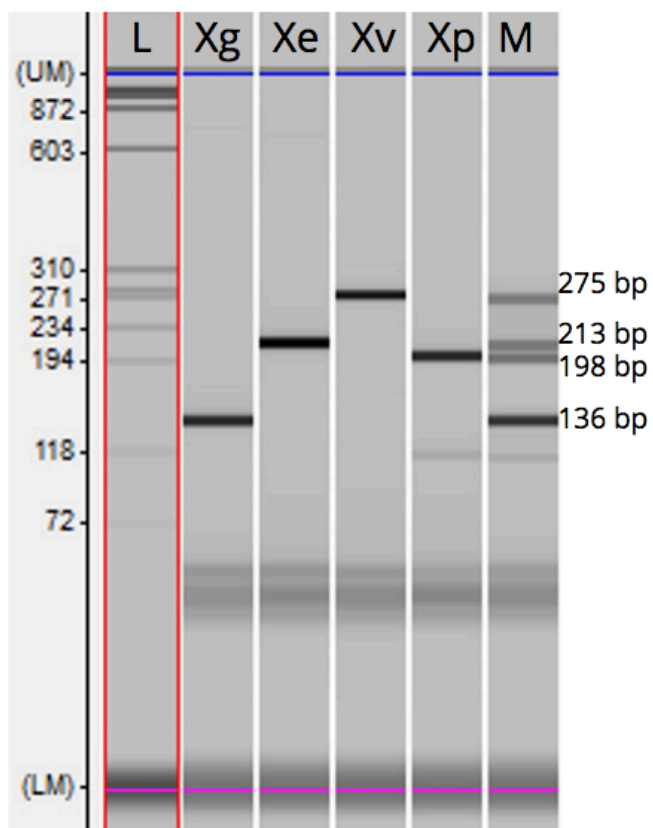
Primery pro multiplex PCR by měly mít stejnou teplotu annealingu, specifitu k příslušné bakterii rodu *Xanthomonas* a odlišnou velikost produktů. Vyhovující všem výše uvedeným podmínkám byly primery Xe_330CG1,2 (Stehlíková a Beran, nepublikováno), Xv_367CG1-1,9 (Stehlíková a Beran, nepublikováno), Bs-Xg (Koenraadt et al., 2007), Bs-Xp (Koenraadt et al., 2007), které byly dále použity pro vlastní multiplex PCR.

4.3. Multiplex PCR

S použitím vybraných párů primerů a vhodných podmínek reakce se podařilo detekovat v jedné multiplex PCR reakci čtyři různé bakterie rodu *Xanthomonas*, patogenní pro rajče a papriku *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* a *X. perforans*. Vzorky získané v reakci multiplex PCR byly vizualizovány pomocí gelové (Obr. 9) a čipové elektroforézy (Obr. 10).



Obrázek 9: Výsledky multiplex PCR, vizualizace pomocí gelové elektroforézy. Reakční směs obsahovala všechny 4 páry primerů. Vzorke č. 2, 6, 15, 21 byly testovány v těchto podmínkách samostatně - (Xg, Xe, Xv, Xp) a v jedné reakci - (M). (L) – 100 bp DNA ladder, (N) – negativní kontrola.



Obrázek 10: Výsledky multiplex PCR, vizualizace pomocí čipové elektroforézy. Reakční směs obsahovala všechny 4 páry primerů (Bs-Xg, Xe_330CG1,2, Xv_367CG1-1,9, Bs-Xp). Vzorky č. 2, 6, 15, 21 byly testovány v těchto podmínkách samostatně (Xg, Xe, Xv, Xp) a v jedné reakci - (M). (L) – ladder. Odchylka měření pro kit DNA – 1000 je cca 5-10 %.

5. Diskuse

Nejúčinnější metodou v boji proti bakteriální skvrnitosti rajčete a papriky je prevence zahrnující včasnou detekci bakterií rodu *Xanthomonas*. Molekulární metoda multiplex PCR je široce používaná pro určení tohoto patogenu a umožňuje rychlou a spolehlivou detekci odlišných druhů *Xanthomonas*. Detekce několika patogenů v jedné reakci je velmi výhodná a může ušetřit čas a náklady (Potnis et al., 2015; Boureau et al., 2013). Nevýhodou je obtížná optimalizace podmínek reakce a výběr vhodných primerů umožňujících odlišit velmi příbuzné druhy.

Při porovnání s klasickou PCR metodou má multiplex PCR nižší citlivost a je silně ovlivněná kvalitou použitých komponentů (Araújo et al., 2012). Ve výsledcích finální multiplex PCR byla pozorována slabší amplifikace produktů na gelu než v reakci s jednotlivými páry primerů.

V této bakalářské práci byly použity primery pro *X. gardneri* a *X. perforans* na základě analýzy délkového polymorfizmu amplifikovaných fragmentů (AFLP) (Koenraadt et al., 2007). Primery měly unikátní druhovou specifitu mezi bakteriemi rodu *Xanthomonas* a nedetekovaly žádné další patogenní bakterie pro rajče a papriku. Úspěšného výsledku použitím těchto primerů se podařilo dosáhnout i za podmínek nižší teploty annealingu, tedy 61 °C oproti 64 °C v publikaci Koentraadt et al. (2007).

Při optimalizaci vlastní multiplex PCR bylo náročné rozlišit bakterie *X. euvesicatoria* a *X. perforans*. Problémem byla velká genová shoda těchto druhů a také podobná velikost produktů. Primerový pár ZnDoF/ZnDoR, navržen v publikaci Pečenka et al. (2020) při testování v multiplex tvořil nespecifický produkt o stejné velikosti s *X. perforans*. Jedním z důvodů by mohly být různé podmínky reakce. Pečenka et al. testovali primerový pár při odlišném PCR programu: při nižší teplotě annealingu 55 °C a menším počtu PCR cyklů, 25×. Tyto podmínky mohou být nedostatečné pro specifickou amplifikaci produktů. Velmi obtížné rozlišení těchto dvou druhů bakterií je popsáno reklasifikacemi *X. perforans* a její přeražení do druhu *X. euvesicatoria* na patovar *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (Barak et al., 2016; Constantin et al., 2016).

Specifické primery pro *X. euvesicatoria* a *X. vesicatoria*, navržené vedoucí a konzultantem této bakalářské práce na základě výběru unikátních sekvencí genomu v publikaci Beran et al. (2021) byly úspěšně použity v multiplex PCR. Tyto primery byly navrženy především pro LAMP analýzu, ale právě kvůli unikátní specifitě

cílového úseku DNA, použití primerů Xe_330CG1,2 řešilo problém obtížného rozlišení *X. euvesicatoria* a *X. perforans*.

Primery, navržené na základě unikátních sekvencí genomu (Beran et al., 2021) měly velkou výhodu oproti primerům pro cílové geny: XgM_atpD (Stehlíková a Beran, nepublikováno) a XgM_hrpB (Stehlíková et al., 2020). Problémem při použití těchto primerů byla nižší specifita a příliš podobná velikost produktů. Nespecifické produkty XgM_atpD, které se tvořily při nižší teplotě annealingu, byly odstraněny zvýšením teploty annealingu na 70 °C, což nebylo vhodné pro ostatní primerové páry.

Primery pro *X. euvesicatoria* popsané v publikaci Larrea-Sarmiento et al., (2018), byly také určeny pro detekci bakterií pomocí metody LAMP. Primerový pár XeRec-F3/B3 nebyl použit v multiplex PCR kvůli příliš podobné velikosti produktu s *X. perforans*, jelikož rozdíl o cca 3 nukleotidy by nemohl být pozorován při elektroforéze.

Řešením pro separaci fragmentů o blízké velikosti byla elektroforéza v hustém 3% agarózovém gelu za podmínek vyššího napětí a delší době separace. Druhá metoda separace, čipová elektroforéza, potvrdila úspěšný výsledek a stanovila přesné velikosti produktů reakce. U *X. gardneri* byl ale pozorován rozdíl velikosti produktu mezi hodnotou u čipové elektroforézy a hodnotou v publikaci Koentraadt et al. (2007). Tento rozdíl o cca 18 nukleotidů mohl být způsoben odlišným načtením ladderu a povolenou odchylkou měření u přístroje MultiNa (Shimadzu, Japonsko). Velikostní odchylky u ostatních produktů o cca 2 - 5 nukleotidů by mohly být dány nepřesným čtením malých fragmentů, pro které je potřeba používat menší ladder.

Multiplex PCR pro současnou detekci bakteriálních patogenů rajčat byla také popsána v publikaci Umesha a Avinash, (2015). V tomto výzkumu za podmínek stejné teploty annealingu – 61 °C v jedné reakční směsi byly detekovány bakterie *X. perforans* a *Ralstonia solanacearum*. Při vyšší teplotě annealingu nebyl pozorován produkt u *R. solanacearum*, při nižší teplotě naopak klesala intenzita amplifikace produktu *X. perforans*.

Multiplex PCR přímo pro druhy *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* a *X. perforans* byla zkoumána Araújo et al., (2012). Za podmínek vyšší teploty annealingu 66 °C byly použity primery z předešlé publikace Koentraadt et al. (2007), kde nebyla testována specifita pro jiné bakteriální patogeny. Ve výsledcích Araújo et al. (2012) nebyla pozorovaná žádná amplifikace u non-*Xanthomonas* patogenů a

byla prokázána unikátní druhová specifita primerů, stejně jako i v této bakalářské práci.

Závěr

V této bakalářské práci se podařilo optimalizovat multiplex PCR reakci pro detekci čtyř různých bakteriálních druhů rodu *Xanthomonas*, patogenních pro rajče a papriku – *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* a *X. perforans*. Všechny čtyři druhy bylo možné spolehlivě detekovat v jedné reakci za stanovených podmínek a použitím vybraných primerů. Reakce byla hodnocena jako vysoce specifická a nedetekovala jiné bakteriální kmeny patogenní pro rajče a papriku.

Seznam použité literatury

Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5):91-95.

Almeida, N. F. et al. (2010). PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100:208–215.

An, S. Q. et al. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(1):1-32.

Araújo, E. R. et al. (2012). 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*, 113(6):1479-1490.

Barak, J. D. et al. (2016). Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. *Frontiers in Plant Science*, 7:1805.

Barril, P. a Nates, S. (2012). Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, 4:3-14.

Bekaert, B. et al. (2009). Validation of a microchip electrophoresis system as a DNA amplification control. *Forensic science international: genetics supplement series*, 2(1):119-120.

Beran, P. et al. (2015). Monitoring the occurrence of bacterial spot of tomato and pepper in the Czech Republic and development of new PCR primers for detection of *Xanthomonas vesicatoria*. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3):617-621.

Beran, P. et al. (2021). KEC: Unique sequence search by K-mer exclusion. *Bioinformatics*. btab196.

Boureau, T. et al. (2013). A multiplex-PCR assay for identification of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Journal of Microbiological Methods*, 92(1):42-50.

Bradbury, J. F. (1984). *Xanthomonas*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, London.

Buttimer C, et al. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8:34.

Cabi.org (2021). *Xanthomonas vesicatoria* (bacterial spot of tomato and pepper). [online] [cit. 02.03.2021] Dostupné z: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56981#REF-DDB-183911>

Chamberlain, J. S. et al. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23):11141-11156.

Constantin, E. C. et al. (2016). Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology*, 65(5):792-806.

Cuppels, D. (2004). Bacterial survival and dissemination in seeds and planting material. In: Goodman, R. (Eds.) *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Marcel Dekker, New York, pp. 111– 114. ISBN 978-0-8247-0944-0

Cuppels, D. A., a Abbasi, P. A. (2013). 70 *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al., *Xanthomonas perforans* Jones et al., *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin et al., *Xanthomonas gardneri* (ex Šutic~) Jones et al., Bacterial spot of tomato. *Biological Control Programmes in Canada 2001–2012*, pp. 466.

Dieffenbach, C. W. et al. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3):30-37.

Doidge, E. M. (1921). A tomato canker. *Annals of applied biology*, 7:407-430.

EPPO/CABI (1997) Quarantine Pests for Europe. CABI International, Wallingford. ISBN 0851991548.

Gariyban, L., a Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3): 1-4.

Guilliatt, A. M. (2002). Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. In: B. D. M. Theophilus a R. Rapley (Eds.) *PCR Mutation Detection Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp. 001-011. ISBN 978-0-89603-617-8.

Hayden, M. J. et al. (2008). Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *Bmc Genomics*, 9(1):1-2.

Higgins, J. A. et al. (2003). A handheld real time thermal cycler for bacterial pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(9):1115-1123.

Huang, F. C. et al. (2006). An integrated microfluidic chip for DNA/RNA amplification, electrophoresis separation and on-line optical detection. *Electrophoresis*, 27(16):3297-3305.

info.gbiosciences.com, (2021). *The Protein Man's Blog*. [online] [cit. 10.02.2021].
Dostupné z: <https://info.gbiosciences.com/blog/multiplex-pcr-benefits-over-traditional-pcr>

Jones, J.B. et al. (2000). Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas spp.*) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:1211–1219.

Jones, J.B. et al. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755–762.

Joshi, M. a Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1):81-97.

Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In: Madan L. (Eds.) *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen, London. pp. 147 – 163. ISBN 978-1-78985-090-2.

Kebede, M. et al. (2014). Molecular characterization of *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot of tomato in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology*, 140:677–688.

Kirkpatrick F. H. (1991). Overview of agarose gel properties. *Electrophoresis of large DNA molecules: theory and applications*. pp. 9–22.

Kleppe, K. et al. (1971). Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56(2):341-361.

Koenraadt, H. et al. (2007). Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae*, 808:99-102.

Kůdela, V. et al. (2002). *Rostlinolékařská bakteriologie*. Academia, Praha. ISBN 80-20008-99-3.

Kwok, S. et al. (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*, 18(4):999-1005.

Lamichhane, J. R. et al. (2018). Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(3):1-8.

Larrea-Sarmiento, A. et al. (2018). Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. *Scientific Reports*, 8(1):1-1.

Lee, P. Y. et al. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal Of Visualized Experiments*, 20(62):e3923.

Lo, Y. M. D. a Chan, K. C. A. (2006). Introduction to the Polymerase Chain Reaction. In: L. M., C. W. K. Rossa, C. K. C. W. K. Allen, a C. K. C. Allen (Eds.). *Clinical Applications of PCR* (Second Edition). Druhé vydání. Humana Press, New Jersey, pp. 1-10. ISBN 1-58829-348-3.

Mackay, I. M. et al. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6):1292-1305.

Markoulatos, P. et al. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1):47-51.

Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4):56-65.

Mullis, K. B. (1994). The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(12):1209-1213.

Mullis, K. B. et al. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51:263-273.

Ng, L. K. et al. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4):209-215.

- Obradovic, A. et al. (2004). Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Dis.* 88:736–40.
- Pečenka, J. et al. (2020). Species-specific PCR primers for the detection of poorly distinguishable *Xanthomonas euvesicatoria*. *Crop Protection*, 127:104978.
- Potnis, N. et al. (2015). Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology*, 16(9):907-920.
- Rachlin, J. et al. (2005). MuPlex: multi-objective multiplex PCR assay design. *Nucleic Acids Research*, 33:544-547.
- Rahman, M. T. et al. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1):30-36.
- Shen, Z. et al. (2010). MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *Bmc Bioinformatics*, 11(1):1-7.
- Sint, D. et al. (2012). Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology And Evolution*, 3(5):898-905.
- Starr, M.P. (1981) The Genus *Xanthomonas*. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (Eds.). *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 742-763. ISBN 978-3-662-13187-9.
- Stehlíková, D. et al. (2020). Development of Real-Time and Colorimetric Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Xanthomonas gardneri*. *Microorganisms*, 8(9):1301.
- Sun, X. et al. (2002). Bacterial Spot of Tomato and Pepper. *Plant Pathology Circular*, 129:1-4.
- Timilsina, S. et al. (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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4):1520–1529.
- Timilsina, S. et al. (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. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 69(2):343-349.

Umesha, S. a Avinash, P. (2015). Multiplex PCR for simultaneous identification of *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas perforans*. *3 Biotech*, 5(3):245-252.

Vauterin, L. et al. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45:472–489.

Voytas, D. (1992). Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Immunology*, 2(1):10-4.

Weier, H. U. a Gray, J. W. (1988). A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *Dna*, 7(6):441-447.

Weller, S. A. et al. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7):2853-2858.

Wheeler, E. K. et al. (2004). Convectively driven polymerase chain reaction thermal cycler. *Analytical Chemistry*, 76(14):4011-4016.

Xu, Z. et al. (2004). Performance of electrokinetic supercharging for high-sensitivity detection of DNA fragments in chip gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 25(21-22):3875-3881.

Zheng, Z. et al. (2014). Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nature Medicine*, 20(12):1479-1484.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Symptomy bakteriální skvrnitosti rajčat a paprik.....	9
Obrázek 2: Porovnání klasické PCR reakce a multiplex PCR.....	14
Obrázek 3: Teplotní gradienty primerů pro <i>X. gardneri</i>	24
Obrázek 4: Teplotní gradient primerů pro <i>X. perforans</i>	24
Obrázek 5: Teplotní gradient primerů pro <i>X. vesicatoria</i>	25
Obrázek 6: Testování specificity primeru pro <i>X. vesicatoria</i>	25
Obrázek 7: Nеспецифický produkt u <i>X. perforans</i>	25
Obrázek 8: Výsledek testování primeru XeRec-F3/B3.....	26
Obrázek 9: Výsledky multiplex PCR, vizualizace pomocí gelové elektroforézy	27
Obrázek 10: Výsledky multiplex PCR, vizualizace pomocí čipové elektroforézy	28

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam použitých bakteriálních kmenů	20
Tabulka 2: Seznam testovaných primerů	21
Tabulka 3: Program pro PCR a multiplex PCR	21

Seznam použitých zkratek

AFLP - *amplified fragment length polymorphism*, délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

AMP - *anchored multiplex PCR*

DNA - *deoxyribonucleic acid*, deoxyribonukleová kyselina

dNTP - *deoxynucleotide triphosphate*, deoxynukleosid trifosfát

LAMP - *loop-mediated isothermal amplification*, izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou

MLSA - *multilocus sequence analysis*, multilokusová sekvenční analýza

NGS - *next generation sequencing*, sekvenování nové generace

PCR - *polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce

RNA - *ribonucleic acid*, ribonukleová kyselina

rRNA - *ribosomal RNA*, ribosomální RNA

SNP - *single-nucleotide polymorphism*, jednonukleotidový polymorfismus

SNV - *single-nucleotide variants*, jednonukleotidové varianty

Taq - *Thermus aquaticus*, DNA polymeráza izolovaná s termofilní bakterie

TBE - *tris borate EDTA*

T_m - *melting temperature*, teplota tání primeru