

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Detekce fytopatogenní karanténní bakterie *Erwinia amylovora* metodou LAMP

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Pavel Beran, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor bakalářské práce:

Martin Klojda

České Budějovice, 2016

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin KLOJDA**
Osobní číslo: **Z12416**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Detekce fytopatogenní karanténní bakterie *Erwinia amylovora* metodou LAMP**
Zadávající katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Obsah: Desetinné členění s uvedením stran jednotlivých kapitol bakalářské práce.

Úvod: Stručný nástin problému a aktuální situace v oblasti detekce fytopatogenní karanténní bakterie *Erwinia amylovora*.

Literární přehled: Stěžejní částí bakalářské práce bude podrobný popis fytopatogenní karanténní bakterie *Erwinia amylovora*, způsobující bakteriální spálu růžovitých rostlin. Dále budou popsány nejčastěji použité metody detekce tohoto patogena s důrazem na metody molekulárně biologické. Zvláštní pozornost bude věnována metodě loop-mediated isothermal amplification, což je jedna z moderních rychle se rozvíjejících metod speciálně určených k detekci patogenů.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků a doporučení dalšího postupu řešení uvedené problematiky.

Seznam použité literatury: Řazen v abecedním pořadí dle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"

Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:


Bednář M. a kol.: Lékařská mikrobiologie. Marvil Praha, 1999, 558 s. (Vybrané kapitoly).
Cudlín J. a kol.: Vybrané metody v mikrobiologii. Academia Praha, 1981, 492 s. (Vybrané kapitoly).
Kaprálek F.: Fyziologie bakterií. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1986, 608 s. (Vybrané kapitoly).
Klaban V.: Ilustrovaný mikrobiologický slovník. Galen Praha, 2005, 654 s.
Krumphanzl V., Řeháček Z. a kol.: Mikrobiální technologie. Academia Praha, 1988, 364 s. (Vybrané kapitoly).
Kúdela V., Nováček A., Fucikovsky L.: Rostlinolékařská bakteriologie. Academia Praha, 2002, 347 s.
Kúdela V. a kol.: Obecná fytopatologie. Academia Praha, 1989, 388 s. (Vybrané kapitoly).
Rosypal S.: Obecná bakteriologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1981, 749 s. (Vybrané kapitoly).
Sedláček I.: Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita v Brně, 2007, 270 s. (Vybrané kapitoly).
Šilhánková L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie. Academia Praha, 2002, 363s. (Vybrané kapitoly).
Šmarda J. a kol.: Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně, 2008, 188s.
Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Pavel Beran, Ph.D.**
Katedra speciální produkce rostlinné
Konzultant bakalářské práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání bakalářské práce: **14. dubna 2016**
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2016**


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentů 1686, 270 06 České Budějovice


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

V Českých Budějovicích dne 14. dubna 2016

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) 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, 15.4. 2016

.....
Martin Klojda

Poděkování

Děkuji panu doc. Ivanu Mrázovi, CSc. za mnoho rad, odborné vedení a za veškerý čas, který mi laskavě věnoval během psaní bakalářské práce i během mého studia. Také bych velmi rád poděkoval za veškeré rady, připomínky a odborné vedení panu Ing. Pavlu Beranovi, Ph. D.

Abstrakt

Erwinia amylovora je fytopatogenní bakterií způsobující spálu růžovitých rostlin. Jedná se o závažné onemocnění ovocných stromů, které ohrožuje okolo 200 druhů rostlin z čeledi *Rosaceae* (růžovité). Na tuto bakterii se vztahují přísná karanténní opatření. V současnosti je tento patogen rozšířen po celé Evropě, Blízkém východě, Středomoří, Novém Zélandu, ve Spojených státech a mnoha dalších oblastech. Mezi symptomy onemocnění patří spála listů, korové nekrózy, sekrece bakteriálního slizu z plodů a dalších napadených míst, vodnatění plodů. K rychlému šíření bakteriálních buněk přispívá opylující hmyz s jehož pomocí patogen infikuje květy a posléze další části rostliny. Proti tomuto patogenu není na území evropského kontinentu jiné ochrany, než šlechtění na rezistenci, karanténní opatření a využití antagonistických bakterií. Z toho plyne, že časné rozpoznání příznaků je klíčové v zabránění větších škod. Pro diagnostické účely bylo vyvinuto mnoho technik od kultivačních metod, až po sérologické a molekulárně genetické metody. V této práci přináším popis některých z těchto metod se zaměřením na techniku LAMP (loop-mediated isothermal amplification), která je nejen díky jejímu průběhu za izotermických podmínek velice rychlá, citlivá a také levnější oproti jiným metodám. Jelikož je *Erwinia amylovora* patogenem, který se rychle šíří, zdá se být LAMP velmi slibným diagnostickým nástrojem.

Klíčová slova: *Erwinia, amylovora*, spála růžovitých rostlin, LAMP, loop-mediated isothermal amplification

Abstract

Erwinia amylovora is phytopathogenic bacterium which causes serious plant disease Fire Blight on pome-fruit and surrounding 200 *Rosaceae* species. Today this disease is spreading across Europe, the Near East, the Mediterranean, New Zealand, the United States and many other countries. Fire Blight is a very destructive disease. Among the symptoms are scorched leaves, necrosis, cankers, secretion of ooze from fruit and other affected location and watering from fruits. Insects like bees can transport bacterium cells into other blossoms and trees. Due to this fact Fire Blight can spread very quickly and destroy harvests, damage trees and even destroy orchards. There is no protection in Europe except resistance breeding, quarantine arrangement, or using antagonistic bacterium. Early recognition of Fire Blight symptoms is a key step in the prevention of more severe consequences. There are many tools in diagnosing *Erwinia amylovora* including the observation of symptoms, cultivation methods, serological or molecular biological techniques among others. In this paper I demonstrate some of these detection techniques. As the quick detection of *Erwinia amylovora* is important, I summarize the molecular detection technique LAMP (loop-mediated isothermal amplification), which is a quick, low-cost and very sensitive technique besides other methods because of the isothermal conditions for amplification. Because of this, LAMP may be a suitable diagnostic tool for the detection of *Erwinia amylovora*.

Keywords: *Erwinia amylovora*, Fire Blight, LAMP, loop-mediated isothermal amplification

Obsah

1. ÚVOD	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Popis a význam patogena	11
2.1.1 Historie	11
2.1.2 Rozšíření patogena.....	12
2.1.3 Morfologické vlastnosti patogena.....	13
2.1.4 Molekulární charakteristika patogena.....	14
2.1.5 Hostitelský okruh.....	14
2.1.6 Symptomy.....	15
2.1.7 Infekční cyklus patogena	16
2.1.8 Ochrana před patogenem	18
2.2 Metody detekce	19
2.2.1 Kultivační metody	19
2.2.2 Metody chemické.....	19
2.2.2.1 Gramovo barvení	19
2.2.2.2 Analýza podle obsahu mastných kyselin	20
2.2.3 Biochemické metody	20
2.2.4 Fyziologické metody	21
2.2.5 Testy patogenity.....	21
2.2.6 Sérologické metody	23
2.2.6.1 Metoda sklíčkové aglutinace.....	24
2.2.6.2 Precipitační metody	24
2.2.6.3 Ouchterlonyho metoda.....	24
2.2.6.4 Manciniho test.....	25
2.2.6.5 Imunoelektroforetické metody	26
2.2.6.6 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	28
2.2.6.7 Imunofluorescence	29
2.2.7 Metody molekulárně biologické	30
2.2.7.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)	30
2.2.7.2 Gelová elektroforéza	33
2.2.7.3 Hybridizace DNA	33
2.2.7.4 Southern blot.....	34
2.2.7.5 Microarrays	36
2.2.7.6 Sekvenování DNA Sangerovou metodou	36
2.3 Metoda LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)	38
2.3.1 Princip LAMP.....	40
2.3.2 Urychlení reakce přidáním loop primerů.....	46
2.3.3 Vyhodnocení LAMP.....	48
2.3.4 Real-time LAMP	53
2.3.5 Multiplex LAMP (mLAMP)	54
2.3.6 Detekce v polních podmínkách	55

3. ZÁVĚR.....	57
4. POUŽITÁ LITERATURA.....	59
5. PŘÍLOHY	66
5.1 Seznam obrázků	66
5.2 Seznam zkratek	67

1. ÚVOD

Bakterie známá pod názvem *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. 1920 je u nás (i v mnoha dalších zemích světa) zařazena do seznamu karanténních organismů. Bakteriální spála růžovitých rostlin, kterou tento patogen způsobuje, je závažné onemocnění pro mnoho rostlin z čeledi *Rosaceae* (růžovité) (Yaich a kol., 2011). U napadených rostlin se toto onemocnění kromě dalších symptomů, které budou v této práci popsány, typicky projevuje tvorbou nekrotických lézí (Kůdela, 1990). Právě odumírání částí rostlin má pak za následek obrovské ekonomické ztráty (Smits a kol., 2010). Podle Kůdely (2002) je spála růžovitých jedním z vůbec nejdestruktivnějších onemocnění rostlin. Bakterie ohrožuje hospodářské dřeviny z podčeledi jabloňovité, ale i okrasné a divoce rostoucí rostliny (Kůdela a kol., 2002). Toto onemocnění má celosvětový ekonomický dopad na světovou produkci jablek a hrušek. Jedná se o vůbec prvního pozorovaného rostlinného patogena bakteriálního původu (Smits a kol., 2010). Proti *Erwinia amylovora* neexistuje žádný účinný zásah kromě prevence a včasné diagnostiky. Jako nástroj, který může v tomto ohledu pomoci se nabízí (kromě konvenčních diagnostických technik) metoda LAMP.

LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) je poměrně novou technikou využívanou pro amplifikaci nukleových kyselin (Ziros a kol., 2012). Umožňuje rychlou amplifikaci za izotermických podmínek (Njiru a kol., 2008). Byla již použita pro detekci mnoha infekčních původců onemocnění z řad bakteriálních, virových, houbových a parazitických agens (Zhou a kol., 2011). Pro reakci je zapotřebí celkem čtyř, až šesti speciálně navržených primerů, které jsou komplementární k šesti, až osmi rozpoznávacím sekvencím amplifikované DNA. Izotermické prostředí je zajištěno např. pomocí zahřívacího bloku. Může být použito i thermocykleru pro PCR. Během reakce se uvolňuje pyrofosfát, který umožňuje vizualizaci (Dhama a kol., 2014). Výsledek tak lze vyhodnotit již pouhým okem, optimálně na agarózovém gelu elektroforeticky, nebo přidáním fluorescenčního barviva a vyhodnocení pod UV lampou. Mezi velké přednosti LAMP se řadí minimální potřeba technického vybavení a menší časová náročnost (Nakao a kol., 2010). Právě díky rychlosti provedení i nízkým nákladům se metoda jeví jako výhodná pro rutinní testování vzorků k detekci *Erwinia amylovora* (Kałużna a kol., 2013).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Popis a význam patogena

Původce spály růžovitých rostlin pochází ze severní části Amerického kontinentu. V posledních letech bylo popsáno více patogenních druhů rodu *Erwinia* projevujících se obdobnými příznaky jako spála růžovitých rostlin. Například *Erwinia piriflorinigrans* López *et al.* 2011, *Erwinia pyrifoliae* Kim *et al.* 1999, nebo *Erwinia uzenensis* Matsuura *et al.* 2012. Dále byly na ovocných stromech nalezeny dvě bakterie *Erwinia billingiae* Mergaert *et al.* 1999 a *Erwinia tasmaniensis* Geider *et al.* 2006. O těchto druzích není zatím známo tolik, jako o *Erwinia amylovora*. Onemocnění způsobované touto bakterií má vážné ekologické i ekonomické následky. Například v devadesátých letech bylo pouze v Itálii příčinou bakteriální spály zničeno více než půl milionu ovocných stromů. V roce 2007 se spála růžovitých rostlin vyskytla na několika místech Švýcarska. Škoda byla tehdy vyčíslena na 27,5 milionu dolarů a celkové ztráty na sklizni činily 10 % (Gross a kol., 2014; Smits a kol., 2010).

2.1.1 Historie

Spála růžovitých rostlin byla historicky poprvé pozorována v roce 1780 ve státě New York v údolí řeky Hudson (Gross a kol., 2014; Smits a kol., 2010; Kůdela, 1990). Název spála (fire-blight) použil poprvé William Coxe v roce 1817, který tehdy pozoroval příznaky této choroby. Postřehl, že během pár hodin došlo ke stočení a zhnědnutí listů (tedy velmi podobných příznaků, které vyvolá u rostliny poškození ohněm). Od roku 1862 se onemocnění rozšířilo po severovýchodě Spojených států a způsobovalo velké škody v jabloňových i hrušňových sadech (Gross a kol., 2014). K objevu bakteriální spály růžovitých rostlin došlo právě v Severní Americe, odkud se nejprve rozšířila na Nový Zéland, dále přes Velkou Británii do severní a středovýchodní části Evropy (Smith a kol., 2010). Propuknutí spály růžovitých rostlin v létě roku 1880 v americkém státě Illinois vedlo k objasnění tohoto onemocnění. Skutečnou příčinu onemocnění tak uvedl profesor univerzity Champaign-Urbana v Illinois Thomas J. Burill (americký fytopatolog), který označil bakterii *Erwinia amylovora* za původce spály růžovitých rostlin (Gross a kol., 2014).

Bakterie byla poprvé od svého objevu nalezena v kanadském Ontariu roku 1904, poté v Britské Kolumbii v roce 1911 a v roce 1921 v Mexiku. Od roku 1924 byla nemoc zaznamenána ve všech mexických i kanadských oblastech s produkcí jablek a hrušek. V padesátých letech se patogen rozšířil do Velké Británie a do severní části Evropy. Kolem roku 1960 se patogen přenesl do Severní Afriky (Gross a kol., 2014)

Odhaduje se, že do Anglie se *Erwinia amylovora* dostala z Nového Zélandu spolu s rostlinným materiálem, nebo kontaminovaným nákladem. Přes kanál La Manche se patogen přenesl pravděpodobně za pomoci větru a ptactva. Určit trasu kterou se ubíral není jednoduché. Byl však prokázán výskyt spály růžovitých rostlin na hrušních po roubování, přičemž rouby pocházely právě z Anglie. V roce 1987 již byla pozorována spála růžovitých rostlin na mnoha místech Evropy. U nás byl první nález učiněn v roce 1986 na 4 místech v Praze 4. O rok později bylo již evidováno 23 ohnisek spály růžovitých rostlin v Praze a okolí. V roce 1988 již byla bakterie rozšířena v několika dalších oblastech Středočeského kraje. V 94 % případů byl hostitelskou rostlinou hloh (*Crataegus*). Dále byl patogen nalezen také na hrušních (*Pyrus*), kdouloních (*Cydonia*), jabloních (*Malus*), kdoulovcích (*Chaenomeles*), skalnicích (*Cotoneaster*) a hlohyni (*Pyracantha*) (Kůdela, 1990).

2.1.2 Rozšíření patogena

Od objevu *Erwinia amylovora* a popsání bakteriální spály růžovitých rostlin se patogen rozšířil do více než 50 zemí světa. V současnosti je bakterie *Erwinia amylovora* rozšířena po celé Evropě. Dále byl její výskyt potvrzen na severu Afriky a ve středovýchodních zemích včetně Iránu. Mohlo by tak postupem času dojít k ohrožení místa původu jabloní nacházejícím se ve Střední Asii. Mezi oblasti, kde nebyla bakteriální spála růžovitých dosud prokázána spadá Austrálie, Jižní Afrika, některé státy Severní Ameriky a Čína. Příznaky odpovídající spále růžovitých rostlin byly pozorovány také v Jižní Koreji a Japonsku (Gross a kol., 2014). Patogen lokalizovaný v Jižní Koreji byl pojmenován jako *Erwinia pyrifolia*. Tato bakterie způsobující nekrózy na listech a větvích asijských hrušní (*Pyrus Pyrifolia*) je blízké příbuzná s *Erwinia amylovora* (Kůdela a kol., 2002).

Mezi oblasti potýkající se s *Erwinia amylovora* patří například:

Evropa: Velká Británie, Polsko, Nizozemsko, Dánsko, SRN, Francie, Itálie, Belgie, Švédsko, Norsko, Irsko, Řecko, a Česká republika, Švýcarsko, Rakousko, Maďarsko, Bulharsko, Srbsko, Bosna a Hercegovina, Chorvatsko, Turecko

Amerika: USA, Kanada

Afrika : Egypt

Mezi další země patří Izrael, Kypr, Arménie, Irán a Nový Zéland (EFSA, 2014).

2.1.3 Morfologické vlastnosti patogena

Erwinia amylovora je gramnegativní bakterií (Bogs a kol., 1998). Jedná se o bakterii tyčinkovitého tvaru, která je fakultativně nekrotrofní. Fakultativní nekrotrof dokáže za určitých podmínek přežívat saprotroficky na odumřelých pletivech rostliny. Díky tomu lze bakterie primárně parazitické kultivovat na umělých živných médiích (Kůdela a kol., 1989). Bakterie *Erwinia amylovora* jsou dále chemoorganotrofní, s metabolismem aerobně respiračním a fermentativním. Rozměry bakterií činí 0,5-1 μm x 1-3 μm . Bakterii řadíme do třídy peritrich. Peritrichem je definována bakteriální buňka, která je obrvená po celém povrchu těla bičíky. Pomocí těchto bičíků se může pohybovat. Bakterie nevytváří pouzdra ani spory. Její kolonie rostou na běžných půdách jako je masopeptonový agar, King B médium, nebo živném médiu s levanem. Optimální teplota pro růst je 27-30°C. Na výživu jsou nenáročné (Rosypal, 1981).

Významným pro rod *Erwinia*, stejně jako pro mnoho dalších bakterií je produkce exopolysacharidů. *Erwinia amylovora* se vyznačuje tvorbou exopolysacharidů amylovoranu a levanu. Produkce levanu na sacharosovém médiu je typická u většiny kmenů *Erwinia amylovora* i když některé kmeny tuto vlastnost nemají (Kokošková, Mráz, 2008). Levan je látka sestávající se z homopolymeru fruktózy a je produkován enzymem levansucrasou. Pokud je exprese tvorby levanu v bakterii nějakým způsobem omezena, je u této bakterie zároveň snížena schopnost virulence. To však neznamená, že by taková bakterie byla zcela avirulentní (Gross a kol., 2014).

Exopolysacharid amylovoran byl poprvé izolován z bakteriálního slizu. Skládá se z komplexu vysokomolekulárních sloučenin o velikosti 50-150 mDa. Základními

stavebními složkami jsou galaktóza a glukóza. Amylovoran plní pravděpodobně více funkcí. Hraje roli například při kolonizaci xylému (vodivých pletiv) rostliny a zároveň se podílí na odolnosti a celkové životaschopnosti bakterie za stresových podmínek. Kmeny neschopné vytvářet tuto látku jsou avirulentní. Zkoumáním několika bakteriálních kmenů *Erwinia amylovora* byla prokázána korelace mezi produkcí amylovoranu a stupni virulence (Gross a kol., 2014). Genom bakterie *Erwinia pyrifoliae* neobsahuje gen kódující levansucrasu a produkuje tak pouze amylovoran (Smits a kol., 2010).

2.1.4 Molekulární charakteristika patogena

Chromozom *Erwinia amylovora* obsahuje přibližně 53,5 % guaninu a cytosinu. Kruhový chromozom bakterie má velikost okolo 3,8 Mbp a genom zahrnuje dále plazmid pEa72 o velikosti 71 487 bp a plazmid pEa29 o velikosti 28 243 bp (Smits a kol., 2010).

Vědecké práce porovnávající genotypové a fenotypové vlastnosti jednotlivých kmenů *Erwinia amylovora* ukázaly, že se jedná o velmi homogenní bakterii (Yaich a kol., 2011). Genotypové i fenotypové znaky se u izolovaných kmenů téměř shodují. Nukleotidové sekvence v chromozomech vykazují shodu vyšší 99% (Smits a kol., 2010). Bylo prokázáno, že na genetické variabilitě bakterií se podílejí v nejvyšší míře plazmidy. V nedávné době byl objeven a popsán nový plazmid, který je popsán pod názvem pEa68 (Ismail a kol., 2014).

2.1.5 Hostitelský okruh

Erwinia amylovora je bakterií napadající přes 180 druhů rostlin z 39 rodů čeledi *Rosaceae* (růžovité). Bakterie tak představuje ohrožení zejména v odvětví pěstování jabloní (*Malus domestica*) a hrušní (*Pyrus communis*). Výskyt však může být prokázán i na mnoha dalších i divoce rostoucích dřevinách. Mohou být napadány rostliny např. hlohy (*Crataegus*), mišpule (*Mespilus*), skalníky (*Cotoneaster*), kdouloně (*Cydonia*), hlohovce, a jeřáby (*Sorbus*) (Peil a kol., 2009; OEPP/EPPO, 2013). Hrušně jsou více náchylné oproti jabloním (Yaich a kol., 2011).

2.1.6 Symptomy

První příznaky se objevují časně z jara, za teplého a vlhkého počasí (OEPP/EPPO, 2013; Evans a kol., 2008). Projevem onemocnění bývá zčernání a odumírání květů, listů a letorostů, připomínající sežehnutí ohněm. Proto se v angličtině nazývá fire-blight. Infikované části nejprve vodnatí, poté vadnou, usychají, hnědnou, až nakonec zčernají. Příznaky jsou nejlépe pozorovatelné na jaře, kdy se doporučuje provést prohlídku stromů. Odumřelé listy i plody mohou přes zimu zůstat na stromě, aniž by spadly na zem (OEPP/EPPO, 2013; Kůdela a kol., 2002). Napadené letorosty jsou hákovitě ohnuté a odumřelé. Velmi typickým poznávacím znakem pro spálu růžovitých jsou kapičky bakteriálního slizu, které jsou nejprve bílé, později jantarové barvy objevující se na plodech, listech i květech nejčastěji za vlhkého a teplého počasí (OEPP/EPPO, 2013; Evans a kol., 2008). Bakteriální sliz, jehož tvorba je pro bakteriózy typická, obsahuje kromě samotných bakterií také extracelulární polysacharidy (Kůdela a kol., 1989).

Napadení letorostů a starších výhonů se projeví v dalších letech snížením výnosu. Dojde-li k rozšíření patogena do kosterních větví, kořenů a kmene, může být ohrožen celý strom. Pokud dojde k napadení květů a plodů, je tak úroda zcela zničena (Kůdela a kol., 2002).



Obr. 1: Příznaky vyvolané *Erwinia amylovora*. Na snímku lze vidět hákovitě zahnutý letorost, infikované listy a vytékající bakteriální sliz na povrchu napadeného listu. (Zdroj: <http://utahpests.usu.edu/IPM/images/uploads/factsheet/fire-blight/fig1arrows.jpg>)



Obr. 2: Na fotografii lze vidět typické příznaky spály růžovitých rostlin. Nekrotizované listy a plody zůstávají viset na stromě. (Zdroj: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e8/Fire_blight_\(Erwinia_amylovora\)_of_pear.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e8/Fire_blight_(Erwinia_amylovora)_of_pear.png))

2.1.7 Infekční cyklus patogena

Patogen se šíří mnoha způsoby. Pro šíření *Erwinia amylovora* je typická nespecifická forma přenosu. Takovýto způsob šíření znamená náhodný kontakt bakterie s náhodným vektorem. Na šíření tohoto původce spály růžovitých rostlin se tak podílí hmyz ze 77 rodů zahrnujících včely, i žravý, kousavý a savý hmyz. Květy jsou vůči bakteriální spále růžovitých nejvíce náchylné, jelikož disponují mnoha potenciálními vstupními místy pro penetraci patogena do rostliny. Těmito místy jsou blizna a nektartody. V ohrožení jsou zejména později kvetoucí stromy a keře. To znamená zejména hlohy, hlohyně a skalníky a dále některé hrušně a pozdní odrůdy jabloní (Kúdela, 1990). Do nektárií se patogen dostává např. pomocí včel a dalšího opylujícího hmyzu (Bogs a kol., 1998). Z toho důvodu je velmi důležité kontrolovat stromy a potenciální příznaky spály růžovitých rostlin pozorovat ještě před rozkvětem (Evans a kol., 2008). Větší vzdálenosti bakterie překonává za pomoci ptactva. Antropochorie, tedy přenos patogena za pomoci člověka může být častou formou přenosu. Bakterie mohou ulpět na oblečení, zejména na nástrojích a mechanizaci. Přenáší se též řízků, roubováním a dalším reprodukčním a rostlinným materiálem (Bogs a kol., 1998; Kúdela, 1990). Do plodů se bakterie dostává systémově skrze stopky z napadených plodonošů, případně přes poranění a lenticely. Napadená pletiva plodů vodnatí a později dochází k nekróze. Do rostlin patogen vniká skrze lenticely hydatody, průduchy, trichomy a různá mechanická poranění způsobená hmyzem, krupobitím apod. Zdrojem infekce mnoha sadů mohou být

divoce rostoucí rostliny z čeledi *Rosaceae* napadené patogenem. Pokud panuje teplé a vlhké počasí, dochází ve vyšší míře k sekreci slizu z postižených částí nemocných rostlin. Tento sliz vytváří jemné vláknité útvary tzv. vzdušné provazce, které jsou unášeny větrem na větší vzdálenosti. V této formě mohou bakterie přežít minimálně 2 hodiny (Kůdela a kol., 2002). Tento jev se nazývá anemochorie. Proces zahrnuje uvolnění, přemístění a uložení (Kůdela a kol., 1989). V tomto případě to znamená uvolnění bakteriálního slizu do atmosféry, patogen je následně větrem unášen a působením vlhkosti dojde na jiném místě ke kondenzaci a bakterie se tak přenesou i na velké vzdálenosti (Kůdela a kol., 2002).

Hydrochorie (přenos patogena vodou) hraje pro přenos bakteriální spály růžovitých rostlin též významnou roli. Voda může být jednak médiem ve kterém se bakterie mohou pohybovat, s její pomocí však dochází zejména k šíření za pomoci dešťů, mlhy, vodních toků a zavlažování. Srážky mohou uvolnit bakteriální buňky (rezidentské částice), které již na rostlinu přilnuly pomocí slizu. Bakterie zimu přežívá na obvodě napadených korových pletiv, odkud se z jara může uvolňovat jako primární inokulum. Mezi další formy přenosu se řadí mykochorie, kdy je vektorem houbový organismus. Zoochorií pak označujeme přenos patogenů pomocí zvířat, v případě spály růžovitých rostlin se jedná, jak bylo zmíněno výše, zejména o členovce (Kůdela a kol., 1989). Rychlost šíření patogena je úzce spjatá s počasím. V závislosti na vlhkosti, teplotě a dalších faktorech dochází k šíření bakterie v částech rostlin i k šíření patogena z rostliny na rostlinu. Sledování klimatických podmínek lze uplatnit při prevenci. Umožňuje to s předstihem předvídat rychlost šíření onemocnění (Smits a kol., 2010).



Obr. 3: Nedávno založený jabloňový sad infikovaný *Erwinia amylovora*. (Zdroj: http://www.apsnet.org/publications/imageresources/PublishingImages/PDCover2003/jul_2.jpg)

2.1.8 Ochrana před patogenem

Bakterie *Erwinia amylovora* je zařazena mezi organismy na které se vztahují karanténní opatření. Ta v případě nalezení patogena, či podezření z jeho výskytu spočívají v ohlašovací povinnosti, průzkumu rozsahu a výskytu onemocnění, dále zákazy průvozu a vývozu a případně v dalších rostlinolékařských opatření (Kokošková, Mráz, 2008).

V boji se spálou růžovitých rostlin je možné použít streptomycinsulfát a oxytetracyklin. V Kanadě například byl streptomycin používán jako efektivní a dostupný prostředek ke kontrole tohoto patogena. Na severozápadě USA byla prokázána rezistence na streptomycin, rovněž tak v oblastech Michiganu a v Britské Kolumbii v Kanadě a dále ve státě New York. V Kanadě byl registrován další prostředek pro kontrolu spály růžovitých rostlin - Prohexandione-calcium. Jedná se o rostlinný hormon, který byl vyvinut pro ochranu jablečných sadů (Mason a kol., 2013). Přestože antibiotika jsou mocným nástrojem v boji s nákazou, není ve většině evropských států aplikace těchto látek povolena. Hlavním z důvodů je obava ze vzniku rezistentních kmenů (Peil a kol., 2009). Roku 1971 již byly prokázány rezistentní bakterie vůči antibiotiku streptomycin. U nás a na území Evropy je tak kladen největší důraz na dodržování karanténních opatření bránících zavlečení a

šíření (Kúdela a kol., 2002). Na ohroženém území se používá měďnatých přípravků, nebo se využívá bakterií antagonistických vůči tomuto patogenu (Peil a kol., 2009). Například bakterie *Pantoea agglomerans* (Ewing and Fife 1972) Gavini *et al.* 1989 (kmen C9-1S), nebo *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895 (kmen A506). Dalším preventivním opatřením je šlechtění rostlin na rezistenci vůči spále růžovitých rostlin (Kúdela a kol., 2002).

2.2 Metody detekce

2.2.1 Kultivační metody

Z přírody, či sadu získané rostlinné vzorky podezřelé na výskyt *Erwinia amylovora* je třeba naočkovat na kultivační médium. Teprve pomnožením bakteriálních kultur můžeme získat čistou kulturu, kterou lze poté posuzovat. Při pozorování kolonií na živném médiu se hodnotí jejich tvar, velikost, pigmentace, tvorba slizu, zápach kultury, rychlost růstu, nebo třeba růst v tekutém prostředí (např. v bujónu). Kolonie rodu *Erwinia* mají na živném médiu krémově bílé zbarvení (Kúdela a kol., 2002). Tvar bakteriálních kolonií úzce souvisí s druhem použitého média. V případě bakterií izolovaných z rostlinného materiálu je možno využít selektivních médií pro snadnější získání čisté kultury (Vanneste, 2000; Kúdela a kol., 2002).



Obr. 4: Kolonie *Erwinia amylovora* na živném médiu.

(Zdroj: <https://gd.eppo.int/media/data/taxon/E/ERWIAM/pics/1024x0/2021.jpg>)

2.2.2 Metody chemické

2.2.2.1 Gramovo barvení

Bakterie se dělí na grampozitivní a gramnegativní podle toho, zda dochází k vymytí barviva navázaného na buněčnou stěnu po jejím obarvení tryfenylmethanovým barvivem (krystalová violet) a jodidem draselným (Lugolův

roztok). K vymytí se používá ethanol, nebo aceton. U grampozitivních bakterií k vymytí nedojde na rozdíl od gramnegativních, kam spadá i *Erwinia amylovora* (Kůdela a kol., 2002). Vymytí, nebo nevymytí krystalové violeti a lugolova roztoku je závislé na struktuře buněčné stěny bakterie. Jedním z komponentů grampozitivních i gramnegativních buněk je sloučenina peptidoglykan. U grampozitivních buněk je této složky mnohem vyšší podíl, což je patrně zodpovědné za navázání a udržení výše zmíněných barvicích látek (Beveridge, 1990).

2.2.2.2 Analýza podle obsahu mastných kyselin

Pro každou bakteriální taxonomickou jednotku je charakteristické určité složení mastných kyselin. Toto složení ovlivňují kultivační podmínky jako například složení kultivačního média a teplota kultivace, stáří kultury a zařízení, kterého bylo použito k analýze vzorku. Pro tuto analýzu byl vyvinut standardizovaný postup extrakce mastných kyselin a software pro identifikaci (Microbial ID, Newark, USA). Databáze tohoto systému zahrnuje aerobní i anaerobní bakterie včetně aktinomycet, mykobakterií a kvasinek. Pro kultivaci bylo vyvinuto standardizované médium. Identifikace trvá několik hodin. Metoda vyžaduje drahé vybavení a zkušený personál (Kůdela a kol., 2002).

2.2.3 Biochemické metody

Pomocí těchto testů se zjišťuje využívání zdrojů uhlíku a důkaz redukce dusičnanů, hydrolyzy škrobu, nebo želatiny, která se používá mimo jiné právě pro rod *Erwinia*. Dříve se biochemické a fyziologické testy prováděly ve zkumavkách. Dnes se využívá speciálně vyvinutých standardizovaných miniaturizovaných multitestovacích systémů, tzv. mikrotestů (Kůdela a kol., 2002).

Komerčně se vyrábí mnoho diagnostických miniaturizovaných souprav, zejména pro potřeby lékařské, veterinární a potravinářské mikrobiologie. Do průhledných destiček jsou vylisovány mikrozkušavky s lyofilizovanými médii, ve kterých jsou substráty pro jednotlivé testy. Princip spočívá v tom, že se do mikrozkušavek naočkuje suspenze buněk získaná z čisté kultury a po 18-24 hodinách od inokulace se odečítají výsledky. K interpretaci výsledků se využívá identifikačního registru, nebo počítačových programů. Ty však zpravidla nepočítají s potřebami fyto bakteriologie. Dají se však použít k provedení rychlých biochemických testů (Kůdela a kol., 2002).

Nejnámější jsou API-systémy (API System S.A.). Pro potřebu fyto bakteriologie byl vyvinut diagnostický systém Biolog (Biolog inc). Tato metoda na základě využití zdrojů uhlíku rozlišuje bakterie při využití mikrotitračních destiček s 96 mikrokumavkami. Po 24 hodinách od inokulace se změní zbarvení média v mikrokumavkách a pomocí počítače se analyzuje biochemický profil a program vypočítá pravděpodobnost správnosti přiřazení (Kůdela a kol., 2002).

2.2.4 Fyziologické metody

Zkoumá se vztah bakterií vůči kyslíku, teplotní růstové rozmezí, odolnost k vysokým teplotám, citlivost na antibiotika, tolerance k NaCl a typ metabolismu (Kůdela a kol., 2002).

2.2.5 Testy patogenity

Testy patogenity se provádí inokulací patogena, respektive potenciálního patogena do rostlinné tkáně rostliny, která je i v přirozeném prostředí jeho hostitelem. K posouzení patogenity a virulence izolované bakteriální kultury se provádí test na nezralých plodech hrušně, nebo jabloně. Mělo by se jednat o plody odrůdy, která je náchylná vůči *Erwinia amylovora*. Inokulační dávka se doporučuje v koncentraci 10^9 /ml v množství 10 μ l. Naočkované plody se poté ponechají 3 – 7 dní při teplotě 25 °C. Samozřejmostí je kromě inokulace zkoumaných izolátů také vytvoření pozitivní a negativní kontroly (OEPP/EPPO, 2013)

Nevýhodou tohoto testu je, že se nedá provádět po celý rok a jedinou možností, jak tyto plody určitou omezenou dobu uchovávat je skladování nezralých plodů v chladu při teplotách 4-8 °C. Dostupnou a doporučovanou modifikací této metody je test patogenity prováděný na explantátových kulturách, který se dá praktikovat po celý rok. Jedná se o části rostlin kultivované *in vitro* ve zcela sterilních podmínkách, např. sterilizovaných skleničkách. K pěstování těchto rostlin je využito speciálních živných médií (Kokošková a kol., 2009).

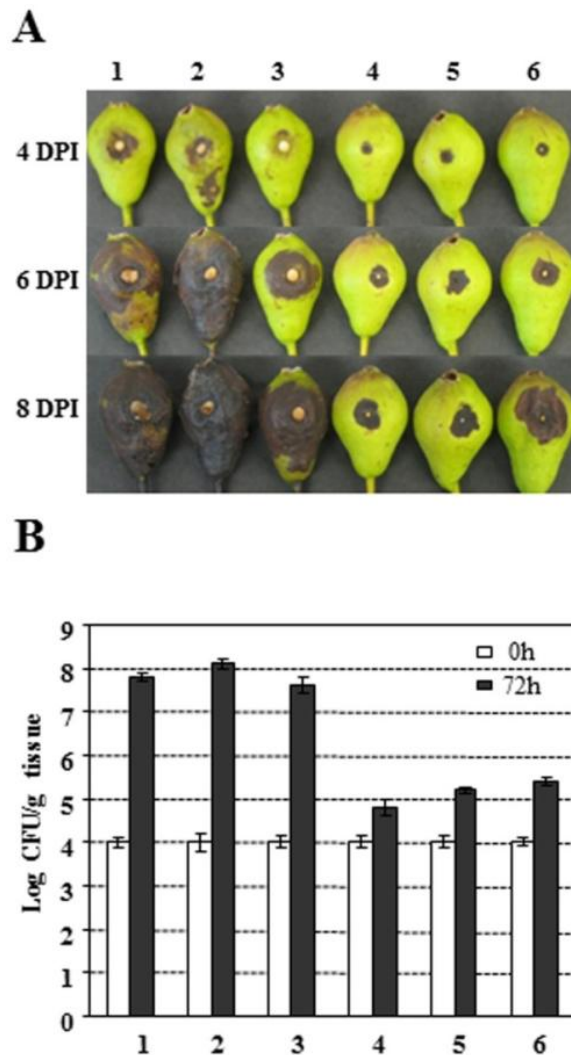
Metoda spočívá v umístění částí rostlin do takto připraveného prostředí a za pomoci umělého osvětlení a termostatu jsou rostlinám simulovány přirozené podmínky. Za těchto podmínek se rostliny ponechají 4 dny růst. Rostliny delší než 4 cm se mohou použít k inokulaci. Jako optimální množství pro inokulaci se jeví koncentrace 10^5 CFU/ml (případně 10^6 CFU/ml, testuje-li se virulence). Pletiva rostlin (případně hrušek, pokud se test aplikoval na hruškách) infikovaná *Erwinia*

amylovora vodnatí, z lenticel vytéká bělavý bakteriální sliz (Kokošková a kol., 2009).

Další obdobnou metodou je tzv. test hypersenzitivity, který se provádí na tabáku a slouží k odlišování fytopatogenních bakterií (z rodu *Pseudomonas* a *Erwinia*) od nefytopatogenních. Bakterie mající schopnost vyvolat u rostlin onemocnění způsobí utvoření nektróz v oblastech inokulace. Nekrotizace pletiv v místě inokulace je jeden z obranných systémů rostliny proti fytopatogenním organismům. Za vyvolání hypersenzitivní reakce jsou u fytopatogenních bakterií zodpovědné *hrp*-geny. V případě, že by byl patogen kompatibilní s rostlinou (při specializaci na tabák), nedošlo by k zastavení infekce a do 5 dnů by se na rostlině objevily příznaky. V případě že se nejedná o fytopatogenní bakterii, bude rostlina zcela bez nektróz a bez jakéhokoliv příznaku (Kúdela a kol., 2002).



Obr. 5: Hrušky po inokulaci bakterií *Erwinia amylovora*. Na levém plodu jsou zřetelně vidět kapky bakteriálního slizu vytékajícího z rány. (Zdroj: <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/tfipm/images/fb3.jpg>)



Obr. 6: Test virulence na nezrálých plodech hrušně (A) s vyhodnocením (B). (Zdroj: https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/168/3445560/PMC3445560_pone.0045038.g005.png)

2.2.6 Sérologické metody

Sérologické metody jsou buď kvalitativního charakteru, kde zjišťujeme přítomnost, či nepřítomnost patogena nebo kvantitativního, u kterých se stanovuje koncentrace antigenu na základě již známé koncentrace protilátek (Toman a kol., 2009). Vstup cizí látky nebo patogena do organismu živočicha vyvolá v těle takto napadeného organismu tzv. imunitní odpověď. Ta spočívá mimo dalších obranných mechanismů v tvorbě specifických protilátek proti původci této reakce. Látka (bakterie, virus, či jiný patogen), která organismus napadla se označuje jako antigen a produkt imunitní odpovědi je označován jako antisérum (Elgert, 2009).

Protilátky jsou produkovány tzv. B buňkami (B-lymfocyty), které zajišťují humorální (látkovou) imunitu. Na povrchu membrány těchto buněk je vazebné místo (receptor), které rozpozná konkrétní typ antigenu. Jakmile tento jev nastane, dojde

k diferenciaci B buněk na plazmatické buňky, které dále produkují protilátky se stejným vazebným místem. Tento jev je označován, jako klonální selekce. Takto vzniklé protilátky jsou selektivní a reagují specificky právě s antigenem, který tuto reakci vyvolal (Elgert, 2009). Lymfocyty tvoří 20 - 80% všech buněk v krvi a více než 99 % v lymfatické tekutině (lymfě). Lymfocyty reagují s antigeny ve specializovaných orgánech lymfatického systému - např. ve slezině, brzlíku, lymfatických a mízních uzlinách, kostní dřevě atd..) (Crowther, 1995).

2.2.6.1 Metoda skličkové aglutinace

Provedení skličkové aglutinace spočívá v přípravě suspenze bakterií a fyziologického roztoku. Vzorek této suspenze se následně aplikuje na podložní sklíčko a přidá se antisérum. Jsou-li patogen a antisérum homologní, dojde k vyvločkování a lze tak konstatovat, že patogen je přítomen. V případě pozitivní reakce se bakteriální shluky pozorují světelným mikroskopem (Kúdela a kol., 2002).



Obr. 7: Aglutinační test. Na obrázku lze pozorovat typické vyvločkování při pozitivní reakci. (Zdroj: <http://www.bionor.com/Monostaphkit.jpg>)

2.2.6.2 Precipitační metody

Pro provedení těchto metod je zapotřebí antisérum se střední až vyšší specifitou. Dále extrakty (maceráty) zdravých a infikovaných rostlin. Precipitační metody se provádějí buď v agarózovém gelu o koncentraci 0,5 - 1%, nebo na acetátu celulózy. V případě že se setká protilátka (antisérum) se svým homologním antigenem, vytvoří se okem pozorovatelná precipitační linie (Morales, 1989).

2.2.6.3 Ouchterlonyho metoda

Jednou z precipitačních metod je Ouchterlonyho test. Doprostřed agarózového gelu se vyřízne jamka a kolem ní se stejným způsobem provedou další důlky. Dle potřeby se vytvoří 2 až 6 otvorů. Do těchto obvodových důlků se aplikují jednotlivé

rostlinné vzorky. Do centrálního důlku se vpraví antisérum. Tyto roztoky začnou difundovat agarózovým gelem proti sobě a v případě pozitivní reakce se antigen přítomný v rostlinném vzorku a aplikovaná protilátka setkají za vytvoření okem pozorovatelné precipitační linie (Morales, 1989).



Obr. 8: Ouchterlonyho test. Na obrázku jsou patrné precipitační linie.
(Zdroj:http://www.svtnc.fr/IMG/jpg/gamme_etalon.jpg)

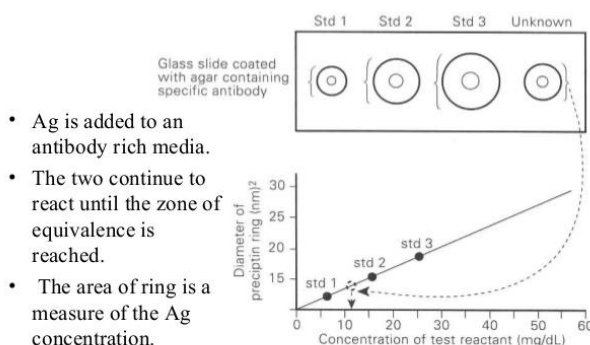
V případě, že je nosičem acetát celulózy, je potřeba využít barviva k vizualizaci precipitátu. Výhodou těchto metod je jednoduchost a rychlost jejich provedení (Elgert a kol., 2009). Je zapotřebí využít kvalitních protilátek s důrazem na specifitu a zároveň i kvalitních chemikálií. Nezbytnou součástí tohoto testu je využití tkáně ze zdravé rostliny jako kontrolního vzorku. Protilátky se totiž někdy mohou vytvořit i proti běžně se vyskytujícím proteinům v rostlině a mohly by tak spolu během testu reagovat. Mohlo by tak dojít k chybné diagnóze z důvodu falešně pozitivního výsledku. Proto je pro ověření správnosti diagnózy zdravá rostlinná tkáň nezbytnou součástí (Stanley, 2002).

2.2.6.4 Manciniho test

Modifikací Ouchterlonyho testu je Manciniho metoda, také známá jako radiální imunodifuze. Výhoda této precipitační metody spočívá v tom, že kromě přítomnosti patogena můžeme měřit i jeho koncentraci. Provádí se tak, že agarózový gel je předem napuštěn antisérem specifickým pro patogena, jehož přítomnost je detekována. Koncentrace použitého antiséra je předem známá. Do tenké agarové vrstvy čtvercového tvaru se vyříznou důlky. I zde se pro potvrzení diagnózy využívá standardu (do důlku se vpraví antigen o známé koncentraci). Do ostatních otvorů se

aplikují testované vzorky. Antigen začne difundovat do agaru obohaceného antisérem a s tím začne vznikat i precipitační linie okolo celého důlku. Rádus vytvořený precipitační linií je úměrně velký koncentraci patogena v testovaném vzorku. Test radiální imunodifuze se vyhodnocuje po 24 - 48 hodinách (Elgert a kol., 2009).

Radial Immunodiffusion



Obr. 9: Radiální imunodifuze v agaru. Hodnota průměru koreluje s hodnotou koncentrace.
(Zdroj: <http://image.slidesharecdn.com/immunodiffusion-130121011208-phpapp01/95/immunodiffusion-principles-and-application-9-638.jpg?cb=1359056050>)

2.2.6.5 Imunoelektroforetické metody

Imunoelektroforetické metody jsou postavené na principu precipitace (vytvoření pouhým okem pozorovatelné precipitační linie v případě pozitivní reakce) a dále elektroforézy. Během elektroforézy se molekuly zkoumané látky pohybují v elektrickém poli na základě své velikosti a svého elektrického náboje (Wild, 2005).

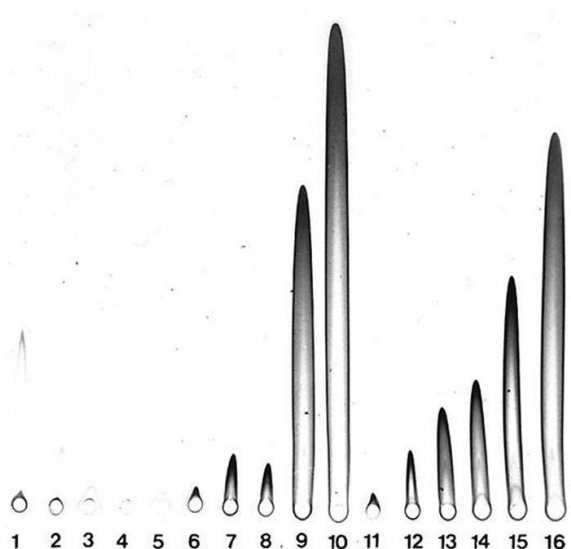
Klasická imunoelektroforéza se používá k rozboru antiséra. Jedná se o kvalitativní metodu založenou na pohybu elektricky nabitých molekul v gelu působením elektrického proudu. Rychlost a směr tohoto pohybu jsou závislé na charakteru a velikosti elektrického náboje (Elgert a kol., 2009). Médium ve kterém děj probíhá je opět buď agaróza, nebo acetátcelulózové proužky (Toman a kol., 2009). Vzniká proužek na základě kterého lze určit jednotlivé složky protilátky (např. jednotlivé typy imunoglobulinu) (Elgert a kol., 2009 ; Toman a kol., 2009).

Postup je takový, že nejprve se do gelu vytvoří jamka do které se vpraví antigen. V dalším kroku je spuštěna reakce během které se molekuly rozdělí podle své elektroforetické pohyblivosti. Po jejím dokončení se do gelu vyřízne proužek. Do

vyříznutého proužku se aplikuje roztok s polyklonální protilátkou a poté započne standartní precipitační reakce. Antigen je elektroforeticky rozdělený podle velikosti molekul na jednotlivé složky a s nimi pak v případě pozitivní reakce reagují např. jednotlivé typy imunoglobulinu za vzniku precipitační linie (Wild, 2005 ; Toman a kol., 2009).

Další metodou je vstřícná, nebo také protisměrná elektroforéza. Tato metoda připomíná Ouchterlonyho metodu s tím rozdílem, že u protisměrné elektroforézy se využívá elektrického proudu k urychlení jedné, případně obou složek reakce (antigen a antisérum). Oproti Ouchterlonyho metodě je protisměrná elektroforéza citlivější a rychlejší (Toman a kol., 2009).

Další sérologickou technikou s využitím elektrického proudu je raketová imuno elektroforéza. Jedná se o kvantitativní metodu (stanovujeme koncentraci) prováděnou v gelu napuštěném protilátkou. Antigen prochází tímto gelem a vzniká protáhlá precipitační linie ve tvaru rakety (od toho je odvozen název). Stejně, jako u radiální imunodifuze, i zde platí přímá úměrnost. Tedy čím je tato linie delší, tím vyšší je koncentrace antigenu. Tato metoda je výrazně citlivější oproti standartní radiální imunodifuzi (Toman a kol., 2009).



Obr. 10: Vyhodnocení raketové elektroforézy. (Zdroj: http://www.coloss.org/beebook/I/physiology/figure-4/image_large)

2.2.6.6 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) je založena (stejně jako u výše zmíněných metod) na vytvoření vazby (konjugaci) mezi specifickou protilátkou a antigenem se kterým specificky reaguje. Kromě toho se zde navíc uplatňuje enzym, který se naváže na tento konjugát. Do reakce se přidá substrát pro tento enzym. Štěpením substrátu dochází k zbarvení analyzovaného vzorku. Tuto barevnou změnu lze vyhodnotit již předběžně vizuálním hodnocením, ale především lze intenzitu tohoto zbarvení změřit spektrofotometricky a tak objektivně vyhodnotit koncentraci patogena. Velkou výhodou této techniky je daleko menší spotřeba protilátek, které je nutno přidat do reakce oproti metodám prováděných v agaru a zároveň je tento test díky rozpoznávací funkci enzymu daleko citlivější metodou. Nevýhodou se mohou jevit vyšší náklady na potřebné chemikálie a zároveň dražší přístrojové vybavení (Morales, 1989). Tato metoda je vhodná jako předběžná diagnóza rostlinného materiálu. Kvůli rozdílům specifity různých metod je však vhodné použít více druhů metod, které diagnózu potvrdí. ELISA je dobrou metodou, pokud jde o rychlou diagnózu (OEPP/EPPO, 2013).

K vizualizaci se využívá enzymu alkalické fosfatázy konjugované s imunoglobuliny získané z antiséra. Reakce je prováděna uvnitř mikrotitrační destičky sestávající z 96 testovacích jamek. Tyto jamky jsou povlečeny antigenem obsaženým v testovaných vzorcích. Do jamek se přidá antisérum konjugované s enzymem. Existuje několik modifikací této metody. Mezi ty nejrozšířenější patří přímá ELISA, nepřímá ELISA a „sandwich“ ELISA. Přímá ELISA je považována za jednodušší variantu z ELISA metod a sestává z těchto kroků: Nejprve se na pevnou fázi (povrch destičky) pasivně naváže antigen. Destička se během tohoto procesu inkubuje určitou dobu za určité teploty. Poté se destička vymyje a přebytek antigenu, který se nenavázal na její povrch, je vyplaven. V následujícím kroku se do destičky vpraví specifické antisérum. Spolu s ním se do reakce přidá i enzym, který se naváže na antisérum. Vznikne tak tzv. konjugát. Po tomto kroku se destička opět nechá inkubovat. Konjugát se tak naváže na antigen. Následně se destička opět promyje. Následuje přidání substrátu, po kterém enzym začne katalyzovat reakci, která v případě přítomnosti patogena vede k zbarvení celé směsi. Po určitém čase je reakce zakončena a test je na základě zbarvení jednotlivých jamek destičky

vyhodnocen. K vyhodnocení testu se dá využít speciální spektrofotometr (Morales, 1989).



Obr. 11: ELISA destička po ukončení reakce.
(Zdroj:<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/ELISA.jpg>).

2.2.6.7 Imunofluorescence

V této metodě se využívá fluorescenční mikroskopie a zároveň specifity sérologických technik. Využívané protilátky jsou zde značeny látkami obecně pojmenované fluorochromy (Storch, 2000). Fluorescence se rozlišuje na přímou a nepřímou fluorescenci. Antigen na povrchu testované bakterie reaguje se svým homologním antisérem. Vizualizace se provádí pomocí barviva, kterým je například fluorescein isothiokyanát (FITC) (Kůdela a kol., 2002). Při přímé fluorescenci ve vzorku dojde ke spojení antigenu (pokud je přítomen) s fluorescenčně značeným konjugátem. Při přímé imunofluorescenci tak reaguje barvivo s protilátkou. Po uplynutí stanovené doby se zbytek reakční směsi vymyje. Tak zůstanou v reakci pouze antigen s navázanými značenými protilátkami. Tento produkt reakce se následně zobrazuje za pomoci fluorescenčního mikroskopu (Storch, 2000).

Při nepřímé imunofluorescenci reaguje barvivo s jinou protilátkou navázanou na původně aplikovanou protilátku. Protilátka, která je neznačená, se nejprve ponechá reagovat s antigenem. Na toto antisérum se následně v dalším kroku naváže další protilátka, která již je konjugována s fluorescentním barvivem a tato značená protilátka reaguje s protilátkou neznačenou, která je spojena s antigenem. Přebytek se opět odstraní vymytím. Tato metoda je o něco přesnější oproti přímé fluorescenci, vyžaduje však důslednější kontrolu (Storch, 2000). Přítomnost patogena je potvrzena

vydávanou fluorescencí. Výhodou imunofluorescence je citlivost této metody a zároveň možnost detekovat bakterie přímo v rostlinné tkáni (Kúdela a kol., 2002).

Kromě toho, že během těchto metod je zjišťována přítomnost patogena, můžeme fluorescencí přesně určit, kde přesně a zhruba v jaké koncentraci se patogen (jeho antigen) vyskytuje (Kúdela a kol., 2002).

2.2.7 Metody molekulárně biologické

Amplifikace nukleových kyselin je základní podstatou všech organismů. Tento proces neustálého prepisování genetické informace umožňuje přenos kódovaných vlastností na následnou generaci a tím také zachování života jako takového. Proces je to poměrně složitý, avšak jeho rozřešením lidé získali cenný nástroj při výzkumu, diagnostice chorob a jejich epidemiologii, enzymů, také v mnoha oblastech zemědělství, a v mnoho dalších odvětví (Janitz, 2008; Li, Macdonald, 2015).

Za pomoci molekulárně biologických technik dnes můžeme různými způsoby manipulovat s nukleovými kyselinami. Můžeme je různými způsoby amplifikovat. Amplifikaci lze uskutečnit například polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), během které se jediná molekula replikací pomnoží až na miliardu totožných molekul. Můžeme DNA štěpit za pomoci enzymů - tzv. restričních endonukleáz. Díky tomuto štěpení je usnadněna manipulace s jednotlivými geny i jejich izolace. Dále sem patří hybridizace, kde se využívá pravidla o komplementaritě bází DNA. Díky tomu, že molekula DNA se dokáže vázat (hybridizovat) pouze s komplementární molekulou DNA, lze tak najít konkrétní sekvenci DNA nebo RNA s vysokou přesností (Alberts a kol., 2002).

Nelze opomenout dnes již velmi rozvinuté techniky sekvenování DNA, díky kterým lze rychle stanovit sekvenci nukleotidů v řetězci a tím i identifikaci jednotlivých genů, případně celých genomů. Na základě zjištěné sekvence určité DNA můžeme odvodit sled kódovaných aminokyselin a tedy zjistit primární strukturu kódovaného proteinu (Alberts a kol., 2002).

2.2.7.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR je nejznámější metodou amplifikace nukleových kyselin, kterou v roce 1983 vyvinul Karry B. Mullis. Tato amplifikace umožňuje vytvořit již během jedné hodiny z jedné molekuly cílové DNA až miliardu kopií (Li, Macdonald, 2015).

Tento objev byl velmi významným. PCR se krátce po jejím zavedení stala široce využívanou metodou k amplifikaci DNA a diagnostickým účelům. Dodnes je nejznámější a nejpoužívanější zavedenou technikou k molekulárně genetické detekci patogenních organismů (Barnes, 1994; Cheng a kol., 1994; Li, Macdonald, 2015). Za vývoj polymerázové řetězcové reakce obdržel K. B. Mullis v roce 1993 Nobelovu cenu (Rekha a kol., 2014).

Reakční směs pro PCR sestává z termostabilní DNA polymerázy, dále DNA na které se nachází cílový úsek, 2'-deoxyribonukleosid-5'trifosfáty (dNTPs), iontů Mg^{2+} (V podobě $MgCl_2$, nebo $MgSO_4$) jako kofaktorů a nakonec také sady oligonukleotidových primerů, které je třeba navrhnout tak, aby byly specifické vůči matricovému úseku (Šmarda a kol., 2005; Rekha a kol., 2014). Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců probíhající ve směru 5'-3'. Polymerázová řetězcová reakce sestává ze tří v cyklech se opakujících kroků. Každý z těchto kroků se odehrává za jiné teploty. Dvouvláknová DNA obsahující cílený úsek musí nejprve projít denurací během které dojde k rozvolnění dvoušroubovice. Reakce tedy započne zahřátím vzorku na $95^{\circ}C$ během které dochází k denuraci. Následně se vzorek ochladí na teplotu pohybující se mezi $50-65^{\circ}C$. Během této teploty dochází k dalšímu kroku: annealingu. Během annealingu dojde k hybridizaci primerů s komplementárními úseky na cílových molekulách DNA. Tyto primery se nazývají Forward a Reverse. Třetím krokem je zahřátí na teplotu $70-74^{\circ}C$. Zde se pohybuje teplotní optimum pro *Taq* DNA polymerázu. Tento poslední krok se nazývá elongace. *Taq* DNA polymeráza je enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*. Vyznačuje se vysokou odolností vůči vysokým teplotám a díky tomu nedojde k jeho deaktivaci během denaturace. *Taq* DNA polymeráza provádí syntézu komplementárních vláken ve směru 5'-3' připojováním volných nukleotidů (dNTPs) které byly v počátku přidány do reakce. Celková doba pro denuraci činí přibližně 15-45 sekund, pro annealing 30-60 sekund a pro elongaci činí 45 sekund – 2 minuty (Li, Macdonald, 2015).

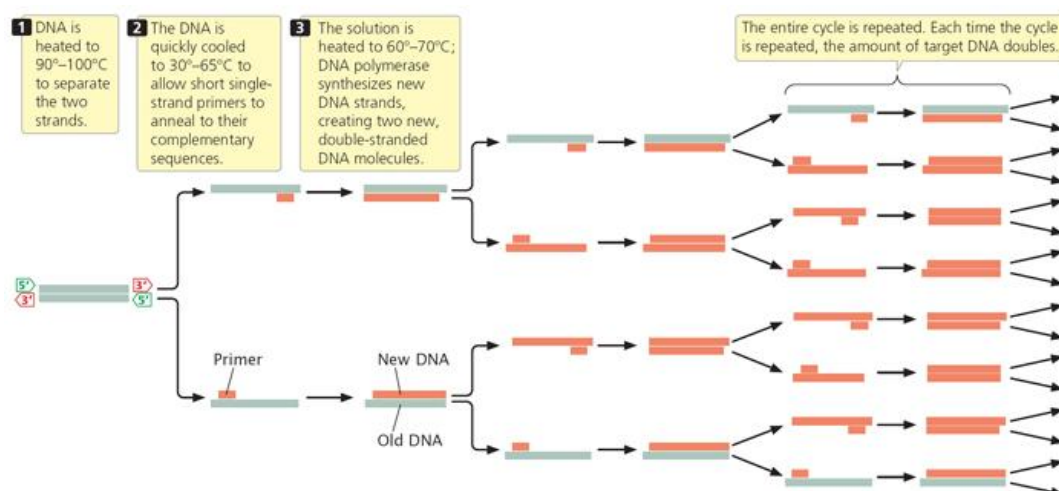
Neustálé střídání teplot během amplifikace vyžaduje nákladné přístrojové vybavení. Pro PCR reakci se využívá přístroje, který se nazývá thermocykler. Na něm se nastavuje požadovaná teplota pro jednotlivé kroky a zároveň i doba prodlev těchto jednotlivých fází. Teplotu pro připojení primerů (annealing) je třeba vypočítat ze vztahu ($T_a = 0,3 \times T_m \text{ primeru} + 0,7 \times T_m \text{ produktu} - 25$). Amplifikace se odvíjí dle

vzorce 2^n , kde n vyjadřuje celkový počet cyklů. Nárůst produktu PCR má tedy exponenciální charakter. Pro získání dostatečného množství amplifikované DNA je optimální uskutečnit 25-32 cyklů. Je třeba brát v potaz i to, že vysoký počet cyklů může zvýšit počet nespecifických produktů. Výsledné produkty PCR, tedy amplifikovaná DNA, se nazývají amplikony. Jsou to úseky DNA o délce v rozsahu desítek až tisíců bází (Šmarda a kol., 2005).

Jelikož *Taq* DNA polymeráze chybí 3' endonukleázová aktivita, nedochází k opravě chyb vzniklých replikací. Molekula ve které takto dojde k mutaci tvoří pouze zlomek z celkového ampliconu. Pro samotnou PCR tak nepředstavuje problém. Tyto chyby mají význam spíše u metod jako např. sekvenování, ne v případě detekce patogena. Chybovost *Taq* DNA polymerázy závisí na rovnoměrném složení dNTPs, obsahu volných hořčnatých iontů a pH. Pro *Taq* polymerázu se udává frekvence 1 chyby na 4000-5000 bp (Šmarda a kol., 2005).

V dnešní době existuje mnoho modifikací této metody. Mnoho z nich bylo vyvinuto pro diagnostické účely. Mezi modifikace PCR patří například Nested PCR, která je citlivější metodou oproti standardní PCR. Citlivost Nested PCR je zvýšena pomocí dvou sad primerů. Real-time PCR se využívá pro kvantifikaci nukleových kyselin (Rekha a kol., 2014).

Existuje mnoho známých sekvencí primerů. Dosud bylo publikováno mnoho příslušných protokolů popisujících detekci a identifikaci *Erwinia amylovora* (Wensing, 2011).

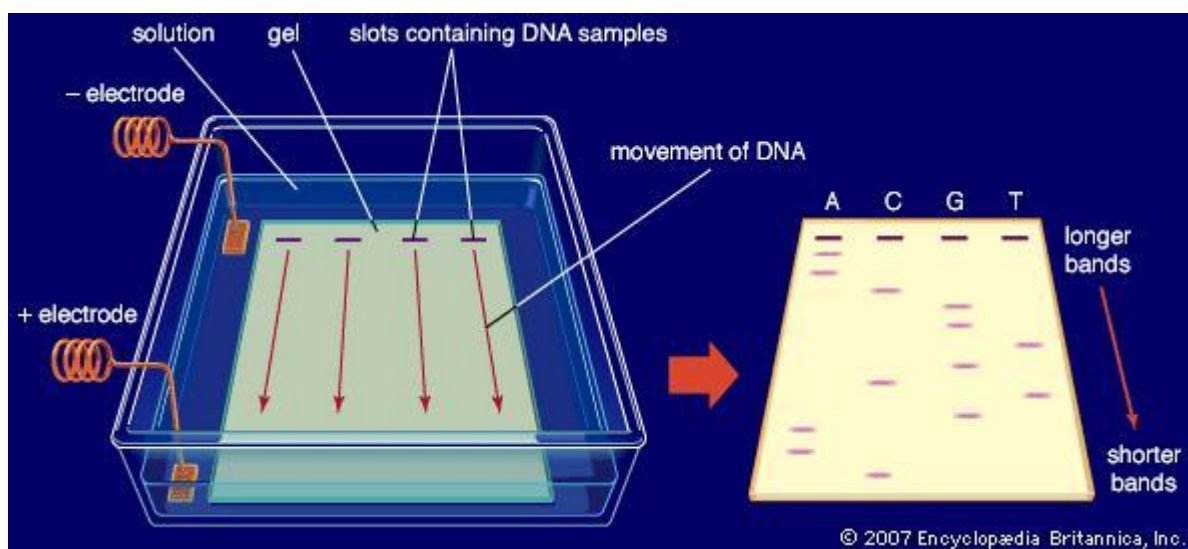


Obr. 12: Průběh polymerázové řetězové reakce a exponenciální nárůst produktu v závislosti na počtech PCR cyklů. (Zdroj: http://openwetware.org/images/3/35/Pierce_18_19_large_2.jpg)

2.2.7.2 Gelová elektroforéza

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejčastěji používaným separačním technikám při izolaci nukleových kyselin a proteinů (Šmarda a kol., 2005). Podstatou elektroforetické separace je rozdělování nabitých molekul v elektrickém poli. Molekuly se rozdělují podle jejich velikosti a elektrického náboje (Dennison, 2003). Molekula DNA je charakteristická svým záporným nábojem, který má díky své negativně nabitě fosfátové skupině. Proto se molekuly pohybují k opačně nabitě elektrodě (anodě) (Šmarda a kol., 2005; Tripathi, 2010).

Metoda se provádí ve vodném nosiči, kterým je agarózový gel vytvářející síťovou strukturu polymerních molekul s póry (Serwer, 1983). Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin přibližně od 100 bp až po 50 kbp. Podle polohy gelu se rozlišuje elektroforéza horizontální a vertikální. Rychlost pohybu se označuje jako elektroforetická pohyblivost. Ta je nepřímo úměrná velikosti molekuly. Stanovení velikosti neznámé molekuly se určuje podle již známého vzorku, tzv. hmotnostního standardu (Šmarda a kol., 2005).



Obr. 13: Separace deoxyribonukleových kyselin podle molekulové hmotnosti a velikosti v elektrickém poli. DNA se podle těchto kritérií pohybuje směrem ke kladnému pólu: anodě. (Zdroj: <http://media-2.web.britannica.com/eb-media/72/47672-004-4E16B61F.jpg>)

2.2.7.3 Hybridizace DNA

Hybridizace je založena na principu párování komplementárních jednořetězových úseků DNA (Barbu, 2007; Kúdela a kol., 2002). Využívá se rozdílu

v pevnosti kovalentní vazby mezi cukernatými a fosfátovými skupinami. Tato technika se provádí například v roztoku, v gelu, na filtrech, případně čípech. Detekovaná DNA je denaturována. Dojde tedy rozvolnění řetězců dvoušroubovice, kterého lze dosáhnout zahřátím, nebo chemickou cestou (např. pomocí NaOH). Tyto jednořetězcové úseky lze poté detekovat pomocí značených sond, které se specificky párují s jednořetězcovými DNA molekulami (Šmarda a kol., 2005).

Hybridizační sondy je třeba připravit. Jedná se tedy o jednořetězcové nukleotidové sekvence DNA nebo RNA, která je chemicky nebo radioaktivně označena (Barbu, 2007). Od radioaktivního značení se dnes pomalu upouští. Pro přípravu hybridizačních sond se používá více způsobů. První možností je využití sekvence cDNA klonované ve vektoru nebo amplifikované pomocí PCR. Druhou možností je využití uměle syntetizovaných oligonukleotidů. Takto sestavené řetězce mají obvykle délku 15-17 bází (Šmarda a kol., 2005).

Při radioaktivním značení obsahují nukleotidy sondy některý radioaktivní izotop, který se projeví zářením na vrstvě fotografického filmu, papíru či emulze. Další možností je vizualizace za pomoci chemického značení sondy, kdy jsou její nukleotidy značené např. molekulami biotinu nebo digoxigeninu. Tyto látky se vážou na dUTP použitého namísto thyminu. Sonda je potom detekována protilátkou specifickou pro digoxigenin. Na tuto protilátku je navázán enzym nebo fluorescenční barvivo. Mezi tyto enzymy patří alkalická fosfatáza, peroxidáza, nebo luciferáza. Z fluorescentních barviv se používá fluoresceinu nebo rodaminu (Šmarda a kol., 2005).

2.2.7.4 Southern blot

Tuto metodu v roce 1975 poprvé popsal E. M. Southern, po kterém je pojmenována. Je využívána k detekci specifických DNA sekvencí (např. fragmentů z RFLP). Tyto sekvence jsou separovány na agarózovém gelu za pomoci elektroforézy, během které se molekuly DNA rozdělují podle své velikosti. Poté se převádějí na nitrocelulóзовou, nebo nylonovou membránu. DNA fragment navázaný na tomto pevném nosiči může být dále identifikován za pomoci komplementárního vlákna (sondy). Prvním krokem je použití restriční endonukleázy k specifickému naštěpení DNA vláken na několik specifických úseků. Tím vznikne několik různě dlouhých molekul o různém množství. Tato směs se ve druhém kroku nanese na

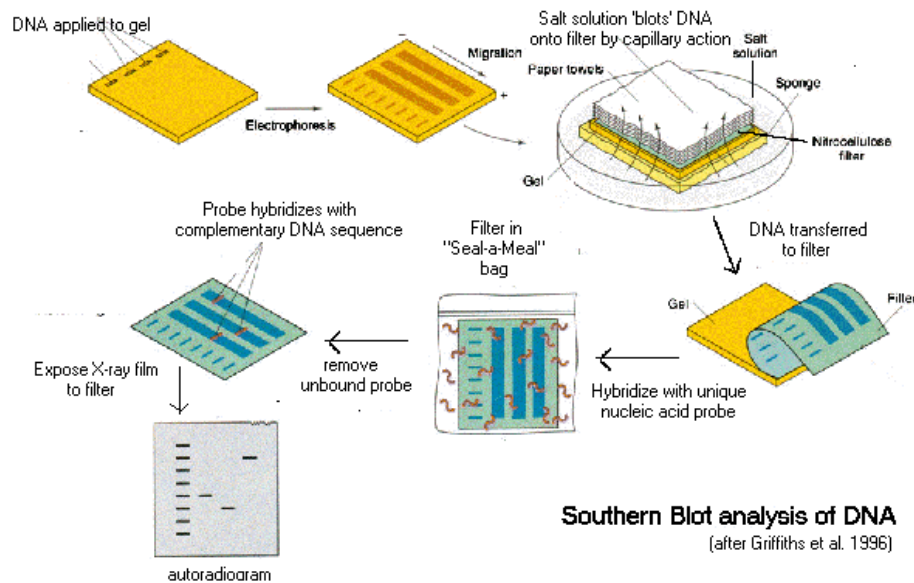
agarózový gel, na kterém začnou negativně nabitě molekuly DNA putovat různou rychlostí podle své velikosti ke kladnému pólu. Poté následuje denaturace a přenesení konkrétního fragmentu na nylonovou, nebo nitrocelulosovou membránu. Sondy mohou být značeny enzymaticky nebo radioaktivně (Edberg, 1985; Šmarda a kol., 2005). V případě enzymatického značení se do reakce přidává substrát pro daný enzym, díky kterému dojde k vizualizaci. Výsledek se na nylonové, nebo nitrocelulosové membráně zobrazí jako tmavý pruh (Karcher, 1995). Při využití radioaktivního značení je zapotřebí odborná příprava pro práci s radioaktivními materiály. Bylo vyvinuto mnoho komerčních kitů. Původně byly radioaktivně značené sondy senzitivnější, ale v současné době jsou oba typy, co se týče senzitivity srovnatelné (Stanley, 2002).

Následuje přidání sond do membrány. Sondou je DNA nebo RNA fragment o specifické sekvenci, která je komplementární DNA vláknu patogena (Barbu, 2007).

Tato metoda je spolehlivým nástrojem pro detekci. Díky technice Southern blot lze detekovat mnoho konkrétních sekvencí DNA i genomu o velikosti až několika miliard nukleotidů. Za ideálních podmínek může být touto metodou dekováno i množství 0,1 pg DNA (Stanley, 2002).

Spolehlivost Southern blot spočívá především v úspěšnosti samotné hybridizace. Ta však závisí na mnoha faktorech, které mohou ovlivnit její citlivost a specifitu. Mezi tyto limitující faktory spadá například délka sondy, účinnost a způsob jejího značení, vytváření sekundárních struktur, a zastoupení guaninu a cytosinu v DNA. Pro kontrolu specifity sondy se i zde využívá negativní a pozitivní kontroly, kterou se ověří spolehlivost testu (Stanley, 2002).

Southern blot najde kromě detekce využití například v analýze genomu, kdy je zapotřebí určit polohu cílového genu v rámci genomové nebo plazmidové DNA. Při analýze různých fragmentů, které obsahují shodné sekvence DNA, může být Southernova metoda efektivnější oproti polymerázové řetězové reakci. Polymerázová řetězová reakce a Southern blot se mohou vzájemně doplňovat například při analýze genomu (Stanley, 2002). Nevýhodou Southern blot je potřeba velkého množství DNA, značná časová náročnost a potřeba velkého množství restričních endonukleáz. Modifikací této metody je metoda Northern blot, která se využívá při hybridizaci RNA sekvencí (Edberg, 1985).



Obr. 14: Metoda hybridizace Southernovou metodou.

(Zdroj: http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/images/blotting_clip_image001.gif)

2.2.7.5 Microarrays

Trend miniaturizace dal podnět k vytvoření miniaturizovaných automatizovaných testů tzv. mikročipů, nebo také microarrays. Na povrchu takových čipů jsou navázány specifické jednořetězcové sondy. Princip metody spočívá v hybridizaci mezi testovaným vzorkem a specifickou sondou. Mikročipy jsou vyrobeny nejčastěji ze skla, které je povrchově upraveno. Sondy jsou imobilizovány na skleněném povrchu destičky. Na jedné takové destičce může být až několik stovek tisíc molekul. Je zapotřebí aby hybridizovaly pouze 100% komplemetární vlákna, což vyžaduje správnou optimalizaci hybridizačních podmínek (Gojová, Kozák, 2006).

2.2.7.6 Sekvenování DNA Sangerovou metodou

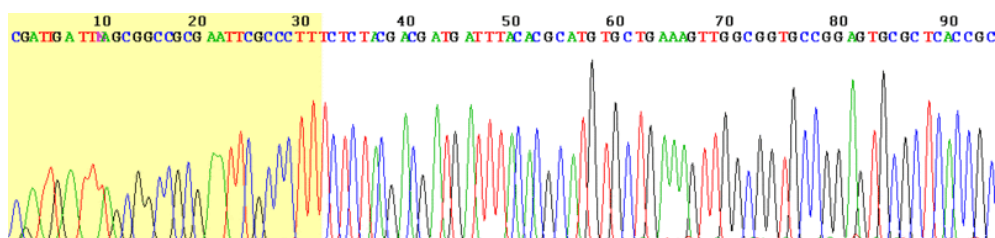
Cílem sekvenování je stanovení primární struktury DNA. Znalost sekvence DNA se využívá k odvození sekvence aminokyselin, které DNA kóduje a určuje tak primární strukturu proteinu (Šmarda a kol., 2005).

Nejběžnější metodou je Sangerova metoda sekvenování využívající působení DNA polymerázy. Do reakce vstupuje purifikovaná molekula DNA, která má být osekvenovaná, primer, který s ní hybridizuje, DNA polymeráza (např. *Taq* polymeráza) a nakonec nukleotidy. Reakce probíhá ve čtyřech vzorcích. Kromě již

zmíněných komponent se do každé mikrozkušavky přidává jeden ze čtyř ddNTPs – 2'3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát (v poměru obvykle 1:100). Jedná se o molekulu podobnou deoxyribonukleosidtrifosfátu. Rozdíl mezi dNTPs a ddNTPs je v absenci 3'-OH skupiny. Tato absence znemožňuje DNA polymeráze napojit další nukleotid. Řetězce vznikají dle pravidla o párování bází. Vlákno se začne syntetizovat od sekvenčně specifického primeru napojeného na řetězec a syntéza je terminována právě ddNTPs (Janitz, 2011; Sanger a kol., 1977; Šmarda a kol., 2005).

Po ukončení reakce a po denuraci reakční směs obsahuje různě dlouhé jednovláknové molekuly začínající 5'-konce primeru a končící příslušným dideoxyribonukleotidem. Polohy zabudovaných dideoxyribonukleotidů v sekvenci DNA terminují polohu zjišťované báze v molekule DNA (Janitz, 2011; Sanger a kol., 1977; Šmarda a kol., 2005).

Dříve se takto sekvenování provádělo ve čtyřech mikrozkušavkách zvlášť. Dnes se nejvíce využívá automatických přístrojů – sekvenátorů. Molekuly DNA procházejí určitou obdobou gelu, např. kapilárou. Využívá se zde fluorescenčního značení. Dideoxyribonukleotidy jsou označeny čtyřmi různými fluorochromy. Ty pak terminují konec syntetizovaného vlákna molekuly DNA. Molekuly jsou tříděny podle velikosti a v tomto pořadí procházejí kapilárou. V tom okamžiku dojde k vyvolání fluorescence, jejíž intenzitu zaznamenává počítač ve formě křivky. Na křivce lze vyznat podle vrcholu křivky (tzv. peaku) v které chvíli byla fluorescence nejintenzivnější. Podle této křivky můžeme určit, jak procházely jednotlivé dideoxyribonukleotidy za sebou. Počítač zároveň podle této křivky generuje textový kód – tedy zjišťovanou sekvenci DNA (Janitz, 2011; Šmarda a kol., 2005).



Obr. 15: Sekvenování Sangerovou metodou. Takto se počítačem vyhodnocuje výsledek.
 (Zdroj:https://cs.wikipedia.org/wiki/Sekvenov%C3%A1n%C3%AD_DNA#/media/File:Sanger_sequencing_read_display.png)

2.3 Metoda LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

Jde o novější metodu amplifikace nukleových kyselin, která umožňuje vysoce specifickou, účinnou a rychlou amplifikaci za izotermických podmínek. Metodu LAMP v roce 2000 vyvinul Notomi a kolektiv (Zhou a kol., 2011). Oproti konvenční a nejvíce používané PCR je LAMP rychlejší a zároveň citlivější. S pomocí LAMP je možno amplifikovat i nepatrné množství DNA v průběhu jedné hodiny až na množství 10^9 kopií (Notomi a kol., 2000). Výsledek reakce lze vyhodnotit na základě zakalení obsahu mikrozkušavky, ke kterému dojde vlivem uvolňování pyrofosfátu během reakce (Mori a kol., 2001). Vizualizaci lze provést také pomocí interkalačního činidla (Njiru a kol., 2008). Metoda LAMP díky těmto vlastnostem může být účinným nástrojem pro rychlou detekci infekčních agens (Dhama a kol., 2014).

Do reakce přichází DNA zkoumaného vzorku, dále sada primerů sestávající ze 2 vnějších a 2 vnitřních primerů, nukleotidy (dNTPs) a DNA polymeráza. Ke stabilizaci obsahu AT a GC se používá chemická látka betain a nakonec se použije stabilizační pufr. Běžně se používají látky jako Tris-HCl s hodnotou pH 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 nebo třeba KCl (Dhama a kol., 2014).

Vnitřní primery nesou názvy FIP a BIP. Vnější primery F3 a B3 plní hlavní funkci při vytěsňování původního DNA vlákna jak bude vysvětleno níže. Do reakce je možno přidat další dva primery pojmenované Loop F a Loop B. Jejich použití ještě více zkracuje dobu potřebnou pro průběh celé reakce (Nagamine a kol., 2002). Na výběr je ze dvou druhů polymeráz. Prvním je *Bsm* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus smithii* a druhým polymeráza izolovaná z *Bacillus stearothermophilus* – tzv. *Bst* polymeráza (Dhama a kol., 2014). Optimální teplotní rozpětí pro *Bst* polymerázu se pohybuje mezi 60 - 65 °C (Notomi a kol., 2000). Spolehlivě však pracuje do teploty 66 °C. Teplotní optimum pro *Bsm* polymerázu činí 60°C. Avšak bezpečně katalyzuje syntézu DNA do teploty 63 °C (Dhama a kol., 2014). Tyto DNA polymerázy dokáží katalyzovat syntézu vláken ve směru 5'-3', nemají však 5'-3' exonukleázovou aktivitu. Tato skutečnost umožňuje těmto DNA polymerázám oddělovat DNA vlákna za současné syntézy nových vláken (Kim a kol., 2014). Metodou LAMP lze amplifikovat i molekuly RNA (reverse-transcription LAMP – RT LAMP). Do reakční směsi se pak kromě *Bst*, nebo *Bsm* polymerázy přidá reverzní transkriptáza. Díky tomu lze s velkou účinností detekovat RNA viry a další

typy RNA (např. mRNA). Reverse transcription LAMP uplatnění v rámci detekce bakterií však spíše nenajde (Notomi a kol., 2000).

Celá reakce LAMP se odehrává za izotermických podmínek při teplotě pohybující se na hodnotách teplotního optima použité DNA polymerázy. Oproti PCR, kde je zapotřebí kvůli denaturaci, annealingu a elongaci neustále střídat teploty za různých časových prodlev, se LAMP jeví na první pohled jako výhodnější metoda amplifikace (Kamachi a kol., 2006).

Vydařený průběh reakce lze ověřit již vizuálně. Během reakce se totiž síran hořečnatý přeměňuje na difosforečnan hořečnatý. Touto reakcí dochází k zakalení obsahu mikrozkuhavky, ve které reakce probíhá. Podle zákalu a jeho intenzity se již dá hodnotit průběh reakce. Buď turbidimetricky, nebo po přidání některého interkalačního činidla (SYBR green, ethidium bromid,..) fluorescenčně (Kamachi a kol., 2006). Pro ověření úspěšného průběhu amplifikace tak není vyloženě nutné použití elektroforetické separace.

Jak bylo napsáno výše, v metodě LAMP hraje úlohu sada vnějších a sada vnitřních primerů. Celá reakce probíhá v izotermickém prostředí a řetězce se enzymaticky prodlužují. Proces amplifikace tedy probíhá zcela samovolně. Vnitřní primery hrají významnou roli zejména pro vytváření vláskových struktur (smyček), které jsou v reakci důležité obzvlášť během samotné elongační fáze. Tyto primery nesou názvy FIP (forward inner primer) a BIP (backward inner primer). Vnější primery plní svůj úkol zejména v první fázi celé reakce, kdy se vytváří vlákno, které je templátem pro samotnou elongaci. Ta se odehrává až posléze. Tyto vnější primery jsou tak do reakce přidány v menším množství oproti vnitřním primerům. Vnější primery jsou pojmenovány F3 (forward - přední vnější primer) a B3 (backward- zadní vnější primer) (Notomi a kol., 2000).

Principem a velkou výhodou této metody je samovolný průběh celé reakce bez nutnosti střídat teploty, jako je tomu například u PCR. Připraví se reakční směs obsahující veškeré potřebné chemikálie, primery a templátovou DNA (Notomi a kol., 2000). DNA může být před zahájením reakce denaturována. Denaturace může být provedena například vystavením vzorku teplotě 95 °C po dobu 10 minut (Yaseen a kol., 2015). Poté se vzorek zchladí například ledem a následně po zchlazení se přidá DNA polymeráza. Mikrozkuhavka se poté umístí do zahřívacího bloku, nebo jiného zařízení, ve kterém bude moci za izotermické teploty proběhnout celá reakce. Reakce

je ukončena zahřátím vzorku na teplotu 85 °C po dobu 10 minut. Celá amplifikace se dá rozdělit do dvou fází (Notomi a kol., 2000). Bylo však prokázáno, že denaturační krok není nutný a reakce proběhne stejně tak dobře i bez denaturace (Nagamine a kol., 2001).

V první fázi vznikají templátové molekuly potřebné pro samotnou amplifikaci cílového úseku. Tato molekula vytváří na svých koncích vlásenky s krátkým jednovláknovým úsekem na konci - smyčkou. Tyto krátké jednovláknové smyčky umožňují nasednutí vnitřních primerů. Vnější primery se uplatňují při syntéze templátové molekuly (proto jsou v reakční směsi zastoupeny v menší koncentraci oproti vnitřním primerům) (Rekha a kol., 2014). Reakce LAMP je ukončena vystavením vzorku teplotě 80 °C v rozmezí 2-10 minut (Kubota, Jenkins, 2015; Notomi a kol., 2000). Během této teploty dojde k deaktivaci DNA polymerázy (Zhang a kol., 2011). Ve druhé fázi pak dochází k samotné amplifikaci a elongaci amplifikovaných molekul DNA (Notomi a kol., 2000).

2.3.1 Princip LAMP

Na každé jednovláknové molekule se nacházejí místa rozpoznávaná primery vnitřními a vnějšími. Na jednom DNA vlákne se nacházejí rozpoznávací sekvence F3c, F2c a F1c ve směru 3'-5'. Na jemu komplementárním DNA vlákne pak leží rozpoznávací sekvence B1c, B2c a B3c ve směru 5'-3'. Vnitřní přední primer FIP sestává ze sekvencí F1c a F2 ve směru 5'-3' a vnitřní zadní primer BIP je ve směru 5'-3' tvořen sekvencemi B1c a B2 (Notomi a kol., 2000).

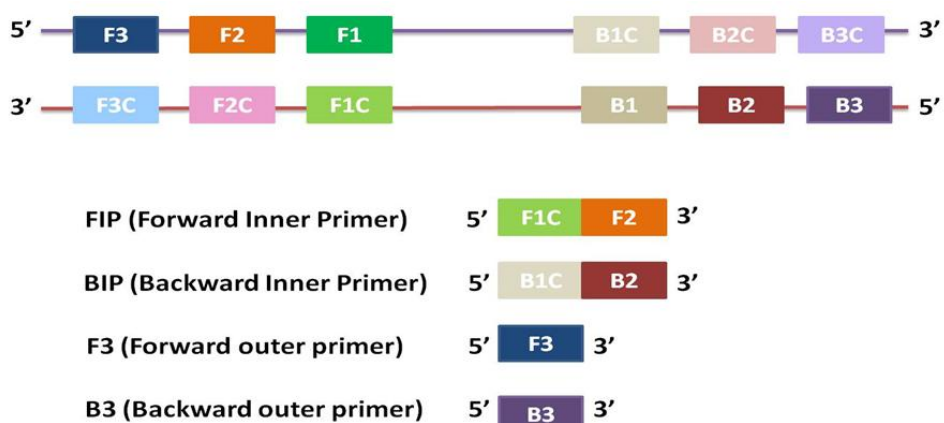
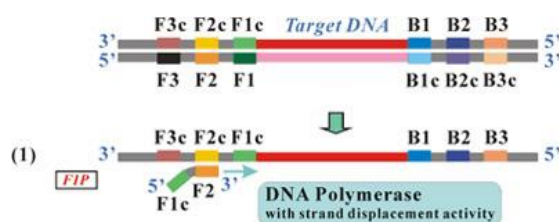


Diagram showing the location of four primers identifying six different regions in target sequence

Obr. 4: Popis a rozmístění klíčových úseků pro LAMP na DNA vláknech včetně popisu jednotlivých primerů. (Zdroj: http://nexusacademicpublishers.com/uploads/images/files/ Fig1_444.png)

Celý princip bude popsán na molekule s rozpoznávacími sekvencemi F3c, F2c a F1c. Na druhém DNA vlákně však bude probíhat totožný proces, pouze DNA sekvence a tedy i rozpoznávací místa jsou komplementární vůči vlákně popisovanému. S rozpoznávacím místem F2c nejprve hybridizuje přední vnitřní primer. DNA polymeráza začne připojovat další nukleotidy ve směru 5'-3'. A tak vznikne znovu dvouvláknová DNA. V následujícím kroku však na rozpoznávací místo F3c přisedne vnější přední primer F3 a započne znovu syntéza DNA vlákna a tím rozvolňování právě vzniklé dvoušroubovice. Vlákno vytvořené vnitřním předním primerem se tak uvolní (Notomi a kol., 2000).



Obr. 15: Nasednutí vnitřního předního primeru na matricové vlákno. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)



Obr. 16: Výsledná dvouvláknová DNA. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)



Obr. 17: Nasednutí vnějšího předního primeru. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)



Obr. 20: Předtím vzniklé vlákno bylo odděleno. Zde je nově syntetizované vlákno. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)



Obr. 8: Uvolněné vlákno DNA, které je nutné k dalšímu kroku. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)

Na tomto DNA vlákne se nalézá rozpoznávací místo pro zadní vnitřní primer (BIP), který hybridizuje svojí sekvencí B2 s rozpoznávacím místem B2c. DNA polymeráza začne vytvářet komplementární vlákno a tak vznikne opět dvouvláknová DNA. Následně nasedne primer B3, od kterého se začne syntetizovat dvoušroubovice DNA a tím se celé právě vzniklé vlákno znovu oddělí. Toto uvolněné vlákno již obsahuje všechna nezbytná rozpoznávací místa nutná k samotné elongaci (prodlužování) vlákna DNA s cílovým úsekem. Ve směru 3'-5' je toto DNA vlákno osazeno rozpoznávacími místy F1, F2c a F1c, cílovou DNA a sekvencemi B1, B2 a B1c. Jelikož na obou koncích tohoto vlákna se nacházejí dvě rozpoznávací sekvence, které jsou samy sobě komplementárními, může na obou koncích molekuly docházet přechodně k hybridizaci a vytvoření vlásenek. Takto vzniklé útvary připomínají svým tvarem smyčku (Notomi a kol., 2000).



Obr. 22: Nyní může nasednout zadní vnitřní primer a syntetizovat tak komplementární vlákno. To je však odděleno po následné hybridizaci zadního vnějšího primeru a syntéze komplementárního DNA vlákna. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)



Obr. 9: Vzniklá dvouvláknová DNA. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)



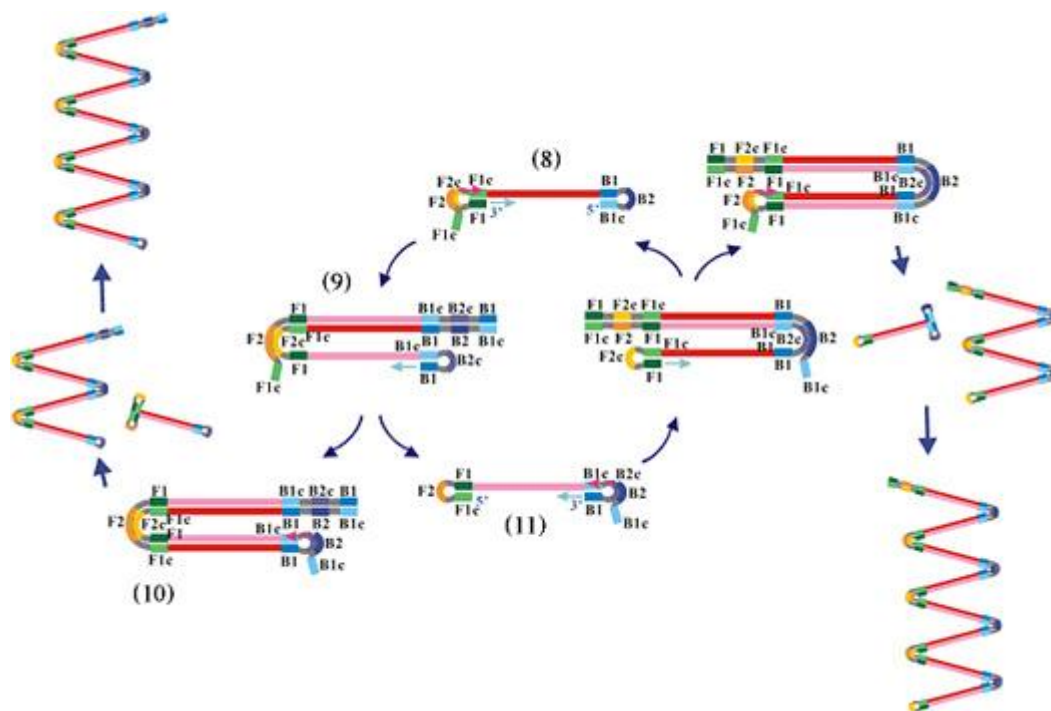
Obr. 10: DNA vlákno vzniklé vytěsněním DNA polymerázou po hybridizaci primeru B3. To je templátovou molekulou pro následnou elongační fázi. Komplementární úseky spolu hybridizují za vzniku vlásenek. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)

Tento produkt již může vstoupit do druhé fáze reakce. Na rozpoznávací místo F2c nasedne přední vnitřní primer a zahájí se tak syntéza komplementárního vlákna až k terminační sekvenci B1c. Mezitím však pokračuje syntéza komplementárního DNA vlákna od F1. Tím pádem se vytváří dvě totožná komplementární vlákna ve stejném směru každé však z opačné strany této molekuly. DNA vlákno syntetizované od sekvence F1 je totiž oproti vláknu prodlužujícího se od předního vnitřního primeru (FIP) “o něco napřed” a krátkodobě vzniká dvouvláknová DNA. Vytvářením komplementárního vlákna DNA polymerázou z druhé strany této molekuly dojde k rozpojení těchto vláken. Jejich syntéza dále pokračuje. Po dokončení tohoto procesu zůstane molekula sestávající z dvoušroubovice a přebývajících částí jednovláknové DNA, která obsahuje sekvence B1c, B2c a B1. Komplementární úseky B1c a B1 vytvoří vlásenkovou strukturu (smyčku), čímž vznikne krátký dvouvláknový úsek. V tuto chvíli může nasednout DNA polymeráza a pokračovat dále v syntéze ve směru 5'-3'. Ve chvíli, kdy DNA polymeráza dosáhne již dvouvláknového úseku vzniklého předním vnitřním primerem, začne toto vlákno celé oddělovat a dál pokračuje v napojování nukleotidů. Vznikne tak dvouvláknová molekula s vlásenkou, na které leží rozpoznávací místo pro vnitřní zadní primer (BIP) a dále se oddělila jednovláknová molekula se sekvencemi F1c, F2, F1 na jedné straně a B1c, B2 a B1 na straně druhé (ve směru 3'-5'). Tato jednovláknová molekula díky komplementárním úsekům na obou svých koncích utvoří znovu smyčkovité útvary a poslouží opět jako templát pro amplifikaci. Tentokrát má však opačné regiony oproti templátové molekule vstupující do elongační fáze popisované výše. Z jedné jednovláknové molekuly tak vznikla jedna molekula dvouvláknová obsahující dva cílové úseky DNA a druhá kratší jednovláknová molekula s komplementárním úsekem cílového genu. Na obou molekulách je rozpoznávací úsek pro zadní vnitřní primer, který nyní hybridizuje s oběma molekulami. Kratší jednovláknová molekula projde totožným procesem jako předtím molekula templátová, pouze nyní bude komplementární vlákno obsahovat cílovou molekulu a reakce započne iniciací zadním vnitřním primerem (BIP). Mezitím bude pokračovat další syntéza na nyní dvouvláknové molekule DNA také za pomoci zadního vnitřního primeru (BIP). Po hybridizaci zadního vnitřního primeru dojde k rozestoupení dvouvláknové molekuly do tvaru písmene V. DNA polymeráza začne ve směru 5'-3' napojovat nukleotidy, čímž se začne zároveň dvouvláknový úsek

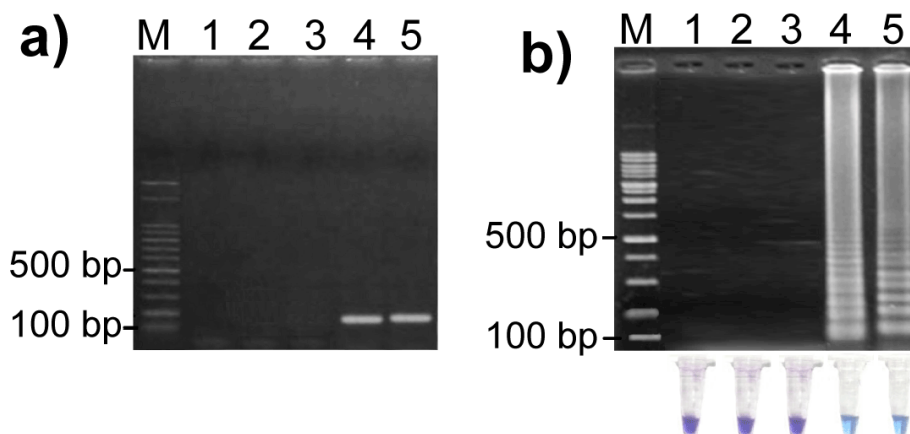
DNA rozvolňovat. Takto opět vznikne molekula, ve které je dvouvláknový úsek a dále jednovláknový zbytek. Tento jednovláknový zbytek obsahuje cílovou sekvenci, dále sekvence F1c, F2 a F1 a komplementární sekvenci cílového úseku zakončenou oblastmi B1c, B2c a B1. Toto uspořádání způsobí to, že se celý jednovláknový zbytek na základě vytvořených smyčkovitých útvarů narovná (neplatí pro vlásenky – smyčky). Jakmile vznikne tento útvar, dokončí DNA polymeráza syntézu komplementárního vlákna vůči tomuto jednovláknovému úseku. Činnost DNA polymerázy nadále pokračuje ve chvíli, kdy narazí na úsek dvouvláknový. Ten se začne jednoduše znovu oddělovat a DNA polymeráza mezitím oddělovaný zbytek znovu dosyntetizuje. Tak vznikne dvouvláknová molekula, ve které jsou již čtyři kopie cílového úseku. Oddělený jednovláknový úsek obsahuje sekvence B1, B2c a B1c, komplementární sekvenci vůči cílovému úseku, sekvence F1, F2 a F1c, cílovou sekvenci a nakonec sekvence B1, B2 a B1c. Vzhledem k výskytům komplementárních úseků se na této molekule utvoří tři vlásenkové struktury. Díky vlásenkovým strukturám bude mít molekula dočasně tvar písmene T (Notomi a kol., 2000).

Mezitím z předtím krátké jednovláknové molekuly vznikla další matrice s klíčovým rozpoznávacím místem B2c. S tímto místem hybridizuje zadní vnitřní primer a DNA se začne prodlužovat (Notomi a kol., 2000).

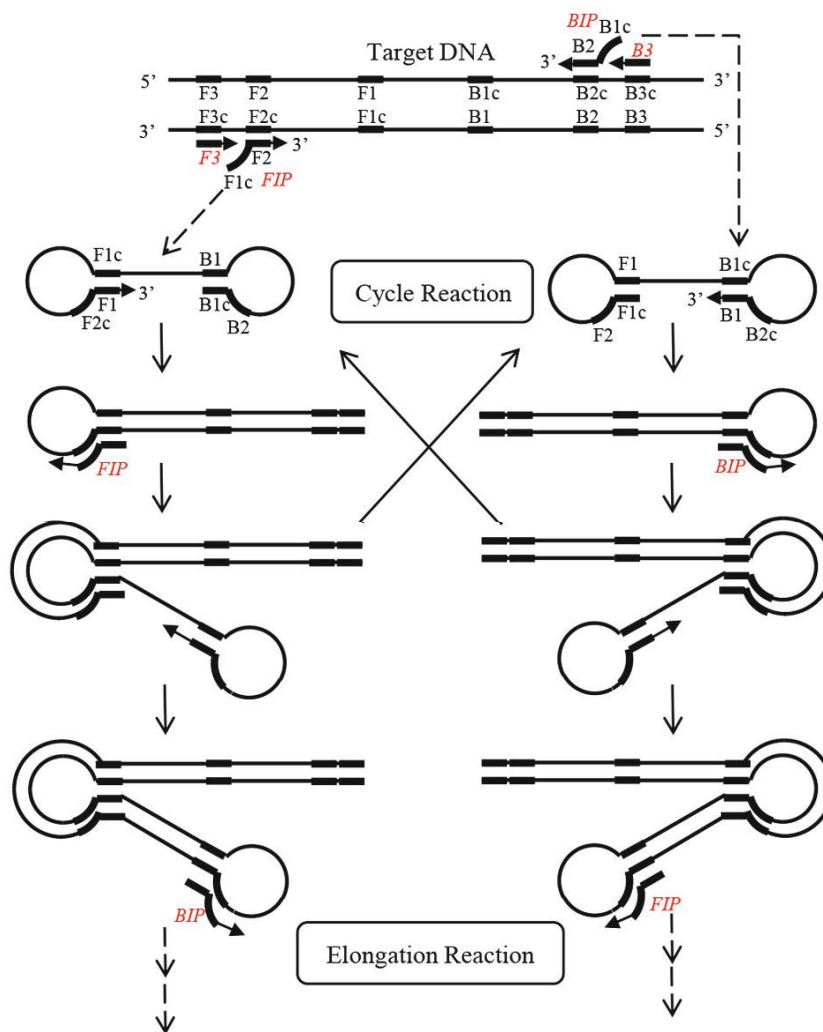
Z celého výše popsaného postupu vyplývá, že produktů celé reakce je mnoho a tyto produkty nabývají různé délky. Tuto skutečnost můžeme pozorovat i při samotné elektroforetické separaci DNA. Oproti PCR, kde se úspěšný průběh amplifikace zobrazí na gelu jako jeden proužek, se úspěšně amplifikované produkty LAMP objeví jako mnoho proužků rozdělených podle velikostí. Rozdíly jsou tak malé, že na gelu připomíná spíše jeden celistvý sloupec, než jednotlivé proužky (viz. obr. 26) (Notomi a kol., 2000).



Obr. 11: Průběh metody LAMP. (Zdroj: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>)



Obr. 26: Elektroforetické vyhodnocení amplifikace metodou PCR (a) a metodou LAMP (b). (Zdroj: <http://www.omicsonline.org/JPPMimages/2157-7471-4-153-g004.gif>)

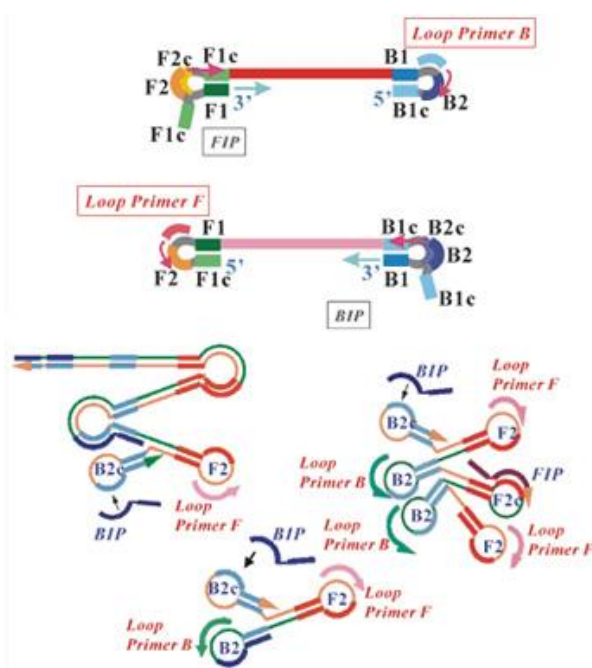


Obr. 27: Průběh metody LAMP. (Notomi a Mori, 2015 – převzato)

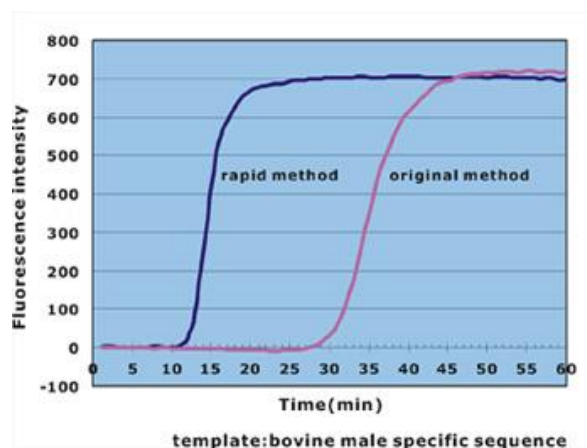
2.3.2 Urychlení reakce přidáním loop primerů

Metodu LAMP lze ještě více zefektivnit přidáním dalších dvou primerů. Do reakce tedy vstupují tři sady primerů, které rozpoznávají osm DNA sekvencí. Kromě čtyř standartních primerů FIP, F3, BIP a B3 tak do reakce přichází další dva tzv. loop primery pojmenované Loop F (Loop forward) a Loop B (Loop Backward). Loop F má rozpoznávací místo mezi rozpoznávacími sekvencemi pro FIP primer, a sice mezi F1 a F2. Následná syntéza komplementárního vlákna začne probíhat ve směru rozpoznávacího místa F2. Rozpoznávací místo pro primer Loop B primer leží mezi rozpoznávacími sekvencemi pro BIP primer, to znamená mezi rozpoznávacími oblastmi B1 a B2. Nové komplementární vlákno se začne vytvářet směrem k rozpoznávacímu místu B2. Loop primery se tedy uplatní teprve po vytvoření templátového vlákna, které je klíčovým prvkem pro elongační fázi. Jak bylo popsáno

výše, tento templát má na každém ze svých konců vlásenkovou strukturu. Na jednom z těchto konců se pak bude vždy nacházet jedno z rozpoznávacích míst pro loop primery. Na jednom konci pak nasedne vnitřní primer, od kterého se začne syntetizovat komplementární vlákno vůči templátovému, které se zároveň bude dále ve směru 5'-3' enzymaticky prodlužovat a na druhém konci hybridizuje loop primer a začne se od tohoto konce syntetizovat nové DNA vlákno ve směru 5'-3'. Aplikace těchto extra primerů celou LAMP reakci zrychlí o více než polovinu. Úspora času je tak skutečně markantní (Nagamine a kol., 2002).



Obr. 28: Amplifikace LAMP s využitím loop primerů. Na obrázku je patrné, jakým způsobem dochází k urychlení celé reakce. (Zdroj: http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/img/loop_01.jpg)

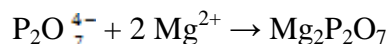


Obr. 29: Reakce LAMP s využitím urychlující sady primerů. V průběhu reakce byla měřena a zaznamenávána intenzita vydávané fluorescence korelující s amplifikovaným množstvím dvou analyzovaných vzorků. Růžová křivka představuje amplifikaci vzorku s využitím standardních 4 primerů. Modrá křivka prezentuje vzorek LAMP s využitím loop primerů. Doba potřebná pro reakci se zkrátila téměř o polovinu. (Zdroj: http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/img/loop_02.jpg)

2.3.3 Vyhodnocení LAMP

Zda-li došlo k úspěšné amplifikaci vzorku lze odhadnout již od pohledu na mikrozkuhavku. Během amplifikace se totiž síran hořečnatý přeměňuje na difosforečnan hořečnatý. Díky tomu dochází k zakalení obsahu mikrozkuhavky, ve které reakce probíhá. Podle intenzity zákalu se dá již konstatovat, zda došlo k amplifikaci. Dále lze výsledek metody LAMP vyhodnotit přidáním některého interkalačního činidla (SYBR green, ethidium bromid,..) případně fluorescenčně (Kamachi a kol., 2006).

Vznik pyrofosfátu a jeho reakce s Mg^{2+} se odehrává tímto způsobem:



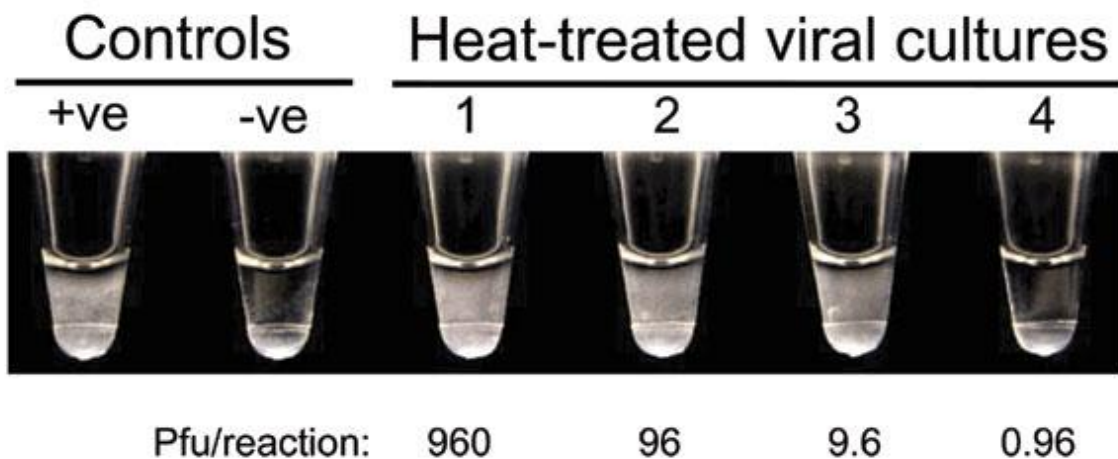
Jak bylo naznačeno výše, během reakce LAMP dochází v reakční mikrozkuhavce k precipitační reakci. Při vytváření nových DNA vláken se tím, jak se zařazují nové nukleotidy, uvolňuje pyrofosfát. S touto sloučeninou posléze reagují ionty hořčíku (Mg^{2+}) za vytvoření bílého zákalu uvnitř mikrozkuhavky (Mori a kol., 2001). Bylo ověřeno, že intenzita zákalu je přímo úměrná množství DNA nově syntetizované LAMP amplifikací (Mori a kol., 2003). Přítomnost zákalu má tak vypovídací hodnotu o tom, zda amplifikace proběhla, či nikoli (Nagamine a kol., 2002). Testujeme-li vzorek na přítomnost DNA patogena, lze již na základě

přítomného zákalu předpokládat, že DNA tohoto patogena je přítomna v testovaném vzorku. Tento precipitát je patrný již na první pohled. Pro lepší posouzení někteří autoři nechali vzorek po LAMP reakci odstředit. Centrifugaci lze provést například při rychlosti 5000 otáček/min po dobu 10ti minut. Precipitát zůstává na dně zkumavky v podobě nápadné usazeniny, a tím lze snadněji určit přítomnost amplifikované DNA. Je-li dalším krokem následná manipulace s DNA např. pro objektivnější posouzení výsledku, doporučují Mori a kol. 2001 odstranění supernatantu a přidání 50 ml destilované vody. Tento krok se pro vyšší čistotu provádí celkem třikrát (Mori a kol., 2001). Druhou možností, jak lze precipitaci hodnotit je stanovení turbidity pomocí spektrofotometru (Mori a kol., 2001), případně turbidimetru (Mori a kol., 2003). Nejprve se připraví slepý vzorek, který sestává z pufru odpovídající složením a koncentrací pufru, ve kterém reakce probíhala. Po změření slepého vzorku se do kyvety aplikuje určitý objem pufru použitého pro cílový vzorek. Rozdíl v intenzitě zákalu mezi slepým a cílovým vzorkem je pak výsledkem turbidimetrického měření. Jelikož intenzita zákalu koreluje s množstvím amplifikovaného produktu, i naměřená hodnota se od tohoto množství odvíjí (Mori a kol., 2001). Měření se doporučuje provést co nejdříve po dokončení amplifikace (Zhang a kol., 2014). Vzrůstající intenzitu zakalení je možno zaznamenávat již v průběhu reakce. (Mori a kol., 2001). Tzv. real-time turbidimetrie umožňuje získávat data v krátkých časových intervalech a zaznamenané hodnoty vynést do grafu. Princip měření metody je stejný. Zákal se hodnotí přímo v reakčních zkumavkách. Přístroj je upraven způsobem, který zajišťuje izotermické prostředí. Je možno měřit i více vzorků najednou. Vyhodnocení lze provést počítačem (Mori a kol., 2003).

Princip stanovení hodnoty zákalu se stanovuje následovně. Světelným zdrojem ve spektrofotometru, nebo turbidimetru je vyzařováno záření určité vlnové délky. Tuto hodnotu lze označit jako I_{LED} . Vyzařované světlo prochází kyvetou skrze vzorek. Částice zodpovědné za zákal uvnitř mikrozkušavky určitý podíl dopadeného světla absorbují, nebo odrazí. Světlo, které prošlo kyvetou je zachyceno senzorem (tím je zpravidla fotodioda). Tuto naměřenou hodnotu můžeme označit jako I_{PD} . Čím více koloidních částic se nachází v měřeném vzorku, tím méně světla projde vzorkem a bude zachyceno. Intenzita zákalu se vypočítá jako logaritmus podílu záření, které bylo zachyceno senzorem a záření vyzařovaného světelným zdrojem. Tedy podle

vzorce $\ln(I_{PD} / I_{LED})$. Světelným zdrojem může být například LED dioda (Mori a kol., 2003).

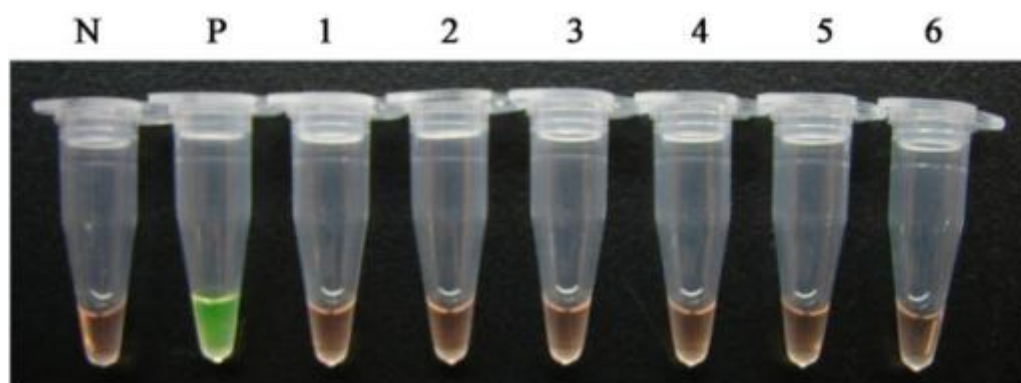
Vyhodnocení LAMP na základě přítomného zákalu je šetrné vůči životnímu prostředí oproti vyhodnocení s využitím interkalačních činidel (Mori a kol., 2001; Zhang a kol., 2014).



Obr. 30: Vyhodnocení reakce LAMP podle zákalu. Zleva: První vzorek sloužící jako pozitivní kontrola, negativní kontrola a dále testované vzorky. Čím vyšší intenzita zákalu mikrozkumavky, tím vyšší je koncentrace přítomného patogenního organismu. (Zdroj: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/images/06-1572-appF1-s1.jpg>)

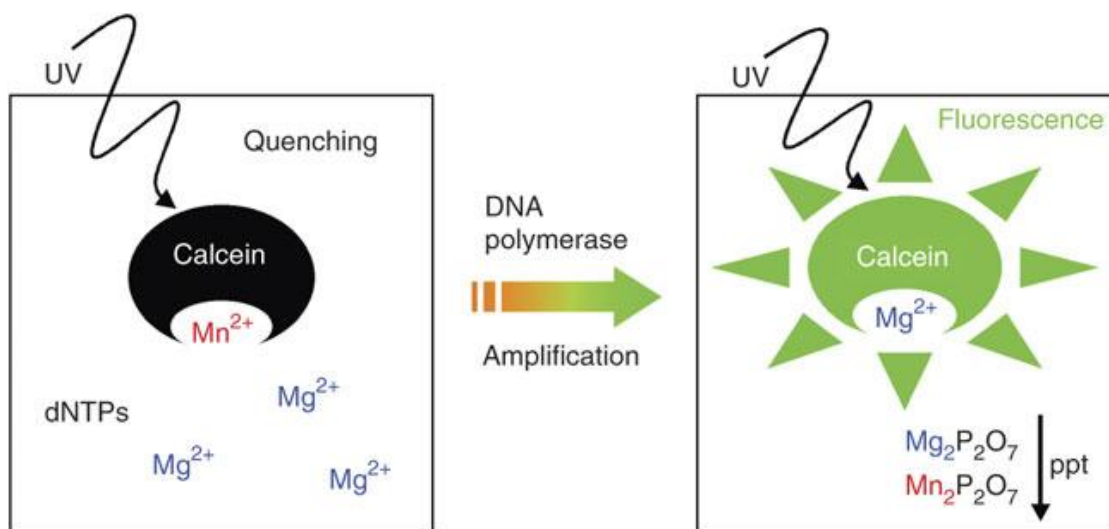
Dalším způsobem, kterým lze ověřit přítomnost patogena (respektive správný průběh amplifikace), je využití některého z řady interkalačních činidel. Mezi ta nejznámější patří SYBR green a ethidium bromid. Tato činidla se nespecificky váží na dvouvláknovou strukturu DNA za změny zbarvení. V případě barviva SYBR green dochází při navázání se na dsDNA ke změně oranžové barvy na zelenou. Detekovat se dá kromě pozorování na denním světle také pod UV světlem. Ethidium bromid se také váže na dvouvláknovou DNA a v případě navázání lze tuto DNA detekovat pod fluorescenční lampou. Ethidium bromid má pod UV světlem růžovou barvu a jeho nevýhodou jsou jeho teratogenní a mutagenní účinky. Interkalační činidla mají inhibiční účinek na průběh LAMP a z toho důvodu se přidávají nejčastěji po dokončení reakce (Zhang a kol., 2014). Stejně jako se dá v reálném čase zaznamenávat intenzita zákalu, i fluorescence se dá měřit během celého procesu. Při přípravě reakční směsi se přidává interkalační činidlo, kterým může být například

SYBR green. S nárůstem amplifikované DNA se pak zvyšuje i intenzita vyzařované fluorescence (Lucchi a kol., 2010).

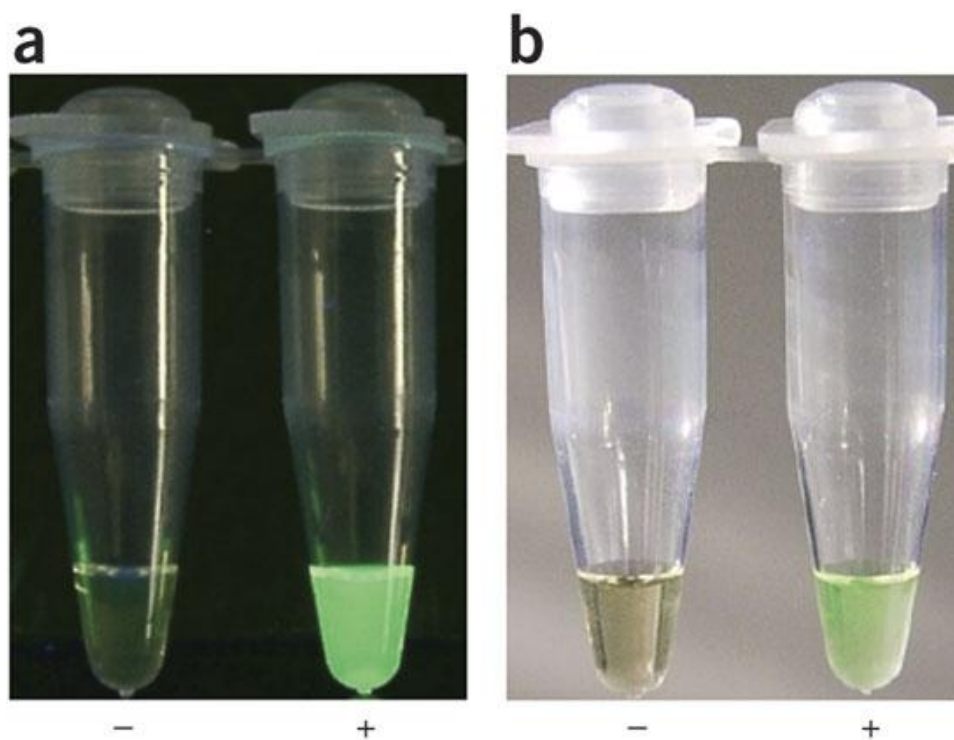


Obr. 31: Detekce LAMP s pomocí interkalačního barviva SYBR green. Barvivo se váže na dvouvláknovou DNA a v takovém případě je vzorek detekován na základě vydávané fluorescence. Na obrázku je tento vzorek mezi ostatními vzorky snadno patrný. (Zdroj: https://lh3.googleusercontent.com/nf0f3Yj1jEX39p7KL554CVqxavrRbeZ14gpqm57zozloNX7L_PGyiE5yFwR9w-JZgR4AecM=s170)

Dalším způsobem detekce je využití indikačních barviv – tzv. kolorimetrické značení. Jedním z těchto barviv je calcein. Calcein se přidává před samotnou LAMP reakcí přímo do reakční směsi. Tato látka je na začátku celé amplifikace v interakci s ionty Mn^{2+} . Během reakce jsou ionty manganu z této vazby uvolňovány. Reagují totiž s uvolňujícím se pyrofosfátem za vzniku $Mn_2P_2O_7$. Mn^{2+} je jedním z prvků, které inhibují fluorescenční vlastnosti calceinu. Po jeho vyvázání se začnou prázdná vazebná místa v molekulách calceinu obsazovat ionty Mg^{2+} . Další ionty Mg^{2+} obsažené v reakční směsi mezitím reagují s uvolňujícími se molekulami pyrofosfátu za vzniku $Mg_2P_2O_7$. Komplex calcein - Mg^{2+} již umožňuje, aby calcein vydával fluorescenční reakci. Světle zelené záření lze pak snadno detekovat. V případě vizualizace s pomocí calceinu se metoda LAMP stává o něco méně citlivou a rozlišovací schopnost je o něco nižší. Důvodem jsou inhibiční účinky calceinu na průběh amplifikace, které jsou přisuzovány jednak interakci mezi touto látkou a dvouvláknovou DNA, dále pak přítomností $MnCl_2$ (Zhang a kol., 2014).

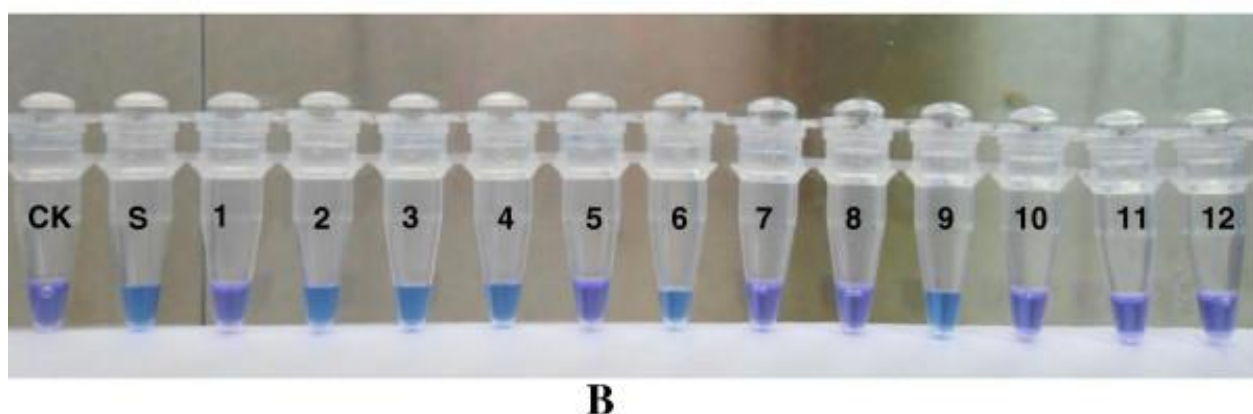
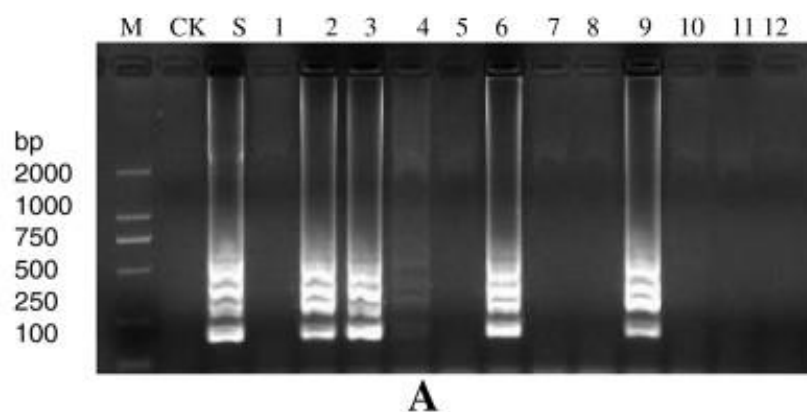


Obr. 32: Princip kolorimetrické reakce s využitím calceinu. Úbytek iontů manganu během amplifikace umožňuje hořčnatým iontům reagovat s calceinem za vzniku kolorimetrické reakce. (Zdroj: <http://www.nature.com/nprot/journal/v3/n5/images/nprot.2008.57-F2.jpg>)



Obr. 33: Vizualizace LAMP calceinem. Pozitivní vzorek vyzařuje jasnou zelenou fluorescenci. Vlevo je vzorek umístěn pod UV lampou. Na pravé části snímku se testované vzorky nacházejí na denním světle. (Zdroj: <http://www.nature.com/nprot/journal/v3/n5/i>)

Obdobný princip jako v případě calceinu platí i v případě barviva hydroxy-naftolové modři (HNB). Oproti calceinu je značení tímto indikátorem citlivější. Inhibiční efekt se u tohoto barviva nepředpokládá. Toto barvivo reaguje změnou barvy z fialové na modrou v závislosti na koncentraci přítomných Mg^{2+} iontů. S tím, jak reagují během LAMP hořečnaté ionty s pyrofosfátem za vzniku $Mg_2P_2O_7$, klesá jejich koncentrace v roztoku a spolu s tím se mění zabarvení reakční směsi (Zhang a kol., 2014).



Obr. 34: Vizualizace metody LAMP za pomoci elektroforetické separace (A) a hydroxy-naftolové modři (B). (Zdroj: https://www.scienceopen.com/document_file/636af6ac-1849-4fec-b3aa-df64717890e3/PubMedCentral/image/1471-2180-14-38-4)

2.3.4 Real-time LAMP

Metoda LAMP může být vyhodnocována v reálném čase (real-time LAMP). Pokud se přidá interkalační činidlo do reakční směsi již před amplifikací, je poté možné fluorescenční záření zaznamenávat již během amplifikace. Pokud se vzorek analyzuje na základě tvorby zákalu vznikajícího při amplifikaci, je možné stejně tak zaznamenávat a hodnotit v reálném čase i vzrůstající intenzitu zakalující se směsi analyzovaného vzorku (Zhang a kol., 2014). Intenzita zákalu dává v průběhu reakce

informaci o aktuální kvantitě produktu (Yamazaki a kol., 2013). K real-time měření zákalu lze využít např. přístroj LA-200 (LoopAMP real time turbidimeter) od japonské firmy Eiken Chemical (Jenkins a kol., 2011). Stejně, jako je real-time PCR metodou využívanou ke kvantifikaci nukleových kyselin, slouží i metoda real-time LAMP ke stejnému účelu (Rekha a kol., 2014; Longjam a kol., 2011). Při použití interkalačního činidla lze získat kvantitativní údaj o aktuální koncentraci DNA již po navázání tohoto barviva na strukturu DNA vstupující do reakce. Na základě vydávané fluorescence na počátku i v průběhu reakce lze velmi přesně stanovit momentální množství DNA v mikrozkušavce. Velmi efektivní se jeví interkalační činidlo SYBR green I s detekčním limitem 210 kopií /ml. Efektivní se jeví také ethidium bromid. Dále lze využít barviv SYTO-81, případně SYTO-82 (Zhang a kol., 2014). K realizaci real-time LAMP je zapotřebí přístroj, který zajistí izotermické prostředí celé reakce, a zároveň dokáže snímat a zaznamenávat fluorescenční záření. K tomuto účelu lze použít přístroj pro real-time PCR (Lucchi a kol., 2010; Kubota a kol., 2011; Nagamine a kol., 2002).

V porovnání s vysoce citlivou metodou real-time PCR dosahuje metoda real-time LAMP ještě vyšší citlivosti. V případě real-time detekce není zapotřebí využívat elektroforézy a výhodou je také jednodušší příprava vzorku. Během real-time LAMP se vytváří velké množství produktu a oproti real-time PCR je real-time LAMP rychlejší a méně nákladnou metodou (Yamazaki a kol., 2013).

2.3.5 Multiplex LAMP (mLAMP)

Pomocí modifikace loop-mediated isothermal amplification - multiplex LAMP (mLAMP) lze detekovat i více patogenních organismů najednou v rámci jedné reakce. V případě multiplex LAMP se jako indikátoru amplifikace využívá fluoroforů, které vyvolávají fluorescenční signál (Aonuma a kol., 2010; Kubota, Jenkins, 2015). Aby fluorofory vydávaly fluorescenční signál teprve v případě probíhající amplifikace, musí být jejich fluorescenční aktivita do té doby blokována. K tomu se využívá tzv. zhášeců. Nachází-li se zhášec v těsné blízkosti fluoroforu, dochází k inhibici fluorescenčního záření. Tyto zhášecy jsou umístěny na konci té části primeru, která po navázání primeru ke své cílové sekvenci přečnává a nehybridizuje. S touto částí primeru je totiž hybridizován krátký DNA úsek, na jehož konci je navázán fluorofor tak, aby sousedil se zhášecem umístěným na vlákně

primeru. Během amplifikace dojde k vytěsnění tohoto krátkého vlákna i s fluoroforem, jehož fluorescence není dále blokována přítomností zhášeče. Mohou být takto značeny vnitřní primery nebo loop primery přidané k urychlení reakce. Princip tohoto značení bude popsán na molekule předního vnitřního primeru (FIP). Přední vnitřní primer ve směru 5'-3' sestává z rozpoznávací sekvence F1c a F2. Sekvencí F2 hybridizuje primer s DNA patogena, úsek F1c však nemůže v tuto chvíli hybridizovat, neboť nemá v tuto chvíli komplementární protějšek. Tohoto úseku se využívá k navázání fluoroforu. S přečnivajícím úsekem primeru je totiž hybridizována krátká molekula DNA a na jejím 3' konci se nachází fluorofor. Na 5' konci primeru (přečnivající úsek F1c) je pak umístěn zhášeč. Dojde-li k amplifikaci, je krátká sekvence s fluoroforem amplifikací vytěsněna. Fluorofor tak již není dále inhibován a začne vydávat fluorescenční signál (Tanner a kol., 2012; Kubota a kol., 2011). Pro každý detekovaný organismus je třeba použít jiný fluorofor. Test se vyhodnocuje jako real-time LAMP, a tedy je celá reakce monitorována od začátku do konce v reálném čase. Přístroj musí být schopný detekovat odlišné fluorescenční signály vydávané jednotlivými typy fluoroforů, díky tomu lze pak od sebe rozlišit jednotlivé organismy (Tanner a kol., 2012; Kubota, Jenkins, 2015).

2.3.6 Detekce v polních podmínkách

Zajištění izotermálních podmínek pro průběh celé reakce je velmi efektivní. Umožňuje to provádět tuto reakci přímo v terénu. V zemích, kde není k detekci dostupná elektřina je tak možno využít i jiných zdrojů k vytvoření izotermického prostředí například chemickou cestou (Mori a kol., 2001). K polní detekci metodou LAMP lze využít přístroje Smart-DART™. Toto zařízení dokáže vyvinout potřebnou teplotu a udržet ji po celou dobu reakce. Umožňuje detekovat celkem až 8 vzorků najednou. V praxi to může znamenat detekci 6 vzorků a dále jednoho vzorku jako negativní a jednoho jako pozitivní kontroly. Přístroj umožňuje v první fázi extrakci DNA. Testovaný vzorek se umístí do mikrozkuhavky pro extrakci určených spolu s potřebnými činidly a poté následuje ohřátí vzorku. Doba extrakce může trvat zhruba 10 minut při teplotě 85 °C. Následně se připraví master mix – reakční směs pro amplifikaci. Za pomoci miniaturní centrifugy se vzorek odstředí. Centrifugace trvá pár sekund. Část získané vyizolované DNA (supernatant) je z extrakčních mikrozkuhovek aplikována spolu s dalšími komponenty pro LAMP do reakční

zkumavky a následuje ohřátí vzorku na amplifikační teplotu. Přidáním loop primerů je tak možné již za 20 minut od počátku amplifikace znát výsledek reakce (Keramane a kol., 2015). Jednou z dalších výhod přístroje Smart-DART™ je real – time vizualizace. Tedy i v polních podmínkách lze patogena nejen detekovat, ale také znát přesnou koncentraci amplifikované DNA. Smart-DART™ je ovládán přes zařízení bluetooth speciální aplikací fungující na platformě Android. Získaná data se odesílají přes bluetooth do mobilního zařízení a naměřené hodnoty jsou zaznamenávány do grafu (Keramane a kol., 2015; Yaseen a kol., 2015).



Obr. 35: Přístroj Smart-DART™ určený k polní amplifikaci DNA. Přístroj je ovládán přes bluetooth zařízení pomocí speciální aplikace ve smartphonu nebo tabletu. (Zdroj: <http://static1.squarespace.com/static/537ab7efe4b0d683376a1025/t/53a00af3e4b05bbc2dc5f93a/1400808271435/SmartDartPromo08202013.jpg?format=300w>)



Obr. 36: Přístroj Smart-DART™ umožňuje detekovat najednou až 8 vzorků. (Zdroj: https://images.indiegogo.com/file_attachments/841730/files/20140908013516-Smart-DART_3.0_Platform_Smaller_Promo.png?1410165316)

3. Závěr

Metoda loop-mediated isothermal amplification již byla využita k detekci mnoha infekčních organismů (Mori a kol. 2013). V současné době je stále nejvyužívanější amplifikační technikou polymerázová řetězová reakce (PCR). Oproti konvenční PCR má LAMP vyšší rozpoznávací schopnost. Zároveň díky DNA polymeráze pracující za izotermických podmínek je LAMP oproti PCR podstatně rychlejší (Kamachi a kol., 2006). LAMP je metoda vysoce senzitivní a specifická. Mezi další přednost LAMP patří nízká ekonomická náročnost (Zhou a kol., 2011). Bylo vyvinuto již několik prací popisujících detekci *Erwinia amylovora* metodou LAMP (Bühlmann a kol., 2013; Gosch a kol., 2012). LAMP se ukázala být při detekci *Erwinia amylovora* velice spolehlivá a rychlá (Bühlmann a kol., 2013). Detekční limit je srovnatelný s metodou nested PCR (Temple a kol., 2008; Aydin-Schmidt, 2014). Obvyklá reakce LAMP trvá zhruba 60 minut. Přidáním loop primerů lze reakční čas zkrátit o polovinu až o dvě třetiny standardní reakční doby (Nagamine a kol., 2002; Notomi a kol., 2015). Díky uvolňujícímu se pyrofosfátu během syntézy nových DNA vláken lze na základě zákalu uvnitř mikrozkušavky stanovit, zda došlo k amplifikaci. Intenzita vznikajícího zákalu je totiž přímo úměrná vzniku nových DNA řetězců (Mori a kol., 2001). Zároveň je možné zakomponovat do reakční směsi indikační barviva. V případě pozitivní reakce dochází ke kolorimetrické reakci, která se projeví změnou zbarvení, nebo vydávanou fluorescencí. Snadná je i vizualizace s pomocí běžných interkalačních činidel, kterými jsou např. ethidium bromid, nebo SYBR green. Tyto barviva vydávají fluorescenční záření, naváží-li se na dvouvláknovou DNA. Díky rychlosti i jednoduchosti loop-mediated isothermal amplification je tato metoda perspektivní nejen k detekci v laboratoři, ale i přímo v polních podmínkách (Keramane a kol., 2015). Rychlá diagnóza, kterou metoda LAMP umožňuje, může být významným nástrojem včasného odhalování patogena v místech napadení. Pomocí metody LAMP je tak možné lépe mapovat výskyt, předvídat rozvoj spály růžovitých rostlin a její další šíření (Temple a kol., 2008). Detekce pomocí multiplex LAMP nabízí možnost identifikovat více než jednoho patogena v průběhu jedné reakce. Není prozatím publikováno příliš prací, které by se detekcí fytopatogenních bakterií s pomocí multiplex LAMP zabývali. Bylo by dobré vzhledem k výše popsaným výhodám LAMP tuto modifikaci vyzkoušet v praxi.

Například aplikovat multiplex LAMP k detekci *Erwinia amylovora* a některé další bakterie (např. *Pantoea agglomerans*).

4. Použitá literatura

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Walter, P. (2002) *Molecular biology of the cell*. New York : Garland science. 1616 s. ISBN: 0-8153-3218-1

Aonuma, H., A. Yoshimura, T. Kobayashi, K. Okado, Badolo, A. (2010) A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes. *Experimental Parasitology*. 125, 2, s. 179-183.

Aydin-Schmidt, B., Xu, W., Gonzáles, I., J., Polley, S., D., Bell, D., Shakely, D., Msellem, M., I., Björkman, Mårtensson, A. (2014) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *Public library of science one*. 9, 8, s. 1-9.

Barbu, V. (2007) Molecular hybridization techniques of nucleic acids. *Innovate Romanian food biotechnology*. 1, s. 1-12.

Barnes, W., M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from Λ bacteriophage templates. *Genetics*. 91, 6, s. 2216-2220.

Beveridge, T., J. (1990) Mechanism of gram variability in select bacteria. *Journal of bacteriology*. 172, 3, s. 1609-1620.

Bogs, J., Bruchmüller, I., Erbar, C., Geider, K. (1998) Colonization of host plants by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* marked with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathology*. 88, 5, s. 416-421.

Bühlmann A., Pothier, J., F., Rezzonico, F., Smits T., H., Andreou, M., Boonham, N., Duffy, B., Frey, J., E. (2013) *Erwinia amylovora* loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. *Journal of microbiological methods*. 92, 3, s. 332-339.

Cheng, S., Foreckler, C., Barnes, W., M., Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Genetics*. 91, 12, s. 5695-5699.

Crowther, J., R. (1995) *ELISA: Theory and practice, methods in molecular biology*. Totowa : Humana press. 42 s. ISBN 978-0-89603-279-8

Dennison, C. (2003) *A guide to protein isolation*. Pietermaritzburg : Kluwer academic publishers. 249 s. ISBN 978-90-481-6266-6

- Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A., Thomas, P.** (2014) Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): A new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: A review. *Pakistan journal of biological sciences*. 17, 2, s. 151-166.
- Elgert, K., D.** (2009) *Immunology: Understanding the immune system*. Blacksburg : Wiley-Blackwell. 726 s. ISBN 978-0-470-08157-0
- Gojová, L., Kozák, L.** (2006) Možnosti využití DNA čipů v molekulární diagnostice dědičných onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus*. 14, 35, s. 89-95.
- Gosch, Ch., Gottsberger, R., A., Stich, K., Fischer, T., Ch.** (2012) Blue EaLAMP- a specific and sensitive method for visual detection of genomic *Erwinia amylovora* DNA. *European journal of plant pathology*. 134, s. 835–845.
- OEPP/EPPO** (2013) PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*. 43, 1,s. 21-45.
- Edberg, S., B.** (1985) Principles of nucleic acid hybridization and comparison with monoclonal antibody technology for the diagnosis of infectious diseases. *The yale journal of biology and medicine*. 58, 425-442.
- Evans, K., Frank, E., Beddes, T., Pace, M., Shao, M., Moulton, A.** (2008) Fire blight. *Utah state university*. 27, s. 1-5.
- EFSA Panel on plant health** (2014) Scientific opinion on the pest categorisation of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winsl. et al. *European food safety authority journal*. 12, 12, s 1-37.
- Yaich, M., Fatmi, M., Bougsiba, M., Valentini, F., Scuderi, G., D'ongia A., M., Cirvilleri G.** (2011) Fire blight (*Erwinia amylovora* [Burrill] Winslow) in morocco: importance, geographical distribution and characterization. *Phytopathologia Mediterranea*. 50, s. 212-227.
- Gross, D., C., Lichens-Park, A., Kole, Ch.,** (2014) *Genomics of the plant-associated bacteria*. Berlin : Springer-verlag. 201 s. ISBN 978-3-642-55378-3
- Ismail, E., Blom, J., Bultreys, A., Ivanović, M., Obradović, A., Doorn, J., Bergsma-Vlami, M., V., Maes, M., Williams, A., Duffy, B., Stockwell, V., O., Smits, T., H., M., Pullawska, J.** (2014) A novel plasmid pEA68 of *Erwinia amylovora* and the description of a new family of plasmids. *Archives of microbiology*. 19, s. 891-899.

- Janitz, M.** (2011) *Next-generation genome sequencing: towards personalized medicine*. Berlin : Wiley-Blackwell. 282 s. ISBN 978-3-527-32090-5
- Kalužna M., Pulawska, J., Mikiciński A.** (2013) Evaluation of methods for *Erwinia amylovora* detection. *Journal of horticultural research*. 21, 2, s. 65-71.
- Kamachi, K., Toyozumi-Ajisaka, H., Toda, K., Soeung, S. C., Sarath, S., Nareth, Y., Horiuchi, Y., Kojima, K., Takahashi, M., Arakawa, Y.** (2006) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *Journal of clinical microbiology*. 44, 5, s. 1899-1902.
- Karcher, S., J.** (1995) *Molecular biology: A project approach*. San Diego : Academic press. 280 s. ISBN 9780123977205
- Keremane, M., L., Ramadugu, Ch., Rodrigez, E., Kubota, R., Shibata, S., Hall, D., G., Roose, M., L., Jenkins, D., Lee, R., L.** (2014) A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated *Candidatus Liberibacter asiaticus* from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop protection*. 68, s. 41-48.
- Kim, H., J., Kim, Y., J., Yong, D., E., Lee, K., Park, J., H., Lee, J., M., Yoon, S., S.** (2014) Loop-mediated isothermal amplification of vanA gene enables a rapid and naked-eye detection of vancomycin-resistant enterococci infection. *Journal of microbiological methods*. 104, s. 61–66.
- Kokošková, B., Marhulová, Š., Zouhar, M.** (2009) *Testy patogenity pro spálu růžovitých rostlin technikou explantátových kultur: certifikovaná metodika pro praxi*. Praha : Výzkumný ústav rostlinné výroby. 30 s. ISBN 978-80-7427-016-1
- Kokošková, B., Mráz, I.** (2008) *Diagnostický protokol pro Erwinia amylovora, původce spály růžovitých rostlin: metodika pro praxi*. Praha : Výzkumný ústav rostlinné výroby. 26 s. ISBN 978-80-87011-93-5
- Kubota, R., Alvarez, A., M., Su, W., W., Jenkins, D., M.** (2011) FRET-based assimilating probe for sequence-specific real-time monitoring of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biological engineering transactions*. 4, 2, s. 81-100.
- Kubota, R., Jenkins, D., M.** (2015) Real-time duplex applications of loop-mediated amplification (LAMP) by assimilating probes. *International journal of molecular sciences*. 16, s. 4786-4799.

- Kůdela, V.** (1990) *Spála růžovitých rostlin*. Praha : Ministerstvo zemědělství a výživy. 163 s. ISBN 80-7084-018-8
- Kůdela, V., Bartoš, P., Čača, Z., Dirlbek, J., Frič, F., Lebeda, A., Šebesta, J., Ulrychová, M., Valášková, Veselý, D.** (1989) *Obecná fytopatologie*. Praha : Academia Praha. 388 s. ISBN 80-200-0156-5
- Kůdela, V., Novacky, V., Fucikovsky L.** (2002) *Rostlinolékařská bakteriologie*. Praha : Academia Praha. 347 s. ISBN 80-200-0899-3
- Longjam, N., Deb, R., Sarmah, A., K., Tayo, T., Awachat, V., B., Saxena, V., K.** (2011) A brief review on diagnosis of foot-and-mouth disease of livestock: conventional to molecular tools. *Veterinary medicine international*. 1, s. 1-17.
- Lucchi, N., Demas, A., Narayanan, J., Sumari, D., Kabanywany, A., Kachur, S., P., Barnwell, J., W., Udhayakumar, V.** (2010) Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *Public library of science*. 5, 10, s. 1-7.
- Mason, P., G., Gillespie, D., R.** (2013) *Biological control programmes in Canada 2001 – 2012*. Wallingford : CABI. 608 s. ISBN 978-1-78064-257-4
- Morales, F., J.** (1989) *Bean common mosaic: screening for dinase resistance*. Cali : Centro internacional de agricultura tropical. 28 s. ISBN 958-9183-09-3
- Mori, Y., Kanda, H.** (2013) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of infection and chemotherapy*. 19, s. 404-411.
- Nagamine, K., Watanabe, K., Ohtsuka, K., Hase, T., Notomi, T.** (2001) Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clinical Chemistry*. 47, 9, s. 1742-1743.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T.** (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*. 16, s. 223-229.
- Nakao, R., Stromdahl, J., Magona, J., W., Faburay, B., Namangala, B., Malele, I., Inoue, N., Geysen, D., Kajino, K., Jongejan, F., Sugimoto, Ch.** (2010) Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*. *BMC microbiology*. 10, 296, s. 1-11.

- Njiru, Z., K., Mikosza, A., S., J., Armstrong, T., Enyaru, J., CH., Ndung'u, J., M., Thompson, A., R., CH.** (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Public library of science*. 2, 2, s. 1-8.
- Notomi, T., Okayama, H., Masabuchi, H., Toshihiro, Y., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T.** (2000) Loop-mediated isothermal amplification. *Nucleic acids research*. 28, 12, s. 1-7.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., Kanda, H.** (2015) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of microbiology*. 53, 1, s. 1-5.
- Peil, A., Bus, V., G., M., Geider, K., Richter, K., Flachowsky, H., Hanke, M.** (2009) Improvement of Fire Blight resistance in apple and pear. *International journal of plant breeding*. 3, 1, s. 1-27.
- Rekha, V., Rana, R., Arun, T., R., Aswathi, P., B., John, J., K., Gopinath, D., Sadanandan, G., V., Jacob, A.** (2014) Loop mediated isothermal amplification (LAMP) test – a novel nucleic acid based assay for disease diagnosis. *Advances in animal and veterinary sciences*. 2, 6, s. 344-350.
- Rosypal, S., Hod'ák, K., Martinec, T., Kocur, M.** (1981) *Obecná bakteriologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 750 s.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A., R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*. 74, 12, s. 5463-5467.
- Serwer, P.** (1983) Agarose gels: Properties and use of electrophoresis. *Electrophoresis*. 4, 6, s. 375-382.
- Smits, T., H., M., Rezzonico, F., Kamber, T., Blom, J., Goesmann, A., Frey, E., J., Duffy, B.** (2010) Complete genome sequence of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* CFBP 1430 and comparison to other *Erwinia* spp. *Molecular plant-microbe interactions*. 23, 4, s. 384-93.
- Storch, W., B.** (2000) *Immunofluorescence in clinical immunology: A primer and atlas*. Berlin : Birkhauser Basel. 231 s. ISBN 3764361824
- Šmarda, J., Doškář, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.** (2005) *Metody molekulární biologie*. Brno : Masarykova univerzita. 192 s. ISBN 80-210-3841-1

- Tanner, N., A., Zhang, Y., Evans, T., C.** (2012) Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *BioTechniques*. 53, s. 81-89.
- Temple, T. N., Stockwell, V., O., Johnson, K., B.** (2008) Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta horticulturae*. 793, s. 497-503.
- Toman, M., Bárta, O., Dostál, J., Faldyna, M., Holáň, V., Hořín, P., Hruban, V., Jeklová, E., Knotek, Z., Kopecký, J., Koudela, B., Krejčí, J., Nechvátalová, K., Ondráčková, P., Plachý, J., Pospíšil, R., Rybníkář, A., Ryšánek, D., Smola, J., Šíma, P., Tlaskalová, H., Toman, M., Trebichavský, I., Veselský, L.** (2009) *Veterinární imunologie*. Praha : Grada publishing. 392 s. ISBN 978-80-247-2464-5
- Tripathi, G.** (2010) *Cellular and biochemical science*. New Delhi : I. K. International publishing house. 1392 s. ISBN 978-81-88237-85-X
- Vanneste, J., L.** (2000) *The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. CABI publishing. 370 s. ISBN 0851992943
- Wensing, A., Gernold, M., Geider, K.** (2011) Detection of *Erwinia* specific from the apple and pear flora by mass spectroscopy of whole cells and with novel PCR primers. *Journal of applied microbiology*. 112, 1, s. 147–158.
- Wild, D.** (2012) *The immunoassay handbook: Theory and application of ligand binding, ELISA and related techniques*. Amsterdam : Elsevier. 1036 s. ISBN 978-0-08-097037-0
- Yamazaki, W., Mioulet, V., Murray, L., Madi, M., Haga, T., Misawa, N., Horii, Y., King, D. P.** (2013) Development and evaluation of multiplex RT-LAMP assays for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. *Journal of virological methods*. 192, s. 18-24.
- Yaseen, T., Drago, S., Valentini, F., Elbeaino, T., Stampone, G., Digiaro, M., D'onghia, A., M.** (2015) On-site detection of *Xylella fastidiosa* in host plants and in “spy insects” using the real-time loop-mediated isothermal amplification method. *Phytopathologia mediterranea*. 54, 3, s. 488–496.
- Zhang, G., Brown, E., W., González-Escalona, N.** (2011) Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *salmonella* spp. in produce. *Applied and environmental microbiology*. 77, 18, s. 6495-6501.

Zhang, X., Lowe, S., B., Gooding, J., J. (2014) Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and bioelectronics*. 61, s. 491-499.

Zhou, S., Han, S., Shi, J., Wu, J., Yuan, X., Cong, X., Xu, S., Wu, X., Jun, L., Wang J. (2011) Loop-mediated isothermal amplification for detection of porcine circovirus type 2. *Virology journal*. 8, 497, s. 1-5.

Ziros, P., G., Kokkinos, P., Papanotas, K., Vantarakis, A. (2012) Loop-mediated isothermal amplification from different food types. *Journal of microbiology*. 2, 1, s. 152-161.

5. Přílohy

5.1 Seznam obrázků

Obr. 1: Příznaky vyvolané bakterií <i>Erwinia amylovora</i> .	15
Obr. 2: Příznaky vyvolané bakterií <i>Erwinia amylovora</i> .	16
Obr. 3: Nedávno založený jabloňový sad infikovaný <i>Erwinia amylovora</i> .	18
Obr. 4: Kolonie <i>Erwinia amylovora</i> na živném médiu.	19
Obr. 5: Hrušky po inokulaci bakterií <i>Erwinia amylovora</i> .	22
Obr. 6: Test virulence na nezrálých hruškách.	23
Obr. 7: Aglutinační test.	24
Obr. 8: Ouchterlonyho metoda.	25
Obr. 9: Radiální imunodifuze v agaru.	26
Obr. 10: Vyhodnocení raketové elektroforézy.	27
Obr. 11: ELISA destička po ukončení ELISA testu.	29
Obr. 12: Průběh polymerázové řetězové reakce	32
Obr. 13: Separace deoxyribonukleotidových kyselin podle molekulové hmotnosti.	33
Obr. 14: Metoda hybridizace Southernovou metodou.	36
Obr. 15: Sekvenování Sangerovou metodou.	37
Obr. 16: Popis a rozmístění klíčových úseků pro LAMP na DNA vláknech včetně popisu jednotlivých primerů.	40
Obr. 17: Průběh metody LAMP.	41
Obr. 18: Průběh metody LAMP.	41
Obr. 19: Průběh metody LAMP.	41
Obr. 20: Průběh metody LAMP.	41
Obr. 21: Průběh metody LAMP.	42
Obr. 22: Průběh metody LAMP	42
Obr. 23: Průběh metody LAMP.	42
Obr. 24: Průběh metody LAMP.	42
Obr. 25: Průběh metody LAMP.	45
Obr. 26: Elektroforetické vyhodnocení amplifikace metodou PCR (vlevo) a metodou LAMP (vpravo)	45
Obr. 27: Průběh metody LAMP	46
Obr. 28: Amplifikace LAMP s využitím loop primerů	47
Obr. 29: Reakce LAMP s využitím urychlující sady primerů.	48
Obr. 30: Vyhodnocení reakce LAMP podle zákalu.	50

Obr. 31: Detekce LAMP s pomocí interkalačního barviva SYBR green.	51
Obr. 32: Princip kolorimetrické reakce s využitím calceinu.	52
Obr. 33: Vizualizace LAMP calceinem.	52
Obr. 34: Vizualizace metody LAMP za pomoci elektroforetické separace (A) a hydroxy-naftolové modři (B).	53
Obr. 35: Přístroj Smart-DART™ určený k polní amplifikaci DNA.	56
Obr. 36: Přístroj Smart-DART™ určený k polní amplifikaci DNA.	56

5.2 Seznam zkratk

LAMP – Loop-mediated isothermal amplification

PCR- Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)

Taq polymeráza – Termostabilní DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*

Bst polymeráza – DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus stearothermophilus*

Bsm polymeráza – DNA polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus Smithii*

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

bp – Base pair(s) (nukleotidový pár / páry)

kbp – Kilo base pairs (1 000 nukleotidových párů)

Mbp – Mega base pairs (1 000 000 nukleotidových párů)

FIP – Forward inner primer (Přední vnitřní primer)

BIP – Backward inner primer (Zadní vnitřní primer)

F3 – Forward outer primer (Přední vnější primer)

B3 – Backward outer primer (Zadní vnější primer)

Loop F – Loop forward

Loop B – Loop backward

RT LAMP – Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

Rt-LAMP – Real-time loop-mediated isothermal amplification

mLAMP – Multiplex loop-mediated isothermal amplification