

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

---

Katedra speciální produkce rostlinné

Studijní program: N4101 – Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

### **Návrh a testování multiplex-PCR primerů pro detekci původců bakteriální skvrnitosti rajčete**

Bc. DAGMAR STEHLÍKOVÁ

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Pavel Beran, Ph.D.

Konzultant:

Doc. Ing. Ivan Mráz, CSc.

---

České Budějovice

2015

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (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.

V Českých Budějovicích dne 20. 3. 2015

.....

Bc. Dagmar Stehlíková

## **Poděkování**

Především bych chtěla poděkovat Ing. Pavlu Beranovi, Ph.D., vedoucímu diplomové práce, za odborné vedení, které mi poskytl při vypracování práce.

Dále bych ráda poděkovala Doc. Ing. Ivanu Mrázovi, CSc. za cenné rady a připomínky.

Nemalý dík patří Ing. Evě Jozové za pomoc v laboratoři v období nepřítomnosti vedoucího práce.

## **Abstrakt**

Předmětem této práce je vývoj metody multiplex-PCR pro specifickou detekci komplexu fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas*, způsobujících bakteriální skvrnitost rajčete. V rámci této práce byly vyvinuty PCR primery pro detekci skupin A (*X. euvesicatoria*), B (*X. vesicatoria*), C (*X. perforans*) a D (*X. gardneri*). Na základě sekvencí DNA získaných sekvenováním a z databáze GenBank (NCBI) byly navrženy 4 páry primerů - Xe\_shotgun\_104, Xe\_shotgun\_1819, Xv\_atpD\_403 a Xp\_efP\_202, které následně byly důkladně testovány a optimalizovány pro paralelní detekci uvedených bakterií. Specifita primerů byla testována na rozsáhlém souboru bakteriálních kmenů patogenních pro rajče a příbuzné plodiny. Dodržením popsaného protokolu lze rychle a spolehlivě identifikovat bakterie *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* a *X. gardneri* v jediné reakci multiplex-PCR.

### **Klíčová slova:**

*Xanthomonas euvesicatoria*, *vesicatoria*, *gardneri*, *perforans*, primery

## **Abstract**

The subject of this work is to develop multiplex-PCR assay for specific detection of plant pathogenic bacteria of *Xanthomonas* genus causing bacterial spot of tomato. PCR primers for detection of groups A (*X. euvesicatoria*), B (*X. vesicatoria*), C (*X. perforans*) and D (*X. gardneri*) were developed based on the DNA sequences obtained by sequencing and from the GenBank database (NCBI). Four primer pairs - Xe\_shotgun\_104, Xe\_shotgun\_1819, Xv\_atpD\_403, Xp\_efP\_202 were designed and subsequently thoroughly tested and optimized for parallel detection of these bacteria. Specificity of the primers was tested on a large complex of bacterial strains pathogenic to tomato and related crops. Following the protocol described above *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. gardneri* can be quickly and reliably identified in a single multiplex-PCR assay.

### **Key words:**

*Xanthomonas euvesicatoria*, *vesicatoria*, *gardneri*, *perforans*, primers

## Obsah

Abstract.....	4
1 Úvod.....	7
2 Literární přehled.....	8
2.1 Bakterie rodu <i>Xanthomonas</i> patogenní pro rajče a papriku.....	8
2.1.1 Hostitelé.....	8
2.1.2 Rozšíření.....	8
2.1.3 Morfologie.....	9
2.1.4 Symptomy.....	9
2.1.5 Biologie.....	10
2.1.6 Klasifikace.....	10
2.1.7 Ochrana.....	11
2.1.8 Molekulární charakteristika.....	12
2.2 Použité metody.....	13
2.2.1 PCR.....	13
2.2.2 Multiplex-PCR.....	14
2.2.3 Elektroforéza.....	15
2.3 Návrh primerů.....	15
3 Cíl práce.....	17
4 Materiál a metody.....	18
4.1 Bakteriální kmeny a kultivační podmínky.....	18
4.2 Izolace bakteriální DNA.....	18
4.3 Návrh primerů.....	18
4.4 Testování primerů.....	19
4.4.1 PCR s jednotlivými primery.....	19
4.4.2 Multiplex-PCR.....	19
4.5 Elektroforéza.....	19
5 Výsledky a diskuse.....	21
6 Závěr.....	23
7 Seznam použité literatury.....	24
8 Tabulky.....	30

## Seznam zkratek použitých v diplomové práci

ATP – Adenosintrifosfát, *adenosine triphosphate*

CDS – kódující sekvence, *coding sequence*

DNA - deoxyribonukleová kyselina, *deoxyribonucleic acid*

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina, *ethylenediaminetetraacetic acid*

IS – vložená sekvence, *insertion sequence*

kb – kilobáze [1kb = 1000 nukleotidů (bází)], *base*

PCR – polymerázová řetězová reakce, *polymerase chain reaction*

RNA - ribonukleová kyselina, *ribonucleic acid*

rRNA – ribozomální RNA, *ribosomal ribonucleic acid*

ST – sekvenční typ, *sequence type*

TBE – tris borate EDTA

T<sub>m</sub> – teplota, kdy se váže primer na templát, *melting temperature*,

tRNA – transferová RNA, *transfer ribonucleic acid*

## 1 Úvod

Bakterie rodu *Xanthomonas* jsou významným karanténním bakteriálním patogenem rajčete a papriky. Rozdělují se do 4 skupin: skupina A - *Xanthomonas euvesicatoria*, která obsahuje většinu kmenů dříve známých jako *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* nebo *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria*, skupina B - *X. vesicatoria*, skupina C - *Xanthomonas perforans*) a skupina D - *Xanthomonas gardneri* (ex Sutic, 1957), (Jones a kol., 2006). U těchto skupin je důležitá jejich rychlá, spolehlivá a specifická detekce. K tomu slouží imunochemické nebo molekulárně-biologické metody. Nejpoužívanější molekulárně-biologickou metodou je PCR (Polymerase chain reaction) a její variace. Jednou z nich je metoda multiplex-PCR, která umožňuje amplifikaci více než jedné cílové oblasti v jedné PCR reakční směsi za použití více párů primerů.

Hlavním cílem této práce je vývoj multiplex-PCR metody pro specifickou detekci komplexu fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas* patogenní pro rajče. Navržením specifických primerů a optimalizací podmínek bude možná identifikace v jediné reakci PCR.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Bakterie rodu *Xanthomonas* patogenní pro rajče a papriku

#### 2.1.1 Hostitelé

Mezi nejvýznamnější hostitele bakterie *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge 1920) Vauterin et al. 1995 a *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al. 2006 patří paprika (*Capsicum* spp.) a rajče (*Lycopersicum* spp.), ale může napadat i další rostliny. Jsou to například: mochně (*Physalis* spp.), durman (*Datura* spp.), kustovnice (*Lycium* spp.), blín (*Hyoscyamus* spp.), tabák selský (*Nicotiana rustica*) a rostliny rodu *Solanum* – především nekulturní plodiny. Významnost napadení u těchto rostlin není tak důležitá, jako u rajčete a papriky (Hayward a Waterston, 1964).

#### 2.1.2 Rozšíření

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

Severní Amerika: Bermudy, Mexiko, Kanada a USA

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

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

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



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

Afrika: Egypt, Etiopie, JAR, Keňa, Malawi, Maroko, Mozambik, Niger, Nigérie, Réunion, Senegal, Seychely, Súdán, Togo, Tunisko, Zambie a Zimbabwe. (OEPP/EPPO, 1988)

### **2.1.3 Morfologie**

Buňka jsou tyčinkovité s jedním polárním bičíkem, mají oblé zakončení a vyskytují se jednotlivě nebo v páru. Jejich přibližná velikost je  $0,6 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$ . Xanthomonády produkují kyseliny ze sacharidů, neredukují dusičnany a jsou katalyticky pozitivní (Jackson, 2009).

Xanthomonády jsou nesporulující, obligátně aerobní, gramnegativní bakterie. Na masopeptanovém agaru s glukosou vytváří žluté mukoidní hladké kolonie. Zbarvení je způsobeno žlutými pigmenty zvanými xanthomonadiny a exopolysacharidem xanthanem. Netvoří poly- $\beta$ -hydroxybutyrátové inkluze (Kúdela a kol., 2002).

Na jiných médiích např: CKTM (Sijam a kol., 1992), mTMB (adapted McGuire a kol., 1986) a YGCA se kolonie liší v jasu žlutého zbarvení a v rozmezí mezi 3-7 dny se kolem kolonií objevuje tzv. halo (Scortichini a kol., 2013)

### **2.1.4 Symptomy**

Příznakem onemocnění rostlin rajčat a paprik jsou vodnaté léze, skvrny, chlorózy a nekrózy, které jsou viditelné hlavně na listech, stoncích a plodech. Mnoho znaků onemocnění jsou podobné u obou plodin.

Vzhledem k tomu, že nejvíce zjevné příznaky se vyskytují na listech, nemoc je často označována jako "bakteriální skvrnitost." Symptomy začínají jako malé, žluté, až zelené léze na mladých listech, které se zdají většinou deformované a zkroucené (Obr). U starších listů se objevují tmavé, vodou nasáklé léze. Ty se rozvíjejí do velikosti 0,25-0,5 cm a postupně hnědnou. Příznaky na listech jsou podobné houbovým onemocněním nebo příznakům porušení pesticidy nebo jinými chemickými prostředky. Od houbového onemocnění se liší matným vzhledem. Léze se častěji vyskytují ve vlhkých částech listu (špička) a následně se i zvětšují. Za sucha listy nekrotizují, vysychají a následně se rozpadají.

U plodů onemocnění začíná světle zelenými, vodou nasáklými lézemi, které nakonec hnědnou a jejich velikost je do 0,5 cm (Swings a Civerolo, 1993).

### 2.1.5 Biologie

Xanthomonády jsou fytopatogeny a nacházejí se pouze ve spojení s rostlinami nebo rostlinným materiálem (Kůdela a kol., 2002)

Patogen vstupuje do rostlinné tkáně prostřednictvím průduchů a hydatod nebo oděrkami způsobenými větrem, hmyzími vpichy nebo mechanickými prostředky (Jones, 1991).

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

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

### 2.1.6 Klasifikace

Klasifikace a nomenklatura rodu *Xanthomonas* prošla výraznými změnami. Před zavedením současné klasifikace Vauterin a kol. (1995) identifikovali tři odlišné skupiny A, B a C, které byly klasifikovány jako rasy *X. campestris* pv. *vesicatoria* na základě fenotypových a genotypových testů.

V současné době se xanthomonády patogenní pro rajče a papriku řadí do čtyř skupin. Tyto skupiny byly rozlišeny na základě amylolytických a pektolytických aktivit v pulzní gelové elektroforéze, kde *X. euvesicatoria* a *X. gardeneri* vykazovali negativní aktivitu a *X. vesicatoria*, a *X. perforans* byli pozitivní. Podrobnější molekulárně biologické techniky umožnily klasifikaci samostatných skupin A (*X. euvesicatoria*), B (*X. vesicatoria*), C (*X. perforans*) a D (*X. gardeneri*) (Jones a kol., 2004). *X.*

*euvesicatoria* obsahuje většinu ras *X. campestris* pv. *vesicatoria* (skupina A). Původně Jones a kol. (2000) uváděli, že *X. vesicatoria* (skupina B) tvořily samostatnou skupinu a kmeny ze skupiny C byly považovány za poddruh *X. campestris* pv. *vesicatoria* (skupina A). Skupina D byla dříve nazvána *Pseudomonas gardneri* (Sutic, 1957). Dye (1966) však prokázal její shodnost s rodem *Xanthomonas*.

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

Young a kol. (2008) navrhli na základě podobnosti nad 99% u MLST sloučit *X. euvesicatoria*, *X. perforans* v jednu skupinu. Poddruhy *X. fuscans*, *X. citri* a *X. axonopodis* potvrzují shodu na 98,34% a měly by být přiřazeny ke stejnému druhu jako *X. perforans* a *X. euvesicatoria*. Tato jednotná skupina by měla být pojmenována *X. axonopodis*. *X. gardneri* a *X. cynarae* jsou tatáž skupina. (Young a kol., 2008).

### **2.1.7 Ochrana**

Xanthomonády způsobující bakteriální skvrnitost mají nepříznivý vliv na produkci rajčat a paprik. Onemocnění se rozšiřuje rychle a jeho kontrola je složitá. Vůči streptomycinu si rychle vytváří rezistanci (Stall a Thayer, 1962). Doporučuje se používat certifikované osivo. Na trhu jsou dostupné i rezistentní odrůdy. Rostliny jsou běžně ošetřovány přípravky s obsahem mědi (Dougherty, 1979). Závažnost choroby je redukována použitím bakteriálních fágů (bakteriofágů), a to hlavně ve sklenicích. Použití bakteriofágů je účinnější než měďnaté přípravky. Studie potvrzují snížení onemocnění s použitím bakteriofágů o 17% a u přípravků na bázi mědi o 11% (Flaherty, 2000). Nevýhodou bakteriofágů je, že jejich účinnost je eliminována deštěm a slunečním zářením. Aplikace se musí provádět brzy ráno před svítáním (Balogh a kol., 2003)

*Xanthomonas vesicatoria* a *Xanthomonas euvesicatoria* jsou podle legislativy ČR i EU řazeny ke karanténním organismům (EPPO/CABI, 1997).

### 2.1.8 Molekulární charakteristika

Genom tvoří jeden kruhový chromozom o velikosti 5 178 466 bp a čtyři extrachromozomální plazmidy. Původně byly známy plazmidy - pXCV2 (1852 bp), pXCV38 (38116 bp) a pXCV183 (182572 bp). Později byl objeven plazmid pXCV19 (19146 bp).

U chromozomální DNA je vysoký obsah G+C bazí. Pohybuje se v rozmezí 63,7 – 65 %. U plazmidů je obsah G+C mezi 56,59 – 60,79 %. Xanthomonády patogenní pro rajčata a papriky obsahují celkem 4726 kódujících sekvencí (CDS). Kódovací kapacita je 87,13 %, což je typické pro většinu bakterií. Na základě anotace byla biologická role přidělena 3080 CDS, 697 CDS je hypotetických a 949 CDS má neznámou funkci. Xanthomonády způsobující bakteriální skvrnitost obsahují dva rRNA operony, které jsou uspořádány v pořadí 16S-23S-5S. Nachází se v oblasti 500 kb (mezi 4600000 bp a 5100000 bp) na levém replichoru. Pro 20 aminokyselin bylo zjištěno 56 tRNA. Z toho je 54 tRNA umístěno na chromozomu a 2 tRNA na plazmidech pXCV19 a pXCV183. Genom obsahuje 66 IS prvků. Z toho je 58 IS na chromozomu a zbylých 8 IS na čtyřech plazmidech (Thieme a kol., 2005; Vorhölter a kol., 2007).

## 2.2 Použité metody

### 2.2.1 PCR

V roce 1983 Kary B. Mullis odhalil princip polymerázové řetězcové reakce (PCR). Následně mu za tento objev v roce 1993 byla udělena Nobelova cena za chemii (Clark, 2005).

PCR je oblíbenou metodou, která se využívá v mnoha oblastech biologie. Slouží především k identifikaci rostlinných a živočišných druhů a bakterií (Korzun, 2002). Metoda využívá *in vitro* amplifikaci specifických sekvencí DNA bez klonování (Erlich, 1989; Innis a kol., 1990).

Proces PCR je založen na jednoduchosti a rychlosti. Na proces PCR můžeme nahlížet jako na zjednodušenou verzi procesu DNA replikace nukleových kyselin (Lo a kol., 2006).

Pro správný chod každé PCR potřebujeme tyto komponenty:

- a) templátovou DNA
- b) přesně definované primery (syntetické oligonukleotidy s délkou přibližně 20-30 bp)
- c) volné deoxynukleotidy
- d) termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza (většinou *Taq* polymeráza izolována z bakterie *Thermus aquaticus*)
- e) pufrující složky a soli - hořečnaté ionty, síran amonný aj. (Pusterla a kol., 2006).

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Určitý úsek nukleotidové sekvence je vymezen dvěma primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují proti sobě. DNA polymeráza zajišťuje nasedání nukleotidů. Následně se začnou syntetizovat nová vlákna na obou matricových řetězcích.

PCR probíhá ve třech hlavních krocích: (Obr.4)

1. denaturace: denaturace dvouřetězcové DNA při teplotě cca 94 °C za vzniku dvou molekul jednořetězcové DNA
2. annealing: připojení primerů k rozpleteným řetězcům DNA při teplotě cca 40 – 65 °C (teplota záleží na sekvenci primerů)
3. elongace: syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy při teplotě cca 65 – 75 °C (Sharkey a kol., 1994., 2005; White, 1993)

Tento cyklus se 20× - 35× opakuje a během krátké doby, tak dochází k mnohonásobné amplifikaci sekvence DNA. Během každého cyklu dojde ke zdvojnásobení počtu těchto sekvencí, takže po 30 cyklech bude teoretický počet takto vzniklých sekvencí dosahovat hodnoty 1 073 741 824. Celkový počet skutečně vzniklých produktů bude nižší než tento údaj v důsledku postupné degradace enzymu (Bustin, 2004).

Jako vedlejší krok se na začátku PCR často provádí úvodní denaturace, která probíhá při přibližně 94 °C po dobu 3 minut. Celý PCR program může zakončovat závěrečná elongace, která trvá přibližně 7 minut při 72 °C.

Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, který umožňuje programování jednotlivých teplot (Clark a Pazdernik, 2013). Většina termocyclerů využívá Peltierův efekt, který umožňuje vytápění a chlazení bloku PCR. Změny teplot docílíme obrácením směru toku elektrického proudu (Rychlik a kol., 1990).

Výsledkem PCR jsou amplikony tj. mnohonásobně zmnožený vybraný úsek DNA. Úspěšnost a přesnost PCR při amplifikaci určitého genu nebo části genomové sekvence DNA je závislá na pečlivém návrhu obou primerů, při němž je třeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu. K vizualizaci slouží elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. K zviditelnění pod UV světlem se nejčastěji používají interkalační fluorescenční barviva SYBR Green a Ethidium bromid (Šmarda a kol., 2005).

### **2.2.2 Multiplex-PCR**

Je to metoda, která je modifikací klasické PCR. Chamberlain a kol. (1988) poprvé detekovali delecí genu pro distrofin díky této metodě. Dalším významným zlomem bylo použití pro analýzu mikrosatelitů a SNP (Hayden a kol., 2008).

Multiplex PCR umožňuje amplifikaci více než jedné cílové oblasti v jedné PCR reakční směsi za použití více párů primerů (Obr. 6). Klíčovým krokem pro úspěšnou multiplex-PCR je návrh primerů, kde je kladen důraz na délku primerů, struktury, teplotu tání a annealingu, stabilitu 3' konce, poměr G a C bází aj. (Shea a kol., 2010).

Metoda má potenciál přinést značné úspory času a úsilí v laboratoři. Pro diagnostiku nukleových kyselin jsou používány ITS regiony. (Elnifro a kol., 2000). Tato metoda se dále uplatňuje při kvantitativní detekci transgenní DNA, při které je jeden pár primerů komplementární k internímu genu a druhý pár primerů k transgenu (Mannerlof a Tenning, 1997). V oblasti infekčních nemocí se tato technika ukázala jako cenný způsob identifikace virů, bakterií nebo hub (Elnifro a kol., 2000).

### **2.2.3 Elektroforéza**

Elektrofozéza patří mezi nejdůležitější metody biochemických analýz. Rozděluje fragmenty DNA, RNA nebo bílkovinné molekuly podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje (Sambrook a kol., 1989). Fragmenty DNA vznikají po restrikci molekuly DNA (Alberts a kol., 2005).

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

Nejčastěji používáme dva typy gelů, které se vybírají dle velikosti molekul. Polyakrylamidový gel slouží k separaci molekul o malé molekulové hmotnosti. Agarózový gel má široké molekulové rozpětí (500 nukleotidů - 20 kb).

Pro vizualizaci DNA fragmentů se nejčastěji používá značení interkalačním činidlem (SYBR Green, Ethidium bromid). Dříve se používalo radioaktivní značení. Pro detekci fragmentů DNA lze použít UV záření v přístroji zvaném transluminátor. Rozdělené molekuly DNA lze získat z gelu izolací (Freeman a kol., 2002).

## **2.3 Návrh primerů**

Hlavní charakteristikou oligonukleotidů, které určují účinnost a přesnost experimentů jsou teplota, kdy se primer váže na templát ( $T_m$ ). Primer nesmí obsahovat

palindromy a tvořit stabilní sekundární struktury. Tyto charakteristické vlastnosti oligonukleotidů jsou velice důležité pro složité analýzy, a to hlavně u DNA čipů (microarrays) a multiplex PCR. Návrh probíhá v programech, které jsou dostupné na internetu (Chavali a kol., 2005)

**Podmínky:**

- Délka primerů 18-25 nukleotidů
- Obsah guaninu a cytosinu 40 - 60%
- Rovnoměrné rozmístění oblastí bohatých na G/C a A/T
- Na 3'konci důležitá přítomnost G nebo C báze pro zajištění přesné vazby na templát
- Teplota  $T_m$  alespoň 50 °C
- Oba primery podobná teplota  $T_m$
- Specifičnost primerů – na matricové DNA nesmí být nescifická vazebná místa
- Absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě duplexů
- Absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek)

Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je však třeba optimalizovat. Pro získání požadovaného produktu je důležitá koncentrace jednotlivých složek reakční směsi (Šmarda a kol., 2005). Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bází, délce oligonukleotidů a hodnotě  $T_m$  produktu (Innis a kol., 1990).



### **3 Cíl práce**

1. Navržení PCR primerů pro detekci komplexu fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas*, které způsobují bakteriální skvrnitost rajčete s ohledem na možnost použití v multiplex-PCR.
2. Doporučení nejvhodnější kombinace primerů a podmínek PCR.
3. Stanovení specifity jednotlivých primerových párů v PCR.
4. Určení optimálních parametrů reakce

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Bakteriální kmeny a kultivační podmínky

K analýze byly použity bakteriální kmeny (Tab.1) získané z Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms v Gentu (BCCM/LMG), Collection Francaise de Bactéries Phytopathogènes v Beaucauzé (CFBP), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) a České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM).

Všechny kmeny byly kultivovány při 28 °C po dobu 1 až 3 dnů na MPAg (masopeptonovém agaru s glukosou: 40 g živného agaru č. 2, 5 g kvasničného autolyzátu, 10 g glukózy, 20 g agaru, doplněno dH<sub>2</sub>O do 1 litru, pH upraveno na 7,2).

### 4.2 Izolace bakteriální DNA

DNA byla izolována z narostlých bakteriálních kultur pomocí komerčně dostupného kitu Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, USA). Bylo postupováno dle přiloženého protokolu.

### 4.3 Návrh primerů

Pro návrh primerů byly použity sekvence DNA získané sekvenováním a z databáze GenBank (NCBI). Návrh probíhal v aplikaci Primer BLAST (NCBI)

Pro návrh primerů byli použity částečné sekvence DNA genů *efP*, *atpD*, *gyrB*, *rpoD*, a úseky celogenomových sekvencí tzv. „shotgun“ sekvence (Tab.2). Hlavním kritériem pro výběr primerů byla velikost produktu pro odlišení 4 skupin: A (*X. euvesicatoria*), B (*X. vesicatoria*), C (*X. perforans*) a D (*X. gardeneri*). Tyto primery byly nejdříve testovány v programu OligoAnalyzer 3.1 (OligoAnalyzer, 2012), kde byly zjištěny fyzikální vlastnosti (např. obsah G a C bází, teplotu tání, molekulovou hmotnost apod.) a pravděpodobnost vzniku sekundárních struktur – hairpinů (vlásenek) a dimerů. Interakci mezi všemi primery jsme testovali v programu MPprimer 2.0 (Shen a kol., 2010).

## **4.4 Testování primerů**

### **4.4.1 PCR s jednotlivými primery**

Jednotlivé páry primerů byly nejprve testovány samostatně. Reakční směs PCR byla připravena pro 8 párů primerů zvlášť v celkovém objemu 15 µl v následujícím složení: 7,5 µl PPP MasterMix Combi (Top-Bio, ČR), 4,5 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O, 1 µl templátové DNA a 1 µl každého z primerů (10 pmol). Program PCR se skládal z úvodní denaturace při 94 °C trvající 4 minuty. Vlastní denaturace probíhala při 94 °C trvající 45 sekund. Následoval annealing, jehož teplota byla stanovena na teplotním gradientu: 58; 58,7; 60,9; 62,4; 64,2; 65,9; 68,1; 69 [°C] po dobu 1 minuty. Elongace proběhla při 72 °C po dobu 45 sekund. Především tři kroky se opakovaly v 28 cyklech. Celý program byl zakončen elongací při 72 °C po dobu 7 minut. Po dokončení programu byly vzorky zchlazeny a udržovány při 4 °C.

### **4.4.2 Multiplex-PCR**

Na základě PCR v teplotním gradientu byly vybrány čtyři páry primerů (Xe\_shotgun\_104, Xe\_shotgun\_1819, Xv\_atpD\_403 a Xp\_efP\_202), které byly nejvíce specifické při detekci jednotlivých skupin zkoumaných bakteriálních kmenů. Specifičnost primerů byla testována na rozsáhlém souboru bakterií patogenních pro rajče a příbuzné plodiny (Tab.1).

Multiplex-PCR reakce byla namíchána do celkovém objemu 15 µl v následujícím složení: 7,5 µl PPP MasterMix Combi (Top-Bio, ČR), 4,5 µl sterilní destilované H<sub>2</sub>O, 1 µl templátové DNA a 0,25 µl každého z primerů (10 pmol).

Program PCR pro testování specificity se skládal z úvodní denaturace při 94 °C trvající 4 minuty. Následovala vlastní denaturace při 94 °C trvající 45 sekund. Annealing trval 1 minutu při teplotě 59°C. Elongace proběhla při 72 °C po dobu 45 sekund. Denaturace, annealing a elongace se opakovaly v 26 cyklech. Celý program byl zakončen elongací při 72 °C po dobu 7 minut. Po dokončení programu byly vzorky zchlazeny a udržovány při 4 °C.

## **4.5 Elektroforéza**

Po PCR byla každá z reakcí smíchána s interkalačním činidlem Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA) a nanášena na 1% agarózový gel s 0,5 × TBE (Sigma-Aldrich,

USA). Elektroforéza probíhala 15 minut při 1 V/cm a následně 80 minut při 4 V/cm. Agarózový gel byl vizualizován pomocí UV prosvěcovací lampy a dokumentačního zařízení InGenius3 (Syngene, UK).

## 5 Výsledky a diskuse

Tradiční metody detekce vyžadují kultivační krok a jsou časově náročné. Naproti tomu metoda PCR, kterou lze *in vitro* amplifikovat a detekovat sekvenci DNA specifickou pro určitý mikroorganismus, je rychlá a citlivá a také řeší problém malého množství cílové DNA ve vzorku (Naravaneni a kol., 2005; Lee a kol., 2009; Fukushima a kol., 2007).

Multiplex-PCR nám slouží k ještě větší úspoře času a peněz. K tomu jsou nezbytné specifické primery. Bylo vyvinuto 8 párů PCR primerů (Tab.2) pro detekci karanténních bakterií *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. euvesicatoria* a *X. gardneri*. Primery byly vybrány pomocí aplikace primer-BLAST a v OligoAnalyzer 3.1 (OligoAnalyzer, 2012) byly otestovány jejich vlastnosti, kde velikost primerů byla 15 – 21 bazí, nízká pravděpodobnost vzniku smyček (hairpinů), obsah G a C bazí byl 57,0 % a teplota tání 57,5 °C průměrně u všech primerů. Program MPprimer 2.0 (Shen a kol., 2010) zjišťoval vztah mezi primery (tzv. self-dimer, hetero-dimer). Primery měly mezi sebou nízkou interakci. Pro metodu multiplex-PCR je důležité, aby teplota pro připojení primerů byla podobná (přesto optimální) u všech použitých párů primerů (Edwards a Gibbs, 1994). Tato teplota se u navržených primerů pohybovala v rozmezí 56 – 59,7 °C.

Stanovení ideálního programu a ověření praktické funkčnosti primerů pro multiplex-PCR předcházela gradientová PCR jednotlivých vzorků pro všech 8 párů primerů samostatně. Na základě teplotního gradientu byla optimalizována teplota annealingu. Vlastní detekce všech vzorků proběhla při 59 °C a 26 cyklech pro čtyři páry primerů (*Xe\_shotgun\_104*, *Xe\_shotgun\_1819*, *Xv\_atpD\_403* a *Xp\_efP\_202*), které nejlépe zahrnují všechny 4 druhy bakterií.

Specifická primery byla testována na souboru 23 bakterií patogenních pro rajče a příbuzné plodiny (Tab. 1). Bakterie, které nejsou příbuzné s xanthomonádami nebyly detekovány vůbec, tudíž primery jsou specifické pouze pro xanthomonády. Ty byly rozděleny do 3 skupin dle velikostí produktů (Obr.3). První skupina zahrnovala pouze xanthomonády skupiny A (*X. euvesicatoria*) s délkou amplifikačního produktu 200 bp (párů bazí). Druhá skupina obsahovala *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*,

*Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas arboricola*, které měly délku amplifikačního produktu 400 bp. Třetí samostatnou skupinu tvořili xanthomonády skupiny B (*X. vesicatoria*), které měli velikost produktu 100 bp a 400 bp.

Dodržením popsaného protokolu lze navrženými primery rychle a spolehlivě identifikovat bakterii *X. vesicatoria*, a *X. euvesicatoria* v multiplex-PCR. *X.gardneri* byla při multiplex-PCR detekována společně s některými xanthomonádami, tudíž ji nelze spolehlivě odlišit od ostatních. *X. perforans* lze navrženými primery spolehlivě detekovat pouze při PCR s jednotlivými primery. Při multiplex-PCR nebyla detekována.

Jako první byly pro detekci xanthomonád navrženy specifické primery BSX 1/2, které detekovali skupiny A, B a D bez skupiny C (Cuppels a kol., 2006). Další důležité primery navrhli Moretti a kol. (2009), které jsou specifické pro *X. euvesicatoria*, a primery od Astua-Monge a kol. (2000) pro *X perforans*. Kompletní návrh primerů (BS-XER / F, BS-XVR / F, BS-Xpr / F a BS-XgR / F) pro všechny 4 skupiny stanovil H. Koenraadt a kol. (2007) na základě AFLP. Tyto primery byly následně použity pro multiplex-PCR, kde byly optimalizované podmínky tak, že se podařilo detekovat všechny 4 skupiny (Araújo a kol. 2012).

## **6 Závěr**

Byly navrženy PCR primery pro detekci komplexu fytopatogenních bakterií rodu *Xanthomonas*. Byla stanovena nejvhodnější kombinace primerů a podmínek PCR. Na základě spicificity primerů jsme stanovili ideální program multiplex-PCR, který detekoval xanthomonády skupin A a B. Pro skupinu C a D byly navrženy primery pouze pro uniplex PCR.

Tato práce vznikla v rámci projektu OPVK "Rozvoj postdoktorandských pozic na JU" (CZ.1.07/2.3.00/30.0049), spolufinancovaného Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

## 7 Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, A., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P.** (2005). *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Vydání 2. ISBN: 80-902906-2-0.
- Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V. a Quezado-Duval, A. M.** (2012) Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *J App Microbiol* **113**(6), 1479-1490.
- Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Davis, M. J., Bonas, U. a Jones, J. B.** (2000) Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 911–921.
- Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P. a Jackson, L. E.** (2003) Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Dis* **87**, 949-954.
- Bashan, Y., Diab, S. a Okon, Y.** (1982a) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. *Plant Soil* **68**, 161-170.
- Bashan, Y., Okon, Y., Henis, Y.** (1982b) Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology*. **72**, 1143-1144.
- Bustin, S. A.** (2004) *A-Z of quantitative PCR*. International University Line. Vydání 1. 432 s. ISBN-13: 978-0963681782.
- Clark, D. P.** (2005) *Molecular biology: Understanding the genetic revolution*. Vydání 2. 928 s. ISBN-13: 978-0123785947.
- Clark, D. P. a Pazdernik, N. J.** (2013) *Molecular biology*. Vydání 2. 928 s. ISBN: 978-0-12-378594-7.



- Cuppels, D. A., Louws, F. J. a Ainsworth, T.** (2006) Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Dis* **4**, 451–458.
- Doidge, E. M.** (1920) A tomato canker. *Ann Appl Biol* **7**, 407-430.
- Dougherty, D.** (1979) Yield reduction in tomato caused by bacterial spot and disease control with copper sprays. *P Fl St Hortic Soc.* **91**, 291-293.
- Dowson, W. J.** (1939) On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. *Zbl Bakt P.* **100**, 177-193.
- Edwards, M. C. a Gibbs, R. A.** Multiplex PCR: advantages, development, and applications. [online]. 1994 [cit. 2015-02-03]. Dostupné z WWW: <<http://genome.cshlp.org/content/3/4/S65.full.pdf>>
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J. a Klapper, P. E.** (2000) Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* **13(4)**, 559-570.
- EPPO/CABI** (1997) Quarantine Pests for Europe. Vydání 2. Publikováno Smith, I. M., McNamara, D. G., Scott, P. R., Holderness, M. *CABI International*. Wallingford, UK.
- Erlich, H. A.** (1989) PCR Technology: Principles and applications for DNA amplifications. Vydání 1. 246 s. ISBN 0-93585-956-X.
- Flaherty, J. E., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., Somodi, G. C. a Jackson, L. E.** (2000) Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and field with h-mutant bacteriophages. *Hort Science* **35**, 882-884.
- Freeman, W. H.** Molecular cell biology: identifying, analyig and sequencing cloned DNA. *NCBI* [online] 2009 [cit. 2015-02-02] Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A1637#A1648>>
- Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R. a Fujiwara, S.** (2007) Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl Environ Microb* **73 (1)**, 92-100.

- Hayden, M. J., Nguyen, T. M., Waterman, A. a Chalmers, K. J.** (2008) Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC genomics*, **9(1)**, 80.
- Hayward, A. C. a Waterston, J. M.** (1964) *Xanthomonas vesicatoria*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *CABI International*, Wallingford, UK
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N. a Thomas, C.** (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Prog Nucleic Acid Re* **16(23)**, 11141-11156.
- Chavali, S., Mahajan, A., Tabassum, R., Maiti, S. a Bharadwaj, D.** (2005) Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. *Bioinformatics*. **21(20)**, 3918-3925.
- Innis, M. A. a Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J.** (1990) PCR protocols: A guide to methods and applications. Vydání 1. 482 s. ISBN-13 978-0123721815 1.
- Jones, J. B, Pohronezny, K. L., Stall, R. E. a Jones J. P.** (1986) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology*. **76**, 430-434.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Minsavage, G. V., Stall, R. E. a Schaad, N. W.** (2005) Bacterial Spot - worldwide distribution, importance and review. *Acta Hort* **695**, 27-34.
- Jones, J.B, Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. a Schaad, N. W.** (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**, 755-762.
- Jones, T.** (1991) Ethical decision making by individuals in organizations: An issue-contingent model. *Acad Manage Rev* **16(2)**, 231-248.
- Koenraadt, H., van Betteray, B., Germain, R., Hiddink, G., Jones, J. B., Oosterhof, J., Rijlaarsdam, A. a Roorda, P.** (2009) Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Hort* **808**, 99–102.
- Korzun, V.** (2002) Molecular markers and their application in cereals breeding. *Cell Mol Biol Lett* **7**, 811-20.

- Kůdela, V., Novacky, A. a Fucikovsky, L.** (2002) Rostlinolékařská bakteriologie. Vydání 1. 347 s. ISBN 80-200-0899-3.
- Lee, S. H., Jung, B. Y., Rayamahji, N., Lee, H. S., Jeon, W. J., Choi, K. S., Kweon, C. H. a Yoo, H. S.** (2009) A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *J Vet Sci* **10(1)**, 43-51.
- Lo, Y. M. D., Chiu, R. W. K. a Chan, K. C. A.** (2006) Clinical applications of PCR. Vydání 2. 200 s. ISBN 1-58829-348-3.
- McGuire, R. G., Jones, J. B. a Sasser, M.** (1986) Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Dis* **70**, 887–891.
- Moretti, C., Amatulli, M. T. a Buonauro, R.** (2009) PCR–based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Lett Appl Microbiol* **49**, 466–471.
- Naravaneni, R. a Jamil, K.** (2005) Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *J Med Microbiol* **54**, 51-54.
- OEPP/EPPO** (1988) Data sheets on quarantine organisms No. 157, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **18**, 521-526.
- OligoAnalyzer 3.1.** Integrated DNA technologies. [online] 2012 [cit. 2015-02-03] Dostupné z WWW: <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>
- Pusterla, N., Madigan, J. E. a Leutenegger, C. M.** (2006) Real-time polymerase chain reaction: A novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases. *J Vet Intern Med* **20**, 3–12.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. a Rhoads, R. E.** (1990), Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, *Nucl Acids Res* **18**, 6409-6412.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. a Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning. Vydání 1. 999 s. ISBN
- Scortichini, M., Stefani, E., Elphinstone, J. a Bergsma-Vlami, M.** (2013). PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*,

*Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *BULLETIN OEPP*, **43**, 7-20.

**Sharkey, D. J., Scalice, E. R., Christy, J., Atwood, S. M. a Daiss, J. L.,** (1994). Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction, *Nat Biotechnol* **12**, 506-509.

**Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z. a Zhang, C.** (2010). MPprimer: program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC bioinformatics*. **11**(1), 143.

**Sijam, K., Chang, C. J. a Gitaitis, R. D.** (1992) A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Can J Plant Pathol* **14**, 182–184.

**Stall, R. E. a Thayer, P. L.** (1962). Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis Rep* **46**, 389-392.

**Sutic, D.** (1957) Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). In *Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd*, vol. 6, pp.1-65 (special edition). Beograd: Institute of Plant Protein. (English summary: *Rev Appl Mycol* **36**, 734-735).

**Swings, J. G. a Civerolo, E. L.** (1993) *Xanthomonas*. Vydání 1. 399 s. ISBN 0-412-43420-2.

**Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V. a Koptíková, J.** (2005) Metody molekulární biologie. Vydání 1. 192 s. ISBN 978-80-210-3841-7.

**Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D., Niesbach-Klösgen, U., Patschkowski, T., Rückert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S., Vorhölter, F., Weber, E., Pühler, A., Bonas, U., Bartels, D. a Kaiser, O.** (2005) Insights into genome plasticity and 37 pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**, 7254-7266.

**Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. a Swings, J.** (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 472-489.

**Vorhölter, E. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., Linke, B., Patschkowski, T., Rückert, C., Schmid, J., Sidhu, V. K., Sieber, V.,**

**Tauch, A., Watt, S. A., Weisshaar, B., Becker, A., Niehaus, K. a Pühler, A. (2007)** The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *J Biotechnol* **134**, 33-45.

**White, B. H. (1993)** PCR Protocols: Current methods and applications. Vydání 15. 392 s. ISBN 0-89603-244-2.

**Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. a Fargier, E. (2008)** A multilocus suquence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 366-377.

## 8 Tabulky

Tab.1: Seznam použitých bakteriálních kmenů

Pořadí	Sbírkové číslo	Současný název
1	BCCM/LMG 667	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
2	BCCM/LMG 934	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
3	BCCM/LMG 927	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
4	CCM 2101	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
5	BCCM/LMG 919	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
6	BCCM/LMG 916	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
7	BCCM/LMG 909	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
8	CCM 2101	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
9	CFBP 3274	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
10	BCCM/LMG 17140	<i>Ralstonia solanacearum</i>
11	BCCM/LMG 2306	<i>Ralstonia solanacearum</i>
12	BCCM/LMG 2237	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>passiflorae</i>
13	1109	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>
14	CCM 3980	<i>Erwinia amylovora</i>
15	BCCM/LMG 5727	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
16	BCCM/LMG 7333	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
17	BCCM/LMG 5093	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
18	5011	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>
19	DSMZ 18975	<i>Xanthomonas perforans</i>
20	DSMZ 19127	<i>Xanthomonas gardneri</i>
21	BCCM/LMG 934	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
22	CFBP 2537	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
23	CCM 899	<i>Xanthomonas arboricola</i>

BCCM/LMG = Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms, CFBP = Collection Francaise de Bactéries Phytopathogènes, CCM = Česká sbírka mikroorganismů v Brně, DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Tab.2: Primery použité při PCR

Název primeru	Název bakterie	Délka produktu (bp)	Sekvence forward primeru	Sekvence reverse primeru
Xv_atpD_403	<i>X. vesicatoria</i>	403	CCATTGGGAAATCCATCGCA C	CTTGCCGTTCTCGTCCTTCT
Xg_efP_236	<i>X.gardneri</i>	236	GGCCAGGCCTTTACCCGTAT	CAGTCTTCCTCGCCCTTGAG
Xp_efP_202	<i>X. perforans</i>	202	GCACTTCATGGACCCGGAAA	GCCGCCGGAGGTGTC
Xe_gyrB_542	<i>X. euvesicatoria</i>	542	AGCGCGGCTACATCTACATC	TTCGCGAATCAGGTCGTTCA
Xg_efP_312	<i>X. gardneri</i>	312	GCCAGGCCTTTACCCGTATG	CGGTCTCGGTGATCTTGAGC
Xe_Shotgun_1819	<i>X. euvesicatoria</i>	1819	GGCGCGTAAGTAGGACCTC	ATTATACCAGCCGGCACGAG
Xp_Shotgun_442	<i>X. perforans</i>	442	GTTGACGTTCCATCCTTCCG	TCGCTACGTTTTGCAAGC
Xe_Shotgun_104	<i>X. euvesicatoria</i>	104	TACTAGGCGGCATGTCTTCC	CGAAGCGTTGTTGCGTAGAG

Tab.3: Rozdělení do skupin dle multiplex-PCR

Skupina	Sbírkové číslo	Název bakteriálního kmenu
1	BCCM/LMG 667	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
	BCCM/LMG 909	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
	CCM 2101	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
	CFBP 3274	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
2	BCCM/LMG 934	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
	5011	<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>
	DSMZ 19127	<i>Xanthomonas gardneri</i>
	CCM 899	<i>Xanthomonas arboricola</i>
3	CCM 2101	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
	BCCM/LMG 919	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
	BCCM/LMG 916	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
	CFBP 2537	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>

1.skupina = amplifikační produkt velikosti 200 bp, 2. skupina = amplifikační produkt o velikosti 400 bp, 3. skupina = amplifikační produkty o velikostech 100 a 400 bp



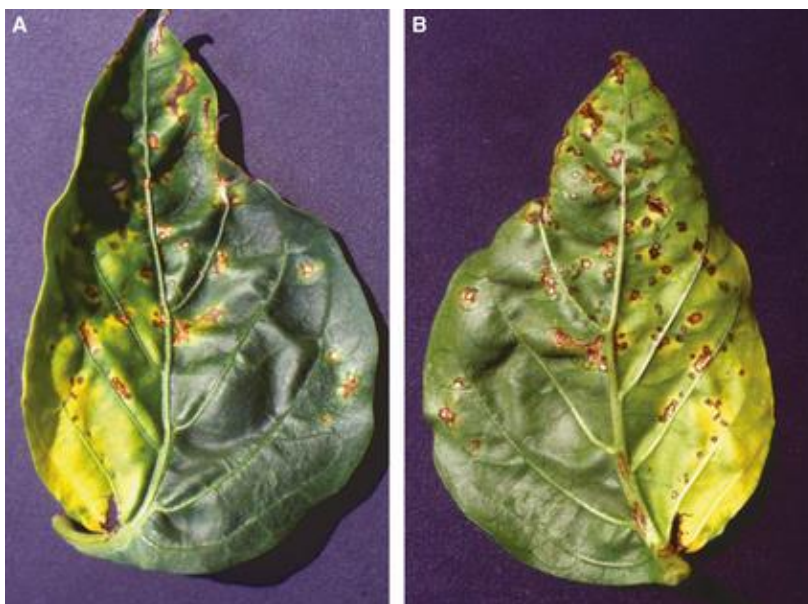
## 9 Obrázky

Obr.1: Symptomy bakteriální skvrnitosti na plodu rajčete způsobené bakteriemi rodu *Xanthomonas*



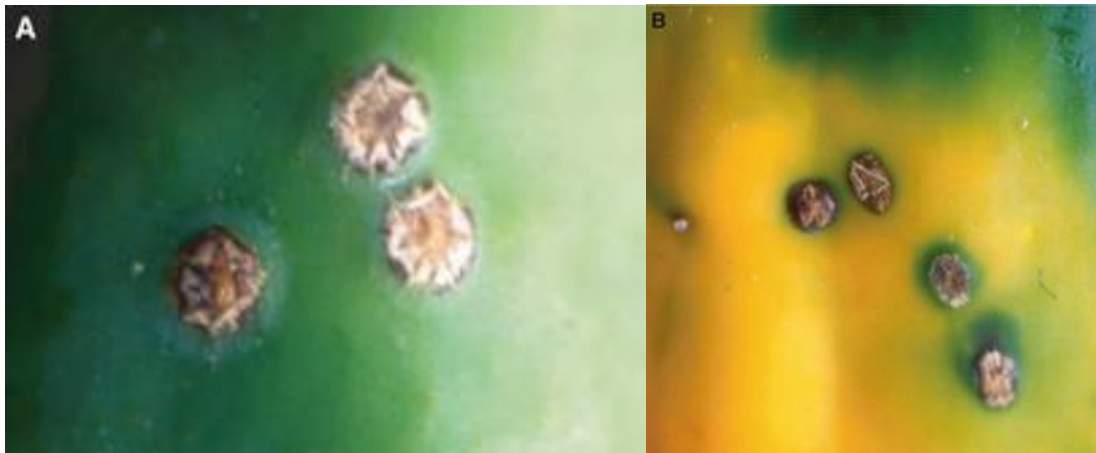
[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/epp.12018/asset/image\\_n/epp12018-fig-0002.png?v=1&t=i5h2bd4x&s=c26711bc565860e9d19eb86a337918b17df6c9ca](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/epp.12018/asset/image_n/epp12018-fig-0002.png?v=1&t=i5h2bd4x&s=c26711bc565860e9d19eb86a337918b17df6c9ca)

Obr.2: Symptomy bakteriální skvrnitosti na listu papriky infikované bakteriemi rodu *Xanthomonas*



[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/epp.12018/asset/image\\_n/epp12018-fig-0003.png?v=1&t=i5h1ociv&s=7d46f25b72594f46b51a94304b3799f04a0d0e0d](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/epp.12018/asset/image_n/epp12018-fig-0003.png?v=1&t=i5h1ociv&s=7d46f25b72594f46b51a94304b3799f04a0d0e0d)

Obr.3: Symptomy bakteriální skvrnitosti na plodu papriky vyvolané bakteriemi rodu *Xanthomonas*



[http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/epp.12018/asset/image\\_n/epp12018-fig-0005.png?v=1&t=i5h2jc9a&s=4ea9dcf74cbc8ffc3bad1074344e193a9d027ac4](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/epp.12018/asset/image_n/epp12018-fig-0005.png?v=1&t=i5h2jc9a&s=4ea9dcf74cbc8ffc3bad1074344e193a9d027ac4)

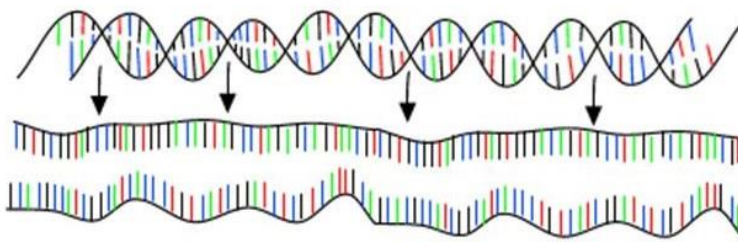
Obr.4: Symptomy bakteriální skvrnitosti na listech rajčete infikovaných bakteriemi rodu *Xanthomonas*



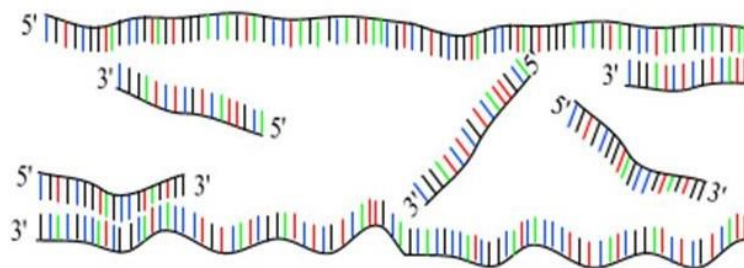
[http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/images/Pests/Septoria\\_Leaf\\_Spot\\_of\\_Tomato186.jpg](http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/images/Pests/Septoria_Leaf_Spot_of_Tomato186.jpg)

Obr.5: Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

30 – 40 cyklů

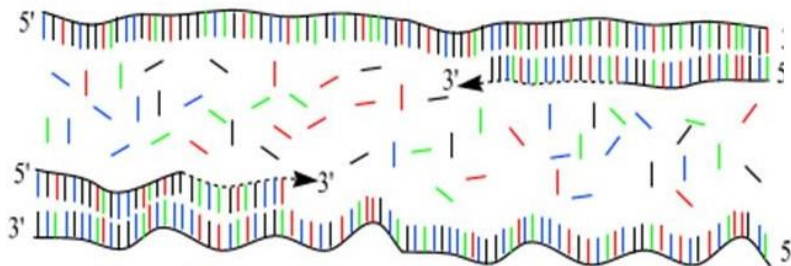


Krok 1:  
denaturace  
1min 94°C



Krok 2: annealing

45 sec, 54°C  
přímý a zpětný primer

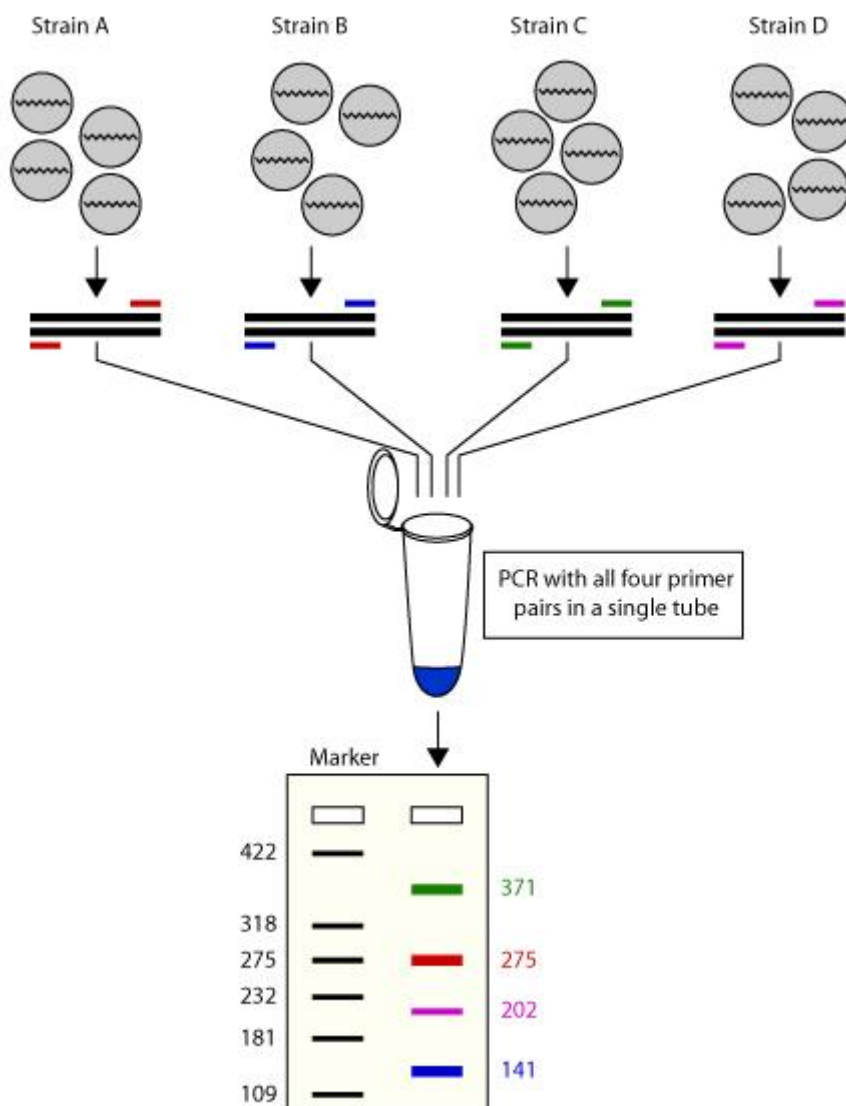


Krok 3: extenze  
2 min 72°C  
Pouze dNTP

(Andy Vierstraete 1999)

<http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/genetika/res/image/slovnicek/image2.jpeg>

Obrázek 6: Multiplex PCR



[http://www.premierbiosoft.com/images/multiplex\\_pcr\\_mechanism.jpg](http://www.premierbiosoft.com/images/multiplex_pcr_mechanism.jpg)