

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie – Rostlinné
Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce
rostlinné
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Detekce bakterií *Ralstonia solanacearum* patogenních
pro rajče, papriku a brambor metodou loop-mediated
isothermal amplification

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.
Konzultant bakalářské práce Ing. Dagmar Stehlíková
Autor bakalářské práce: Adam Strnad

České Budějovice, 2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adam STRNAD**

Osobní číslo: **Z16003**

Studijní program: **B4131 Zemědělství**

Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie - Rostlinné**

Název tématu: **Detekce bakterií *Ralstonia solanacearum* patogenních pro rajče, papriku a brambor metodou loop-mediated isothermal amplification**

Zadávací 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 :

Úvod: Cílem práce je optimalizovat detekční postup pro fytopatogenní bakterie *Ralstonia solanacearum*, které způsobují hnědou hnilobu u rajčat, paprik a brambor.

Cíle práce: Definice hypotéz a cílů práce.

Literární přehled: Charakteristika a význam bakterie *Ralstonia solanacearum* patogenních pro rajče, papriku a brambor. Princip LAMP metody, návrh primerů.

Materiál a metody: Charakteristika studovaných bakteriálních kmenů, izolace bakteriální DNA, návrh několika sad primerů, verifikace primerů metodou LAMP, vyhodnocení získaných dat, převod na detekční platformu Bioranger.

Výsledky: Výběr nejvhodnějších primerů, optimalizace metody, vyhodnocení dat, převod na platformu Bioranger.

Diskuze: Porovnání vlastních výsledků s literárními zdroji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, naplnění cílů práce.

Seznam použité literatury: V abecedním pořadí dle platné citační normy ČSN ISO 690 (01 0197).


Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah grafických prací: **5 stran**
Rozsah pracovní zprávy: **25-30 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).
Kůdela V., Nováček A., Fucikovsky L. Rostlinolékařská bakteriologie. Academia Praha, 2002, 347 s.
Kůdela 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 biotechnology. Academia Praha, 2002, 363s. (Vybrané kapitoly).
Šmarda J. a kol. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně, 2008, 188 s.
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: **Ing. Dagmar Stehlíková**
Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání bakalářské práce: **31. ledna 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **15. dubna 2019**


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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1888, 370 05 České Budějovice


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

V Českých Budějovicích dne 31. ledna 2018

Prohlášení

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.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování

Chtěl bych poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlu Beranovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracovávání mé práce. Dále bych chtěl velice poděkovat Ing. Dagmar Stehlíkové za trpělivost a čas strávený při laboratorních pracích, konzultacích a korekturách práce. Nemalé poděkování patří také kolegům z katedry genetiky a speciální produkce rostlinné za cennou pomoc a rady v průběhu laboratorních pracích.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantové agentury Jihočeské univerzity, grant č. GAJU 011/2017/Z.

Abstrakt

Pro rychlou detekci karanténní bakterie *Ralstonia solanacearum* patogenní pro rajče, brambor a papriku, byla využita metoda LAMP. Na základě analýzy sekvence genu *fliC* byla *in silico* navržena sada LAMP primerů s maximální teoretickou specifitou pouze pro *Ralstonia solanacearum*. Následně byla metoda optimalizována tak, aby byla schopna detekovat pouze bakterii *Ralstonia solanacearum* a rozlišit ji od ostatních fytopatogenních bakterií napadající brambor, rajče a papriku. Pomocí LAMP lze detekovat bakterii z velice malého množství DNA za dobu menší, než 30 minut v reálném čase. Metoda je schopna amplifikovat DNA o koncentraci 0,00001 ng/μl. Pro specifičtější detekci je však vhodnější koncentrace DNA vyšší.

Klíčová slova: molekulární diagnostika; *fliC*; LAMP; návrh primerů; PCR

Abstract

For rapid detection of quarantine bacteria *Ralstonia solanacearum* pathogenic for tomato, potato and papper, the LAMP method was used. Based on the analysis of the *fliC* gene sequence, a set of LAMP primers was designed to be specific for *Ralstonia solanacearum*. Subsequently, the method was optimized to detect only *Ralstonia solanacearum* and to distinguish it from the other phytopathogenic bacteria which infect potato, tomato and pepper. LAMP can detect bacteria from very small amounts of DNA in less than 30 minutes in real time. The method is capable of amplifying DNA at a concentration of 0.00001 ng/μl. However, a higher DNA concentration is more suitable for more specific detection.

Key words: molekular diagnostic; *fliC*; LAMP; primer design; PCR

1	Úvod	9
2	Cíle.....	10
3	Literární přehled	11
3.1	<i>Ralstonia solanacearum</i>	11
3.1.1	Charakteristika <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
3.1.2	Fylogenetické rozdělení	12
3.1.3	Patogenita a virulenční faktory	13
3.1.4	Charakteristika fylotypu IIB	13
3.2	LAMP	15
3.2.1	Návrh primerů	16
3.2.2	Hodnota T _m	17
3.2.3	Stabilita	17
3.2.4	Obsah GC	17
3.2.5	Sekundární struktury	17
3.2.6	Vzdálenost mezi primery	18
3.2.7	Princip LAMP	18
3.2.8	Real-Time LAMP pomocí fluorescenčního záření	22
3.2.9	Real Time LAMP pomocí turbidimetrie	23
3.2.10	Smart-DART™ a Bioranger™ platformy	24
3.2.11	Genie® II a III platformy	24
4	Materiál a metody	25
4.1	Návrh primerů	25
4.2	Bakteriální sbírky	26
4.3	Kultivace bakterií	26
4.4	Izolace DNA	27
4.5	PCR	29
4.6	Loop-mediated isothermal amplification	30
4.6.1	LAMP gradient	30
4.6.2	LAMP specifita	30
4.6.3	Senzitivita LAMP reakce	31
4.7	Elektroforéza	32
5	Výsledky a diskuse	32
5.1	Aligment DNA	32
5.2	Návrh primerů	33

5.3	Izolace DNA.....	34
5.4	PCR	35
5.5	Loop-mediated isothermal amplification	36
5.5.1	LAMP gradient	36
5.5.2	LAMP specifita	39
5.5.3	LAMP sensitivita	43
6	Závěr	44
7	Seznam zkratek.....	45
8	Seznam literatury.....	46

1 Úvod

Ralstonia solanacearum způsobující bakteriální vadnutí a hnědou hnilobu je celosvětově velkou hrozbou pro pěstování zemědělských a okrasných plodin, jako je například brambor, rajče, paprika, kakost, nebo banánovník. Současná ochrana proti této bakterii spočívá v chemické ochraně a v opatřeních zamezujících šíření tohoto patogena (Hayward, 1991; Mansfield a kol., 2012).

Pro účinnost těchto opatření je důležitá rychlá a přesná detekce a identifikace bakterie. Metoda LAMP umožňuje rychlou a přístrojově nenákladnou amplifikaci cílového úseku DNA. Výhody této metody jsou především vysoká specifita a citlivost a možnost provedení metody v terénních podmínkách. Díky tomu lze původce onemocnění odhalit už v raném stádiu dříve, než se projeví na rostlině příznaky. Tímto se metoda LAMP odlišuje od ostatních klasických identifikačních metod jako je například kultivace, PCR, sekvenování. Klíčovou roli v přesné identifikaci a detekci patogena hraje specifita primerů a optimalizace podmínek LAMP metody pro danou sadu primerů. Metodu pak lze převést na zařízení umožňující její sledování v reálném čase a tím zkrátit dobu reakce, čímž lze v polních podmínkách provést velice rychlou a přesnou diagnostiku. (Kubota, 2011; Fang a kol., 2008; Lenarčič, 2014, Notomi, 2000).

Cílem této práce je navrhnout a optimalizovat LAMP metodu specifickou pro detekci *Ralstonia solanacearum*. Dále metodu optimalizovat tak, aby bylo možné ji provádět v reálném čase a otestovat její specifitu vůči ostatním bakteriím patogením pro rajče, papriku a brambor. Výsledky této práce mohou být využity v praxi při detekci patogena.

2 Cíle

Návrh specifických LAMP primerů pro *Ralstonia solanacearum*

Optimalizace metody LAMP pro specifickou detekci *Ralstonia solanacearum*

Stanovení senzitivity pro metodu LAMP

3 Literární přehled

3.1 *Ralstonia solanacearum*

3.1.1 Charakteristika *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996 (dříve známá jako *Pseudomonas solanacearum* (Hayward, 1964)) je gram negativní bakterie tyčinkovitého tvaru, která není schopna sporulace. Způsob pohybu je pomocí peritrichálních bičků. Bakterie má striktně aerobní metabolismus. Bakterie způsobují bakteriální vadnutí u více než 200 druhů rostlin v 50 různých rodech (Hayward, 1991; Kelman, 1994; Yabuuchi, 1995). Způsobuje onemocnění u mnoha důležitých rostlin, jako je například hnědá hniloba brambor, vadnutí rajčat, tabáku, lilku a banánu (Hayward, 1991). Na základě široké škály hostitelů a širokého geografického rozložení patogen zaujímá druhé místo mezi deseti nejvýznamnějšími bakteriálními patogeny rostlin (Mansfield a kol., 2012).

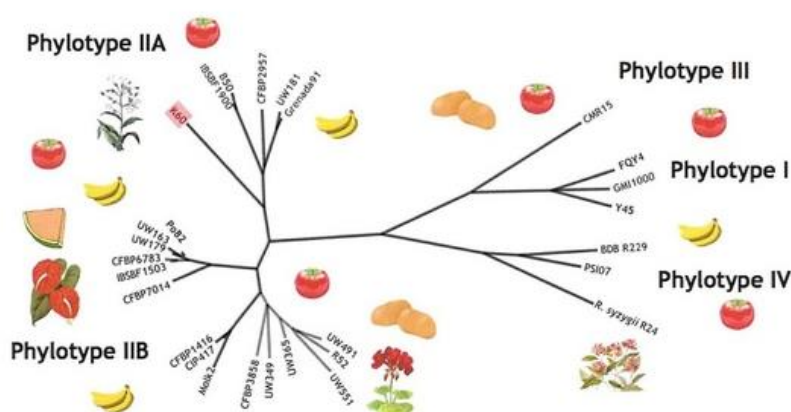
Ralstonia solanacearum napadá hostitelské rostliny jako parazit a přežívá v půdě nebo ve vodě jako saprofyt (Wallis and Truter, 1978; Elsas a kol., 2001). Bakteriální vadnutí, které *Ralstonia solanacearum* způsobuje, je hlavním omezením při produkci lilkovitých plodin v tropických, subtropických a některých teplých mírných oblastech po celém světě. Další velké ekonomické ztráty způsobuje onemocnění Moko, které je hlavní chorobou ohrožující pěstování banánů po celém světě (Fegan a Prior, 2006). Kontrola onemocnění chemickými látkami a rotací plodin je nedostatečná, protože patogen je zvláště dobře přizpůsoben pro přežití v půdě a rhizosféře (Hayward, 1991). *Ralstonia solanacearum* infikuje rostliny přes poranění, kořeny nebo trhliny v místech laterálního vzniku kořenů. Bakterie následně kolonizuje kořenovou kůru, poté napadá xylém, až dosáhne stonku a vaskulárního systému rostliny, ve kterém se dále rozmnožuje (Mansfield a kol., 2012). Důležitou roli v patogenitě rostlin hraje extracelulární vysokomolekulární kyselý polysacharid, který má vysoký stupeň heterogenity (Orgambide a kol., 1991). Bakterie v xylému vylučuje velké množství extracelulárních polysacharidů, které brání přepravě vody, což

nakonec vede k úmrtí rostlin (McGarvey a kol., 1999). Extracelulární polysacharidy také hrají velice důležitou roli v kolonizaci rostlin (Araud-Razou a kol., 1998).

3.1.2 Fylogenetické rozdělení

Na základě fylogenetického seskupení a oddělených evolučních linií je *Ralstonia solanacearum* rozdělena do čtyř fylotypů, které odrážejí její geografické rozšíření. Fylotypy I a II jsou složeny z asijských a amerických kmenů, jedinci fylotypu III jsou afrického původu a jedinci fylotypu IV pocházejí z Indonésie, Japonska a Austrálie. Tyto fylotypy jsou dále rozděleny do sequevarů, které jsou založeny na rozdílech v sekvencích genů endoglukanázy (*egl*), hypersenzitivní odpovědi patogeneze B (*hrpB*) a na základě analýzy sekvence interní transkribované distanční oblasti (ITS) (Prior a Fegan, 2005). Fylotypy mohou být dále rozděleny do skupin kmenů, pojmenované sequevary nebo sekvenční varianty, podle nukleotidové sekvence genu *egl*. Bylo definováno více než 50 sequevarů. Díky rozsáhlým fylogenetickým datům o kmenech fylotypu II bylo navrženo, aby byl tento fylotyp rozdělen do dvou podskupin IIA a IIB. Kmeny *Ralstonia solanacearum* fylotyp IIB, sequevar 1 (historicky známý jako rasa 3 biovar 2) jsou zvláště zajímavé pro Evropu a Severní Ameriku, protože způsobují infekce brambor v mírném podnebí, které mohou mít za následek vysoké ekonomické ztráty (Elphinstone, 2005; Cellier a kol., 2012; Castillo a Greenberg, 2007). *Ralstonia solanacearum* je ve většině zemí uznávána jako karanténní bakterie (EPPO, 2004).

Obr. 1: Schéma rozdělení fylotypů *Ralstonia solanacearum*



http://www.agriculture-biodiversite-i.org/var/ez_site/storage/images/media/images/actu-prpv2/extract-from-the-thesis-of-florent-ailloud/114767-1-eng-GB/Extract-from-the-thesis-of-Florent-Ailloud_reference.jpg

3.1.3 Patogenita a virulenční faktory

Důležitou roli v rozvoji patogenity hraje vývoj genomu *Ralstonia solanacearum* a horizontální přenos genů (Coupat a kol., 2008; Fall a kol., 2007; Guidot, 2007, 2009b). Analýza genomových sekvencí devíti genomů *Ralstonia solanacearum* odhalila četné genomvé ostrovy, z nichž mnohé jsou obklopeny mobilními prvky, jako jsou inserční sekvence (IS) nebo bakteriofágy, což naznačuje horizontální akvizici (Remenant a kol., 2010, 2011, 2012).

Bylo prokázáno, že 80 % kmenů *Ralstonia solanacearum* je přirozeně transformovatelných plazmidy nebo genomovou DNA. Velké úseky DNA v rozmezí od 30 do 90 kb mohou být přenášeny mezi kmeny (Coupat a kol., 2008). Potenciál výměny genů virulence horizontálním přenosem genů by mohl hrát důležitou roli v rychlém vývoji patogenity u kmenů *Ralstonia solanacearum*. Úloha horizontálního přenosu genů při zvyšování agresivity kmenů *Ralstonia solanacearum* u rajčat byla experimentálně demonstrována (Coupat-Goutaland a kol., 2011).

Faktory virulence jsou skupina několika látek, které *Ralstonia solanacearum* produkuje. Jsou to například enzymy rozkládající buněčnou stěnu rostlin, kyselé, vysokomolekulární extracelulární polysacharidy a adhezny zahrnující celou řadu lektinů (Wu a kol., 2009). Důležitým faktorem virulence patogenních bakterií jsou lipopolysacharidy v buněčné stěně bakterií, které se uplatňují při přímé interakci s eukaryotickou buňkou. Fytopatogenní bakterie, které mají omezenou schopnost syntézy lipopolysacharidů, mají sníženou životaschopnost v tkáních rostlin a tím klesá i virulence patogena. Přímý kontakt lipopolysacharidů s hostitelkou buňkou, je pro virulenci nezbytný (Esposito, 2008).

3.1.4 Charakteristika fylotypu IIB

Hnědá hniloba brambor patří k nejzávažnějším chorobám brambor po celém světě. Je způsobena podskupinou kmenů *Ralstonia solanacearum* známých jako rasa 3 biovar 2 (R3bv2), který patří k fylotypu IIB sequevar 1 (Prior a Fegan, 2005). Ačkoliv původně byly popsány jako kmeny s omezeným hostitelským rozsahem pouze na brambor (Hayward, 1991), tak kmeny r3 bv2 nejsou výlučně asociovány pouze

s bramborem. Následně byla hlášena také infikovaná rajčata, baklažán, kakost a mnoho plevelů a divokých rostlin (Elphinstone a kol., 2005; Swanson a kol., 2005; Álvarez a kol., 2008). R3bv2, který pravděpodobně vznikl v Andách, je přizpůsoben horským teplotám, a proto je tolerantnější vůči chladům než jiné tropické kmeny *Ralstonia solanacearum* (Hayward, 1991). R3bv2 je také účinnější při infekci a vadnutí rostlin za chladných podmínek (Milling a kol., 2009). Kmeny R3bv2 jsou specificky nebezpečné, protože mohou způsobit latentní infekci bez příznaků v sadbových bramborových hlízách nebo semenech ostatních hostitelských rostlin, což usnadňuje šíření patogenů po celém světě prostřednictvím množitelského rostlinného materiálu (Swanson a kol., 2005; 2007). Bakterie byla náhodně zavlečena do USA a Evropy pomocí infikovaných kakostových řízků dovezených z vysokohorských oblastí, kde je R3bv2 endemický (Kim a kol., 2003; Janse a kol., 2004). Vzhledem k významnému ekonomickému dopadu bakteriální infekce v mírném podnebí je R3bv2 karanténní patogen v Evropě a Severní Americe (Guidot a kol., 2009a).

Obr. 2: Rostlina napadená bakterií Ralstonia solanacearum



https://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/images/Modules/Sptme1_BR.gif

Obr. 3: Kolonie *Ralstonia solanacearum* na živné agarové půdě



<https://bugwoodcloud.org/images/768x512/5079060.jpg>

3.2 LAMP

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) je metoda amplifikace nukleových kyselin, která využívá izotermické podmínky pro účinnou, rychlou a vysoce specifickou amplifikaci DNA. Metodu LAMP v roce 2000 vyvinul Notomi a kolektiv. Oproti nejčastěji používané PCR je LAMP rychlejší a zároveň citlivější. S pomocí LAMP je možno amplifikovat i množství DNA o velice nízké koncentraci v průběhu jedné hodiny až na 10^9 kopií z jedné molekuly DNA (Notomi, 2000; Liu, 2012). LAMP je nyní již používána v oblasti přírodních věd, zejména k detekci mikroorganismů (Fang a kol., 2008; Wong, 2018).

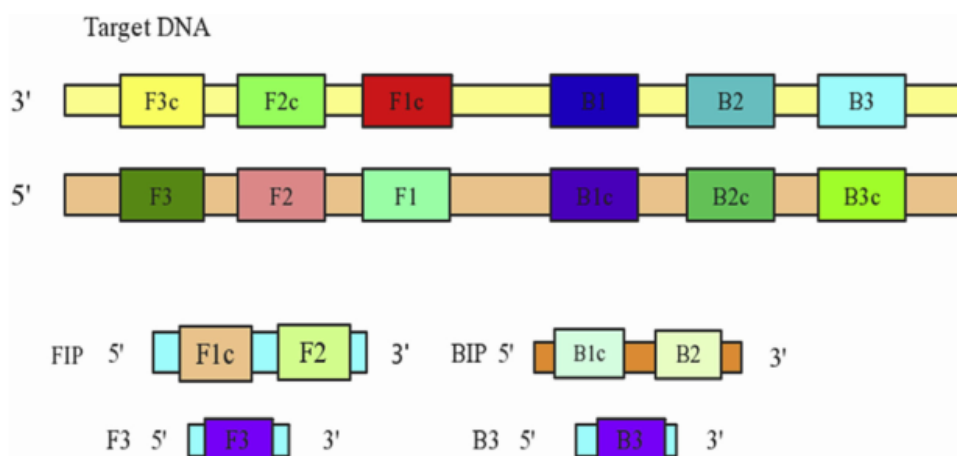
U metody LAMP je zapotřebí použít jiný druh polymerázy než při klasické PCR. Využita je obvykle jedna ze tří druhů polymeráz. První je *Bsm* polymeráza izolovaná z bakterie *Bacillus smithii*, druhou polymeráza *Bst* izolovaná z *Bacillus stearothermophilus* a třetí polymeráza *Gsp* izolovaná z *Geobacillus stearothermophilus* (Dhama a kol. 2014; Hawwa a kol., 2009). Optimální teplotní rozpětí pro tyto polymerázy se pohybuje mezi 60 - 65 °C. (Notomi, 2000). Teplotní optimum pro *Bsm* polymerázu je 60 °C avšak bezpečně katalyzuje syntézu DNA do teploty 63 °C (Dhama a kol., 2014) Polymeráza *Gsp* má teplotní optimum od 60°C do 65°C (Hawwa a kol, 2009; Kang a kol., 2015). Všechny polymerázy dokáží

katalyzovat syntézu vláken ve směru 5'-3', nemají však 5'-3' exonukleázovou aktivitu. Toto jim umožňuje oddělovat DNA vlákna za současné syntézy nových vláken. Reakce LAMP probíhá za izotermických podmínek při teplotním optimu polymerázy (Kim a kol., 2014; Nagamine a kol., 2002). Oproti PCR, kde je zapotřebí i neustále střídat teploty za různých časových prodlev, se pro detekci patogenů LAMP jeví jako výhodnější metoda amplifikace (Kamachi a kol., 2006).

3.2.1 Návrh primerů

Pro návrh LAMP primerů se běžně používá online program PrimerExplorer V4/V5 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) a program LAMP Designer (<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>). Sada primerů pro reakci LAMP zahrnuje tzv. forward inner primer (FIP), backward inner primer (BIP), dva vnější primery, které jsou pojmenovány jako forward outer primer (F3) a backward outer primer (B3) plnící hlavní funkci při vytěšňování DNA vlákna. Tyto čtyři primery odpovídají sekvenci 6 různých cílových oblastí (Obr. 4) (Nagamine a kol., 2002). FIP primer se skládá z míst F2 a F1c a nasedá na místo F2c a F1. BIP primer se skládá z místa B2 a B1c a nasedá na místo B2c a B1. F3 a B3 primery mají pouze jedno nasedací místo. F3 primer nasedá na místo F3c a B3 primer nasedá na místo B3c. Dále mohou být navrženy 2 smyčkové primery, pojmenované jako forward loop primer (FLP) a backward loop primer (BLP). Smyčkové primery se využívají ke zrychlení reakce (Parida, 2008; Nagamine a kol., 2002).

Obr. 4: Oblasti nasedání primerů na DNA



<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0882401017300748-gr1.sml>

Každý ze základních primerů (2 vnitřní primery FIP a BIP a 2 vnější primery F3 a B3) hraje klíčovou roli v reakci LAMP. Musí být proto dodrženo několik navrhovacích zásad (Notomi, 2000; Nagamine a kol., 2002;).

3.2.2 Hodnota T_m

Hodnota T_m se odhaduje pomocí metody Nejbližšího souseda. Vypočtená hodnota T_m je ovlivněna experimentálními podmínkami, jako je koncentrace solí a oligonukleotidová koncentrace, takže je výhodné, aby se T_m vypočítala za pevných experimentálních podmínek (koncentrace oligonukleotidu 0,1 μM , sodík koncentrace iontů při 50 mM, koncentrace hořčíkových iontů 4 mM). Hodnota T_m pro každou oblast je navržena tak, aby byla pro F1c a B1c přibližně 60 °C (64 - 66 °C), přibližně 60 °C (59 - 61 °C) pro F2, B2, F3 a B3 a přibližně 65 °C (64 - 66 °C) pro smyčkové primery.

3.2.3 Stabilita

Konec primerů slouží jako výchozí bod pro syntézu DNA a proto musí mít určitý stupeň stability. 3' konce oblastí F2 / B2, F3 / B3 a FLP / BLP a 5' konec oblastí F1c / B1c jsou navrženy tak, aby volná energie byla -4 kcal / mol nebo méně. 5' konec F1c po amplifikaci odpovídá 3' konci F1, kde stabilita je velice důležitá. Změna volné energie (ΔG) je rozdíl mezi energií bez produktu a energií bez reaktantů. Reakce probíhá směrem k negativní změně volné energie (ΔG).

3.2.4 Obsah GC

Primery jsou navrhovány tak, aby obsah GC byl mezi 40 % - 50 %, pokud je sekvence bohatá na GC báze. Pokud je sekvence bohatá na AT báze ideální obsah GC je 50 % - 60 %.

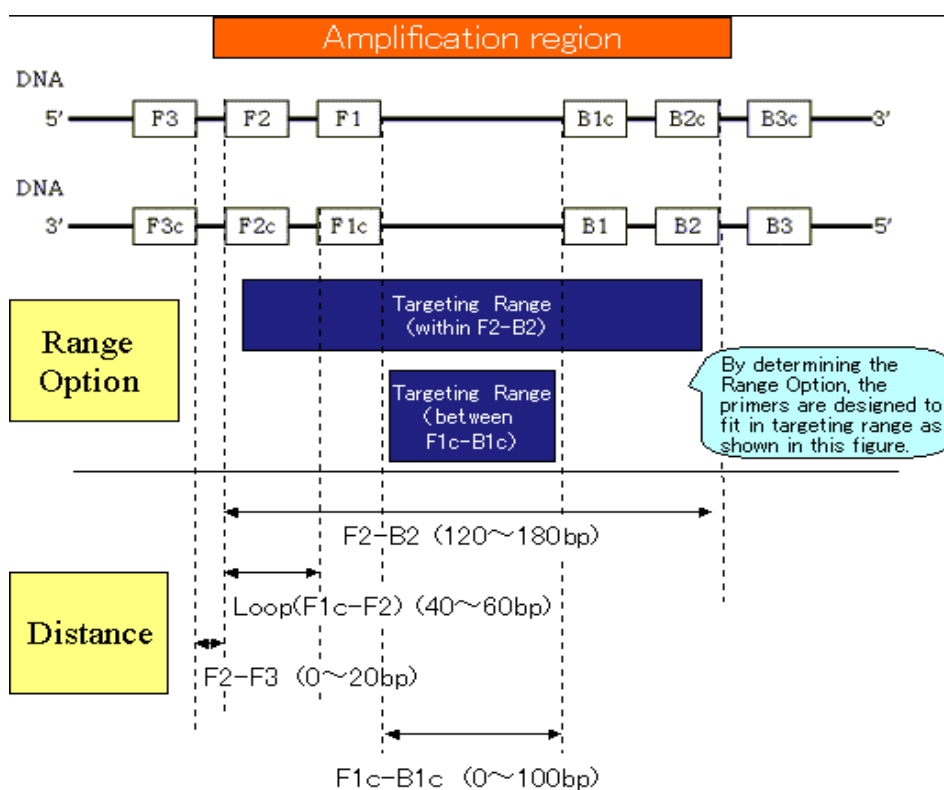
3.2.5 Sekundární struktury

Při navrhování je důležité, aby primery netvořily sekundární struktury. Nesmí tvořit dimery a vlásenky. Toto je důležité zejména u FIP a BIP primerů. Aby se zabránilo tvorbě sekundárních struktur, je důležité zajistit, aby useky oligonukleotidů nebyly komplementární.

3.2.6 Vzdálenost mezi primery

Primery jsou navrženy tak, aby vzdálenost od konce F2 až po konec B2 (oblast amplifikace metodou LAMP) byla mezi 120 až 160 bázemi. Dále, aby vzdálenost od 5' konce F2 po 5' konec F1 (část která tvoří smyčku) byla mezi 40 bázemi a 60 bázemi. Vzdálenost mezi F2 a F3 je mezi 0 až 60 bázemi.

Obr. 5: Vzdálenost mezi primery



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

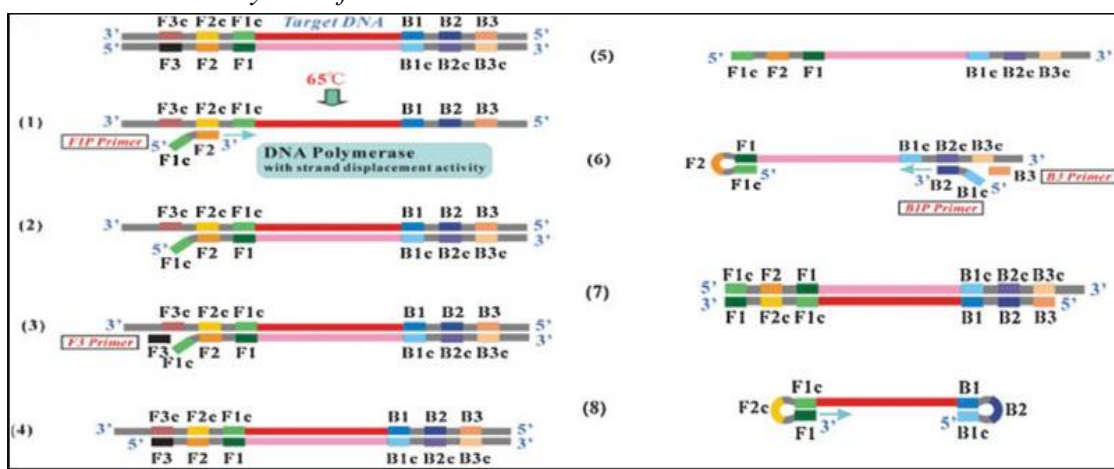
3.2.7 Princip LAMP

Metodu LAMP lze rozdělit do dvou fází. Fáze přípravy výchozího materiálu a fáze cyklická, ve které dochází k amplifikaci velkého množství DNA (Nagamine a kol., 2002).

Nejprve primer FIP nasedá místem F2 na místo F2c a místo F1c zůstává volné. Na templátu DNA dochází k syntéze nového řetězce komplementárního k templátu. Následně primer F3 nasedá na místo F3c a začne se vytvářet nový řetězec komplementární k templátu. Vlákno DNA vzniklé od předchozího primeru FIP se tedy oddělí a místo F1c hybridizuje s místem F1, čímž na vláknu vznikne smyčka. Na tomto

DNA vlákně je rozpoznávací místo pro primer BIP, který nasedá místem B2 na místo B2c a místo B1c zůstává opět volné. Polymeráza začne syntetizovat nové vlákno a vznikne tak opět dvouvláknová DNA. Následně primer B3 nasedne na místo B3c a vlivem polymerázy se opět vytváří nový řetězec DNA a původní se oddělí. Jelikož na obou koncích tohoto vlákna se již nacházejí dvě rozpoznávací sekvence, které jsou samy sobě komplementárními, může na obou koncích molekuly docházet přechodně k hybridizaci a tvorbě smyček. Toto vlákno už obsahuje všechna rozpoznávací místa potřebná pro cyklickou fázi. (Li a kol., 2017; Nagamine a kol., 2001)

Obr. 7: Schéma necyklické fáze LAMP



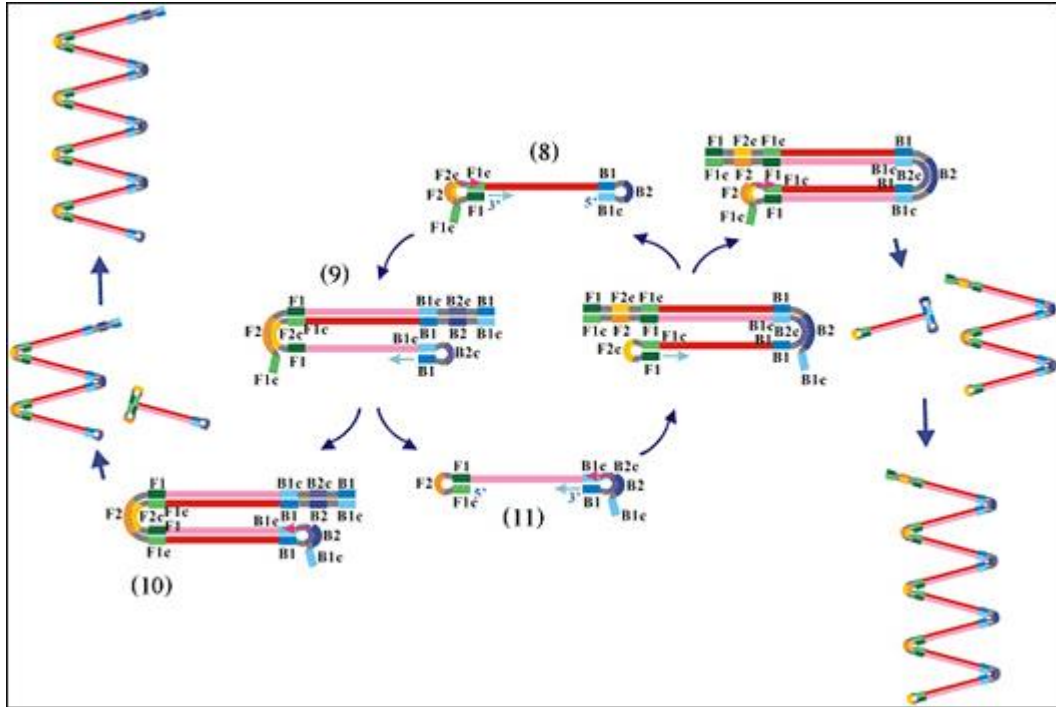
<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0882401017300748-gr2.jpg>

(1) Hybridizace primeru FIP na templátovém vláku, polymeráza zahajuje svoji aktivitu. (2) DNA polymeráza syntetizuje řetězec DNA komplementární k templátové DNA od oblasti F2, (3) Nasednutí F3 primeru v oblasti F3c. (4) DNA polymeráza rozplétá dvojvlákno, čímž se jedno vlákno uvolní a syntetizuje nové od F3 primeru (5) uvolněné vlákno, které umožňuje na 5' konci vznik smyčky, (6) na jednovláknové DNA se tvoří smyčka a slouží jako templát pro syntézu iniciovanou BIP primerem z 3' konce a následně nasedání B3 primeru. (7) syntéza nového vlákna za oddělování vlákna původního od B3 primeru. (8) Uvolněné vlákno z předchozího kroku tvoří smyčky na obou dvou svých koncích.

V cyklické fázi primer FIP nasedne na smyčku v místě F2c a zahájí se nová DNA syntéza, přičemž původní vlákno je vytlačeno novým. Tento jednovláknový řetězec vytváří smyčkovou strukturu na 3' konci kvůli komplementárním oblastem B1c a B1. Potom začíná syntéza DNA začínající od 3' konce oblasti B1 jako templát používající vlastní strukturu a uvolňuje řetězec spojený s FIP. Uvolněná jednovláknová DNA pak tvoří smyčky na obou koncích díky komplementární oblasti F1-F1c a B1c-B1. Dále primer BIP nasedá na B2c oblast a zahájí DNA syntézu, čímž uvolní oblast B1. Výsledkem tohoto cyklu jsou různé struktury skládající se ze střídavě opakovaných cílových sekvencí na stejném vlákně. Cyklická fáze pokračuje až do

zastavení reakce, což vede k vytvoření 10^9 kopií za méně než hodinu (Parida, 2008; Nagamine a kol., 2002).

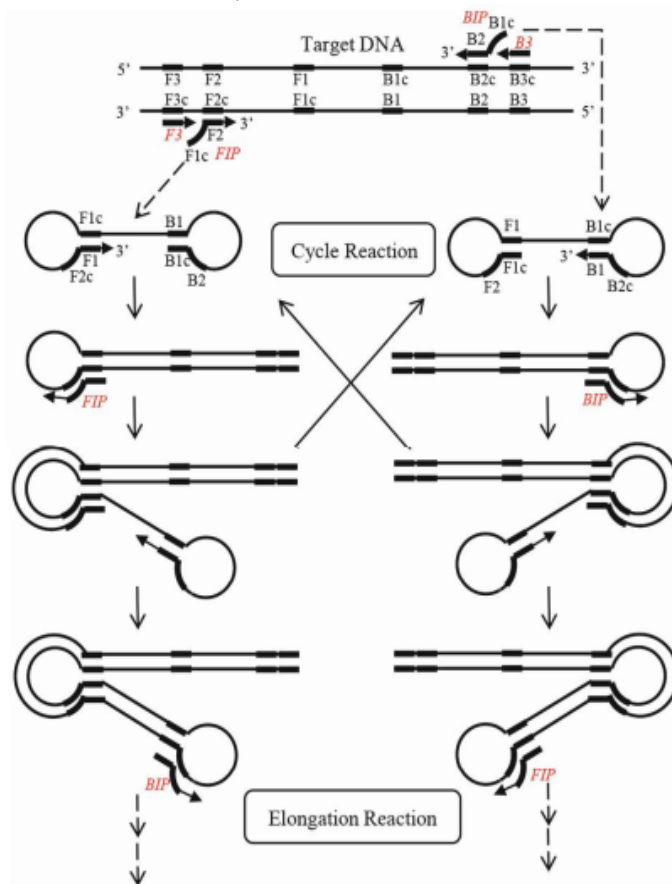
Obr. 8: Schéma cyklické fáze LAMP



http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/img/principle_13.jpg

(9) Od 3' konce B1 začíná nová syntéza DNA, následuje uvolnění vlákna spojené s FIP, tato struktura může „obtočit“ strukturu vytvořenou v kroku 8, vzniká tak struktura (10), (11) opakuje se stejný děj, jako v kroku 8.

Obr. 9: Schéma metody LAMP

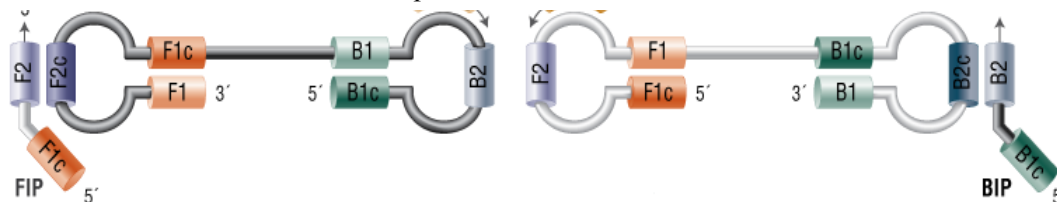


<https://ai2-s2-public.s3.amazonaws.com/figures/2017-08>

[08/b7dc195af1f896dd7425703d0a20a906caae6e68/2-Figure1-1.png](https://ai2-s2-public.s3.amazonaws.com/figures/2017-08/08/b7dc195af1f896dd7425703d0a20a906caae6e68/2-Figure1-1.png)

Kromě primerů F3, B3 a FIP, BIP, mohou být pro zrychlení reakce použity i smyčkové primery (Nagamine a kol., 2002). Použitím smyčkových primerů je možné amplifikaci zrychlit o třetinu až polovinu oproti reakci bez použití smyčkových primerů. Doba amplifikace se tedy může snížit až na 30 minut (Parida, 2008).

Obr. 10: Místo nasedání FIP a BIP primerů na základní strukturu



<https://international.neb.com/-/media/nebus/page-images/applications/dna-amplification-and-pcr/lamp.png>

Výsledek reakce, tedy zda amplifikace proběhla, nebo ne, lze ověřit vizuálně. Během reakce se síran hořečnatý přeměňuje na difosforečnan hořečnatý. Tím dochází k zakalení obsahu zkumavky, ve které reakce probíhá. Podle zákalu a jeho intenzity se již dá hodnotit průběh reakce. (Kamachi a kol., 2006). Další metodou pro vizualizaci je gelová elektroforéza (Parida, 2008). Metodu lze hodnotit i v reálném čase jak bude popsáno v dalších kapitolách.

3.2.8 Real-Time LAMP pomocí fluorescenčního záření

Metodu LAMP lze provést podobně jako PCR i v reálném čase. Některé typy fluorescenčního barviva se mohou vázat na dvouvláknovou strukturu, jakmile jsou syntetizovány produkty dsDNA, což způsobí změnu optického signálu. Tyto interklační činidla byly proto použity pro sledování procesu reakce LAMP v reálném čase (Tanner a Evans, 2014).

Prahová hodnota detekce amplifikovaného produktu může být definována jako čas, ve kterém je zaznamenáván pozitivní fluorescenční signál. Pomocí kalibračních standardů lze extrapolovat počáteční koncentraci vzorku (Cai a kol., 2008).

Zaznamenáváním intenzity fluorescence pomocí optických čteček jsou data analyzována, aby byly získány kvantitativní informace o počáteční templátové DNA. Vzhledem k široké dostupnosti a rychlosti integrace s dsDNA je jako monitorovací barvivo v reálném čase často používán SYBR Green (Zang a kol., 2014).

Monitorovací systémy na bázi sondy, jako je TaqMan, nejsou použitelné pro reakci LAMP, protože princip amplifikace LAMP reakce je založen na syntéze DNA řetězce pomocí dislokázové aktivity. Avšak Kouguchi a kol. v roce 2010 vyvinuli duplexní metodu pro detekci výsledku LAMP reakce použitím jediného primeru značeného 6-karboxyfluoresceinem (FAM) a indikátorem Ethidium bromidu. Tímto způsobem se mohou kvantitativně rozlišovat sekvenčně specifické LAMP produkty. Využívání takto značené sondy přispívá ke zlepšení specifčnosti detekce (Kouguchi a kol., 2010; Zang a kol., 2014).

Dále mohou být použity asimilační sondy na principu FRET (Fluorescence resonance energy transfer). Jedná se o dvojici oligonukleotidových sond, pro sledování metody LAMP v reálném čase. Princip fungování dvojice sond je analogický s molekulárním zipem, který byl předtím demonstrován pro sledování v reálném čase amplifikace RCA a amplifikace ramification (RAM). Konstrukt molekulárního zipu

se skládá ze dvou částečně komplementárních oligonukleotidů (Kubota, 2011; Yi., 2006).

Asimilační sondy jsou dvoukomponentové sondy s fluorescenčními vlákny, které se nachází na 3' konci BLP nebo na FLP primeru sekvencí komplementární ke zhášecímu řetězci na 5' konci. (Kubota, 2011).

3.2.9 Real Time LAMP pomocí turbidimetrie

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

3.2.10 Smart-DART™ a Bioranger™ platformy

V reálném čase lze metodu provádět i na zařízení Smart-DART™ nebo novější verzi BioRanger™ od společnosti Diagenetix Inc. Tento přístroj dokáže nastavit teplotu požadovanou pro LAMP reakci a analyzovat současně až 8 vzorků. Umí také odečítat fluorescenční signál a tím sledovat reakci v reálném čase. Zároveň umí číst dvě vlnové délky, takže ho lze využít pro multiplex LAMP. Zařízení lze bezdrátově pomocí Bluetooth® připojit do zařízení se systémem Android prostřednictvím aplikace, která umožňuje uživateli ovládat nastavení reakčních podmínek a zobrazení dat graficky v reálném čase. Platforma funguje jako uzavřený systém pro amplifikaci pomocí metody LAMP bez rizika kontaminace a využitelného i terénních podmínkách. (Jenkins a kol., 2011; Keremane a kol., 2015).

Obr. 11: BioRanger™ platforma



http://diagenetix.com/wp-content/uploads/2015/02/LidOpenTube_Blue.png

3.2.11 Genie® II a III platformy

Platformy Genie® od firmy OptiGene také umožňují provádět metodu LAMP v polních podmínkách a vizualizovat ji v reálném čase. Přístroje se liší od těch z Diagenetix Inc. zejména v tom, že jejich ovládání neprobíhá přes mobilní aplikaci, ale pomocí zabudovaného displeje. Jejich použití umožňuje provést metodu za kratší

dobu, než 20 minut. (Bühlmann, 2013; Tomlinson, 2010, 2013). Zařízení funguje podobně jako platformy od Diagenetix, Inc. je schopné zahřát vzorky na požadovanou teplotu a tím umožnit průběh reakce. Záznam reakce v reálném čase probíhá také na principu odečítání fluorescence. Přístroje Genie® II mají 2 oddělené bloky každý po 8 slotech pro vzorky, takže lze najednou zpracovávat až 16 vzorků. Přístroje Genie® III jsou přizpůsobené více na práci v terénu a mají slot pouze na 8 vzorků. Na rozdíl od Genie® II umí číst při dvou vlnových délkách, takže s ním lze provádět multiplex LAMP. Ovládání přístroje stejně, jako sledování průběhu reakce lze na zabudovaném dotykovém displeji. Platformy lze připojit k počítači pomocí USB, Bluetooth® a WiFi. Pro polní provádění LAMP je výhodou Genie® III i zabudovaná GPS (Hu, 2018; Bühlmann, 2013; Tomlinson, 2010, 2013).

Obr. 11: Genie® III platforma



<http://www.optigene.co.uk/wp-content/uploads/2012/07/G3-Open-aa-324degrees2-360x252.png>

4 Materiál a metody

4.1 Návrh primerů

Nejprve byla provedena *in silico* analýza za pomoci programů MEGA 7 (Kumar, 2016) a NCBI BLAST (NLM, USA). Sekvence byly použité z databáze NCBI. Byla provedena analýza v programu MEGA 7, kde byla pozorována odlišnost

v genech 16S rRNA, *fliC*, *hrpB*, *egl* u *Ralstonia solanacearum* od ostatních bakterií (Tab. 1).

Primery pro metodu LAMP byly navrhovány v programu Primer Explorer V5. Byly nastaveny následující parametry: pro F1c/B1c délka primerů 20-22 nukleotidů a T_m 59-61 °C. Pro F2/B2 délka primerů 18-22 nukleotidů T_m 64-66 °C. Pro F3/B3 18-22 nukleotidů, T_m 64-66 °C. Zastoupení GC bází bylo 55-63 %. ΔG 5' byla nastavena -4 a ΔG 3' byla nastavena -5.

Po nastavení těchto parametrů program vygeneroval několik možností kombinací primerů. Vygenerované možnosti sad primerů FIP, BIP, F3, B3 byly testovány pomocí NCBI BLAST kvůli zjištění teoretické specifity pro detekci blízké příbuzných bakterií. Tento program porovnává zadané sekvence se sekvencemi v databázi. Takto byla vybrána sada primerů, která teoreticky umožňuje amplifikaci pouze sekvence specifické pro *Ralstonia solanacearum*. Následně byla pomocí programu MEGA 7 zjišťována místa, kam by měly primery teoreticky nasedat. Pro navrženou sadu primerů, byly dále navrhovány smyčkové primery.

4.2 Bakteriální sbírky

Všechny použité bakteriální kmeny byly z následujících sbírek: Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – Bacteria Collection, Gent (BCCM/LMG), Czech Collection of Microorganisms, Brno (CCM), Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures (DSMZ), Crop Research Institute Collection, Czech Republic, Prague – Ruzyně (CRI) (Tab. 1).

4.3 Kultivace bakterií

Pro kultivaci bakterií (Tab. 1) byly použity dva typy médií. Nejprve bylo použito pevné médium MPAg (Masopeptonový agar s glukózou), ve složení živný agar č. 2 (Sigma-Aldrich, USA), kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, USA), glukosa, agar, pH 7,2. Bakterie byly naočkovány křížovým roztěrem na Petriho misky. Kultivace probíhala při 27,5 °C po dobu 48 hodin. Po uplynulé době byly bakterie naočkovány do kónické zkumavky (falkonky) o objemu 50 ml s 5 ml tekutého C média (Dreier a kol., 1995) a byly kultivovány v laboratorní třepačce dalších 24 hodin při stejné teplotě. Tento krok byl proveden kvůli lepšímu výtěžku DNA při následné izolaci.

4.4 Izolace DNA

Izolace bakteriální DNA byla prováděna třemi různými izolačními postupy.

Postup č. 1: pomocí komerčně dostupného izolačního kitu Genomic Mini od firmy A&A Biotechnology, Polsko. Kolonie byly izolovány z Petriho misek. Jednotlivé kolonie byly rozpuštěny v 10 μ l Tris Buffer a poté centrifugovány při 14 000 x g. Poté byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 200 μ l Lysis Bufferu a 20 μ l Proteinázy K. Zkumavky byly pak inkubovány v heat blocku po dobu 20 minut při 37 °C a následně při 70 °C po dobu 5 minut. Směs byla dále zvortexována a izolace pokračovala podle izolačního protokolu. Nakonec byla izolovaná DNA rozpuštěna v 150 μ l Tris Buffer a skladována při – 20 °C.

Postup č. 2: byl použit upravený postup podle Miniprep of bacterial genomic DNA (Wilson, 2001). Nejprve proběhla centrifugace kónické zkumavky s bakteriální kulturou při 10000 x g po dobu 15 minut. Supernatant byl odpipetován a pelet bakteriální kultury byl následně resuspendován v 565 μ l TE pufru (Složení: 1 M Tris pH 8, 0.5 M EDTA pH 8, dH₂O). Takto připravená kultura byla přenesena pomocí mikropipety do mikrozukavky typu eppendorf o objemu 1,5 ml. Následně bylo přidáno 30 μ l 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) a 5,5 μ l proteinázy K (c = 11 mg/ml). Směs byla důkladně zvortexována a inkubována v heat blocku po dobu 1 hodiny při 37 °C. Následně bylo přidáno 100 μ l 5 M NaCl a 80 μ l CTAB/NaCl. Vše bylo zvortexováno a inkubováno 10 minut při 65 °C. Po inkubaci bylo přidáno 0,7 ml chloroform/isoamyl alkoholu, důkladně zvortexováno a centrifugováno na mikrocentrifuze 5 minut při 14000 \times g. Ve zkumavce vznikly 2 fáze. Horní vodná fáze byla přepipetována do nové mikrozukavky typu eppendorf od objemu 1,5 ml a bylo přidáno 0,7 ml fenol/chloroform/isoamyl alkoholu a důkladně zvortexováno. Poté znova proběhla centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Vodná fáze byla přepipetována do nové mikrozukavky a bylo přidáno 0,6 celkového objemu isopropanolu. Poté proběhla centrifugace při 14000 \times g po dobu 20 minut. Byl přepipetován supernatant a přidán 1 ml 70% ethanolu. Opět proběhla centrifugace jako v předchozím kroku, ale jen po dobu 5 minut, tento krok byl opakován 2 \times . Následně byl přepipetován supernatant a pelet byl vysušen pomocí Concentrator plus (Eppendorf, Germany) po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté byl pelet rozpuštěn v 100 μ l TE pufru a skladován při – 20 °C.

Postup č. 3: byl upravený postup podle JGI Bacterial genomic DNA isolation using CTAB (William a kol., 2012). Nejprve proběhla centrifugace kónické zkušavky s bakteriální kulturou při $10000 \times g$ po dobu 20 minut. Supernatant byl odpipetován a pelet bakteriální kultury byl následně resuspendován v 1 ml TE pufru. Takto připravená kultura byla přenesena pomocí mikropipety do mikrozkušavky typu eppendorf o objemu 1,5 ml. Poté bylo přidáno 20 μ l lysozymu ($c=100$ mg/ml) a proběhla inkubace v heat blocku při 37°C po dobu 30 minut. Po inkubaci bylo přidáno 40 μ l 10% SDS a 8 μ l proteinázy K ($c=10$ mg/ml). Směs byla zvortexována a inkubována 3 hodiny při 56°C . Poté bylo přidáno 100 μ l 5 M NaCl a 100 μ l CTAB/NaCl předeřátého na 65°C . Směs byla dobře promíchána za pomoci vortexu a inkubována při 65°C po dobu 10 minut. Po inkubaci bylo přidáno 0,5 ml chloroform/isoamyl alkoholu, důkladně zvortexováno a centrifugováno na mikrocentrifuze 10 minut při $14000 \times g$. Ve zkumavce vznikly 2 fáze. Horní vodná fáze byla přepipetována do nové mikrozkušavky typu eppendorf o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 0,5 ml fenol/chloroform/isoamyl alkoholu a důkladně zvortexováno. Poté znova proběhla centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Vodná fáze byla přepipetována do nové mikrozkušavky a bylo přidáno opět 0,5 ml chloroform/isoamyl alkoholu, směs byla důkladně zvortexována a centrifugována za stejných podmínek jako v předchozích krocích. Poté byla vodná fáze přepipetována do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 0,6 z celkového objemu isopropanolu vychlazeného na -20°C . Směs byla lehce protřepána a ponechána 16 hodin v mrazáku při teplotě -20°C . Dále následovala centrifugace při $14000 \times g$ po dobu 20 minut a při teplotě 4°C . Následně byl odpipetován supernatant a byl přidán 1 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20°C . Následovala centrifugace při $14000 \times g$ po dobu 5 minut a při teplotě 4°C . Supernatant byl odpipetován a pelet byl resuspendován ve 170 μ l sterilní destilované H_2O . K tomuto bylo přidáno 10 % z celkového objemu 3 M octanu sodného a 2,5 z celkového objemu 96% ethanolu. Směs byla zvortexována a následně byla ponechána 30 minut v mrazáku při teplotě -80°C . Poté proběhla centrifugace při $14000 \times g$ po dobu 20 minut a při teplotě 4°C . Dále byl odstraněn supernatant a přidán 1 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20°C a následovala centrifugace při $14000 \times g$ po dobu 5 minut a při teplotě 4°C . Po tomto kroku byl supernatant odpipetován a pelet byl vysušen pomocí Concentrator plus (Eppendorf, Germany) po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté byl pelet rozpuštěn ve 100 μ l TE pufru a skladován při -20°C .

4.5 PCR

Pomocí metody PCR, byla ověřována specifita navržených F3 a B3 primerů. Reakční směs pro PCR byla následující. Na jeden vzorek bylo použito 5,5 μ l H₂O, 7,5 μ l PPP Master Mixu (TopBio, CZ), 0,5 μ l (5 mM) F3 primeru, 0,5 μ l (5 mM) B3 primeru. Do směsi o objemu 14 μ l, byl přidán 1 μ l DNA v koncentraci 50 ng/ μ l. Takto připravené reakční směsi byly amplifikovány v termocykleru, ve kterém byl nastaven program uvedený v Tab. 2. Krok 2-4 se opakoval 35x pro dostatečnou amplifikaci DNA. Byla testována izolovaná DNA z bakterií (Tab. 1), které jsou patogenní pro brambor, rajče a papriku.

Tab. 1: Sbírkové bakterie použité pro PCR

Bakterie	Sbírka	Číslo sbírky
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CRI	7096
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CCM	4073
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CCM	9052
<i>Erwinia amylovora</i>	CCM	1133
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI	8120
<i>Ralstonia solanacearum</i>	LMG	17140
<i>Ralstonia solanacearum</i>	LMG	2306
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	RICP	909/00
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	RICP	1835/98
<i>Erwinia herbicola</i>		2
<i>Xanthomonas gardneri</i>	DSMZ	19127
<i>Burkholderia glumae</i>	LMG	10906
<i>Pseudomonas syringae</i>	CRI	8113
<i>Xanthomonas arboricola</i>	CCM	899
<i>Xanthomonas perforans</i>	DSMZ	18975
<i>Clavibacter michiganensis</i> susp. <i>michiganensis</i>	CRI	1033

Tab. 2 : Program PCR cyklů

		Teplota	Čas	Opakování
1	úvodní denaturace	95 °C	5 min	} 35x
2	denaturace	94°C	1 min	
3	annealing	58°C	40 s	
4	elongace	72°C	1 min	
5	závěrečná elongace	72°C	15 min	
6	chlazení	4°C	-	

4.6 Loop-mediated isothermal amplification

4.6.1 LAMP gradient

Pro optimalizaci navržených LAMP primerů pro detekci *Ralstonia solanacearum* bylo nezbytné zjistit optimální teplotu a čas reakce. Byl proto vytvořen teplotní a časový gradient LAMP reakcí pomocí PCR thermocycleru. Teplotní gradient byl od 60 do 65 °C. Časový gradient sledoval amplifikaci po 60 minutách, 40 minutách a 20 minutách. Pro reakce byla použita DNA z *Ralstonia solanacearum* sbírky CCM 17140 naředěná na 50 ng/μl. Dále byly použity primery 5 mM F3 a B3, 40 mM FIP a BIP, 20 mM FLP a BLP. Pro jeden vzorek bylo použito 12,5 μl isothermal master mixu (Optigene, UK), 1 μl od každého primeru, 3,5 μl PCR H₂O, 3 μl DNA. Celkový objem vzorku byl 25 μl. V termocycleru byl nastaven program uvedený v Tab. 3 s osmi teplotami (Tab. 7) od 60 do 65 °C.

Tab. 3: reakce LAMP gradientu

Krok		Teplota	Čas
1	reakce	gradient 60 - 65 °C	Gradient 20 - 60 minut.
2	denaturace	99 °C	2 min
3	chlazení	4 °C	-

4.6.2 LAMP specifita

Specifita navržené sady LAMP primerů byla ověřena u 15 bakterií. Reakce byla sledována a vyhodnocována jak v reálném čase za pomoci interkalačního činidla, tak pomocí gelové elektroforézy. Složení reakce pro jeden vzorek je uvedeno v Tab. 4. Byla použita *Bst* DNA polymeráza (NEB, UK) a izotermální Buffer II (NEB, UK)

kompatibilní s DNA polymerázou. Dále byl použit Betain (OptiGene, UK), MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), dNTP's (Sigma-Aldrich, USA). Koncentrace DNA všech bakterií byla 50 ng/μl. Koncentrace primerů byla stejná jako u LAMP gradientu. Reakce probíhala při 65 °C. Reakce vizualizovaná pomocí gelové elektroforézy probíhala 20 minut.

Tab. 4: Složení reakce LAMP pro specifitu

Složení mixu	Celkem 25 μl reakce	Finální koncentrace
<i>Bst</i> Polymeráza	1 μl	8 U
Buffer	2 μl	1x z 10x
MgCl ₂	4 μl	5 mM
Betain	4 μl	4 mM
dNTP's	1,1 μl	25 mM
H ₂ O	4,1 μl	---
Primer F3	0,8 μl	5 mM
Primer B3	0,8 μl	5 mM
Primer FIP	0,8 μl	40 mM
Primer BIP	0,8 μl	40 mM
Primer FLP	0,8 μl	20 mM
Primer BLP	0,8 μl	20 mM
SYBR® Green	1 μl	1x z 10000x v DMSO
DNA	3 μl	50 ng/μl

4.6.3 Senzitivita LAMP reakce

Pro stanovení sensitivity metody LAMP byla použita desetinná ředící řada o 7 ředění. Výchozí koncentrace DNA byla 10 ng/μl. Koncentrace tedy byly: 10 ng/μl, 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl, 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl. Pro analýzu byla použita bakterie *Ralstonia solanacearum* sbírka LMG, číslo sbírky 17140 a

složení reakce bylo stejné jako u testování specifity. Stanovení sensitivity bylo prováděno v reálném čase.

4.7 Elektroforéza

Výsledky PCR a LAMP byly následně vizualizovány pomocí elektroforézy na 1 % agarózovém gelu. Gel byl připraven z 1,2 g agaru a 120 ml $1 \times$ TBE pufru. Do gelu bylo přidáno 8 μ l ethidium bromidu (Sigma-Aldrich, USA) pro vizualizaci výsledků. Pro dosažení lepší separace elektroforéza probíhala napřed při 2 V/cm 15 minut a poté 5 V/cm 1 hodinu. Výsledek byl zobrazován pomocí transiluminátoru (Syngene, UK) pod UV zářením v programu GeneSys (New England Bio-Grup, USA). Jako molekulární standard (ladder) u PCR byl použit standardní 100 bp DNA ladder (NEB, UK) a u LAMP byl použit standardní Wild range DNA ladder (Sigma-Aldrich, USA). Jako negativní kontrola byla použita PCR s H₂O místo vzorku.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Aligment DNA

Z výše jmenovaných genů, byl vybrán gen *fliC*, který je dle databáze NCBI znám jen u několika z cílových bakterií. Zároveň se na genu *fliC* nachází dostatečný počet míst, specifických pouze u pro *Ralstonia solanacearum*. Gen *fliC* kóduje protein flagelin, který přispívá k virulenci a interakci mezi patogenem a hostitelem (Schonfeld, 2003; Van Vaerenbergh, 2012). *FliC* byl již dříve zjištěn u mnoha klinických i fytopatogenních bakteriálních druhů (Wang, 2003; Paiva, 2009; Winstanley 1999; Schonfeld, 2003). Lenarčíč a kol. v roce 2014 navrhli primery pro oblast 16S rRNA, *fliC* a *egl* a optimalizované pro metodu LAMP. V programu PrimerExplorer V5 nebylo možné pro gen *egl* primery navrhnout vzhledem k výše nastaveným parametrům.

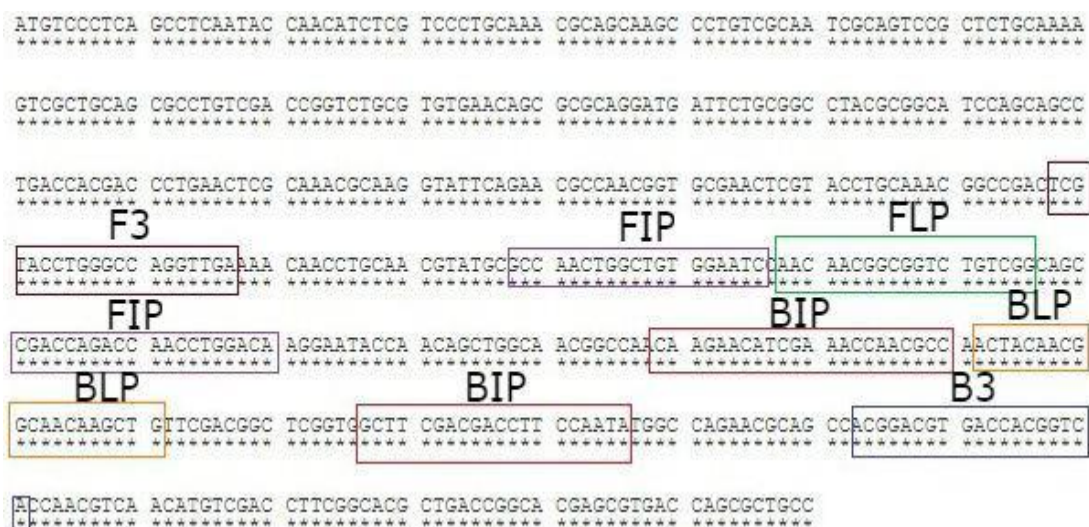
Obr. 12: Aligment skevenci DNA

Species/Abbrv	Gr										*	*	*		*	*	*		*					*	*	*		*	*	*															
1. GU076488.1_Ralstonia_solanacearum_strain_DBC		T	A	C	C	C	G	C	A	T	C	C	A	G	C	A	G	C	C	T	G	A	C	C	A	C	G	A	C	C	C	T	G	A	A	C	T	C	G	C	A	A	A	C	G
2. JF261013.1_Pseudomonas_syringae_pv_tomato_ε		C	T	G	C	A	A	A	T	C	C	T	A	C	C	A	A	G	A	T	C	A	C	T	T	C	G	C	A	G	A	T	C	C	G	T	G	G	C	C	A	G	A	C	A
3. EF544882.1_Pseudomonas_syringae_pv_syringae		C	T	G	A	A	C	A	T	C	C	C	A	C	C	A	A	G	A	T	C	A	A	C	T	C	G	C	A	G	A	T	C	A	A	A	G	G	T	C	A	G	A	C	C
4. AY743588.1_Erwinia_amylovorans_strain_CFBP_1430		C	A	G	C	C	G	A	T	T	C	T	A	A	C	C	G	C	T	T	C	A	C	T	C	T	A	A	C	A	T	C	A	A	A	G	G	T	T	T	G	A	C	T	

5.2 Návrh primerů

Dle zadaných parametrů, se podařilo navrhnout a vybrat jednu sadu LAMP primerů na základě DNA sekvence genu *fliC* (Tab. 5; Obr. 1). Primery byly navrženy tak, aby byly co nejvíce specifické pro *Ralstonia solanacearum*. K sadě FIP, BIP, F3 a B3 se následně podařilo navrhnout i 2 smyčkové primery, které mohou celou reakci ještě urychlit. Jak ukazují předchozí studie, pro *Ralstonia solanacearum* byly již dříve navrženy specifické LAMP primery na tomto genu (Kubota a kol., 2008).

Obr. 13: Umístění primerů na genu *fliC*



Tab. 5: Sekvence navržených primerů

Primer	5'pozice	3'pozice	Délka primeru	T _m (°C)	Sekvence
F3	238	257	20	65,06	TCGTACCTGGGCCAGGTTGA
B3	463	481	19	65,40	TGACCGTGGTCACGTCCGT
FIP	-	-	39	-	TGTCCAGGTTGGTCTGGTCG GCCAACTGGCTGTGGAATC
BIP	-	-	42	-	CAAGAACATCGAAACCAAC GCCTATTGGAAGGTCGTCTCGA AGC
FLP	298	316	19	64,65	CCGACAGACCGCCGTTGTT
BLP	392	411	20	60,56	ACTACAACGGCAACAAGCT G

5.3 Izolace DNA

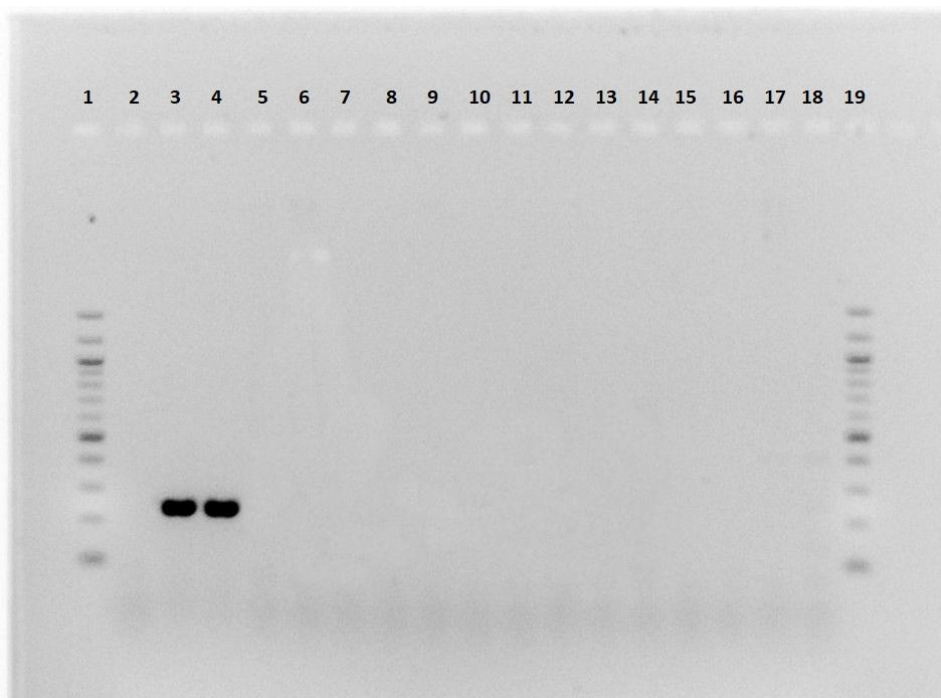
Izolace pomocí komerčně dostupného kitu poskytovala velice rychlou metodu pro izolaci DNA z bakterií. DNA byla izolována v dostatečné kvalitě, ale o velice nízké koncentraci. Koncentrace se pohybovala v rozmezí 50 až 60 ng/μl. Kvůli potřebě dlouhodobějšího skladování byla vhodná pouze pro potřeby analýzy pomocí PCR nikoliv však pro metodu LAMP.

Izolace podle izolačního postupu č. 2 byla oproti izolaci pomocí kitu zdlouhavější a pracnější, avšak poskytovala mnohem kvalitnější izolovanou DNA, zejména díky tradičnímu způsobu izolace pomocí fenolu a chloroformu a díky látce CTAB. Koncentrace izolované DNA se pohybovala v rozmezí od 900 do 5000 ng/μl a čistota byla také optimální. DNA izolovaná touto metodou byla vhodná jak pro PCR tak pro LAMP analýzy. Zároveň bylo možné dlouhodobě DNA skladovat, aniž by ztratila svou čistotu a koncentraci. Tato metoda je však určena pouze pro izolaci gram negativních bakterií, a proto pro izolaci gram pozitivních bakterií musel být použit ještě 3. izolační postup (Wilson, 2001). Třetí izolační postup byl založen na stejném principu. Na rozdíl od postupu č. 2 zde byl mnohem delší proces lyze buněk, díky kterému bylo možné kvalitně izolovat DNA i z gram pozitivních bakterií. Výtěžek a čistota DNA byl stejný jako u předchozího postupu. Stejně tak byl vhodný jak pro PCR tak pro LAMP analýzu. Postup byl však velice zdouhavý a náročný, a proto byl použit pouze pro gram pozitivní bakterie, které nebylo možné izolovat pomocí postupu číslo 2. Pro LAMP analýzu je však nejvhodnější čerstvě izolovaná DNA bez jakéhokoliv skladování, jak ukazovaly průběžné výsledky. Postupů izolace DNA použitelné pro LAMP analýzu bylo už dříve testováno několik. Například pro fytopatogenní bakterie je možné použít Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Fitchburg, WI, USA) (Jenkins a kol., 2011; Kubota, 2015). Pro izolaci DNA fytopatogenních bakterií přímo z rostlinného pletiva použitelnou pro metodu LAMP lze využít například QuickPick SML Plant DNA kits (Bio-Nobile) (Lenarčíč, 2014). Pro bakterie rodu *Pseudomonas*, který obsahuje také fytopatogenní zástupce lze použít Maxwell 16-cell DNA purification kit (Promega, Madison, WI, United States) (Takano a kol., 2019). Pro fytopatogenní bakterii *Erwinia amylovora* lze využít také Biosprint 96 Plant Kit (Qiagen AG, Hilden, Germany) (Bühlmann a kol., 2013).

5.4 PCR

Výsledkem PCR testování F3 a B3 primeru je fragment dlouhý 244 bp, Výsledná délka fragmentu odpovídá délce fragmentu, který by měli primery F3 a B3 amplifikovat. Amplifikace DNA proběhla pouze u vzorků, ve kterých se nacházela DNA pocházející z *Ralstonia solanacearum*. U DNA izolované z ostatních testovaných bakterií amplifikace neproběhla. Je tedy potvrzeno, že F3 a B3 primery se vážou pouze na specifické sekvence *Ralstonia solanacearum*. Takto ověřené primery mohou být dále využívány s ostatními LAMP primery pro tuto metodu nebo samostatně pro detekci pomocí PCR. PCR je další možnou a hojně využívanou metodou detekce toho patogena. Nejvíce využívány jsou hlavně modifikace PCR jako multiplex nebo qPCR. Tyto metody jsou také využívány stejně jako metody založené na amplifikaci RNA k detekci a rozlišování různých druhů fylogentypů *Ralstonia solanacearum* (Weller, 2000; Cellier, 2015; Bentsink, 2002; Stulberg, 2015, 2016). Další metoda pro detekci může být založena na sekvenování genu 16S-rRNA v kombinaci s PCR (Seal, 1993). Další možnost detekce nabízejí sérologické techniky založené na použití protilátek (Griep, 1998).

Obr. 14: Výsledek PCR s F3 a B3 primery



Pořadí v zorků odpovídá pořadí v Tab. 6

Tab. 6: Pořadí vzorků v jamkách gelu

Jamka	Vzorek	Sbírka	Číslo sbírky
1	Molekulární standard (ladder)	-	-
2	Negativní kontrola	-	-
3	<i>Ralstonia solanacearum</i>	LMG	2306
4	<i>Ralstonia solanacearum</i>	LMG	17140
5	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CRI	7096
6	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CCM	4073
7	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	CCM	9052
8	<i>Erwinia amylovora</i>	CCM	1133
9	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	CRI	8120
10	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	CRI	909/00
11	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	CRI	1835/98
12	<i>Erwinia herbicola</i>		2
13	<i>Xanthomonas gardneri</i>	DSMZ	19127
14	<i>Burkholderia glumae</i>	LMG	10906
15	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CRI	8113
16	<i>Xanthomonas arboricola</i>	CCM	899
17	<i>Xanthomonas perforans</i>	DSMZ	18975
18	<i>Clavibacter michiganensis</i> susp. <i>michiganensis</i>	CRI	1033
19	Molekulární standard (ladder)	-	-

5.5 Loop-mediated isothermal amplification

5.5.1 LAMP gradient

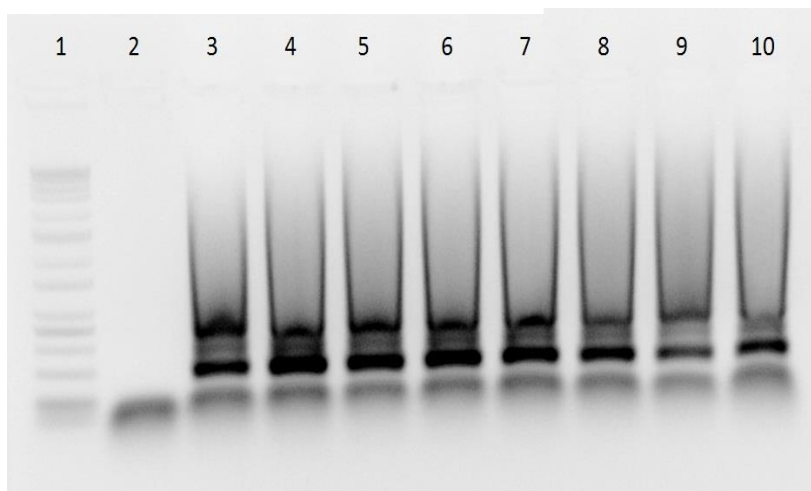
Pro správné fungování metody bylo nezbytné provést gradient optimálního času a teploty, aby amplifikace DNA byla co nejintenzivnější (Obr. 15 – 17). Optimální teplotní rozpětí po *Bst* polymerázu, která byla použita je 60 – 65 °C (Dhama a kol., 2014), a proto byly teploty gradientu v tomto rozpětí (Tab. 7). Časovým gradientem bylo zjišťováno, po jak dlouhé době je amplifikace nejintenzivnější a také jaký je limitní čas, kdy lze amplifikaci ještě provést a následně dobře vizualizovat, což může vést k rychlejší detekci patogenu (Bühlmann a kol., 2013; Parida, 2008). Jak je patrné z výsledků, nejvhodnější se zdá teplota, kterou reprezentuje vzorek číslo 5, tedy

62,8 °C a to ve všech časech amplifikace. Co se týče času, po který reakce probíhala, nejintenzivnější amplifikaci lze vidět u Obr. 15, který reprezentuje reakci probíhající po dobu 60 minut. Avšak rozdíly mezi jednotlivými teplotami a časy reakce nejsou příliš markantní a je možné je dobře vizualizovat pomocí gelové elektroforézy, a proto lze říci, že mohou být pro reakci použity všechny hodnoty provedené v rámci testování gradientu.

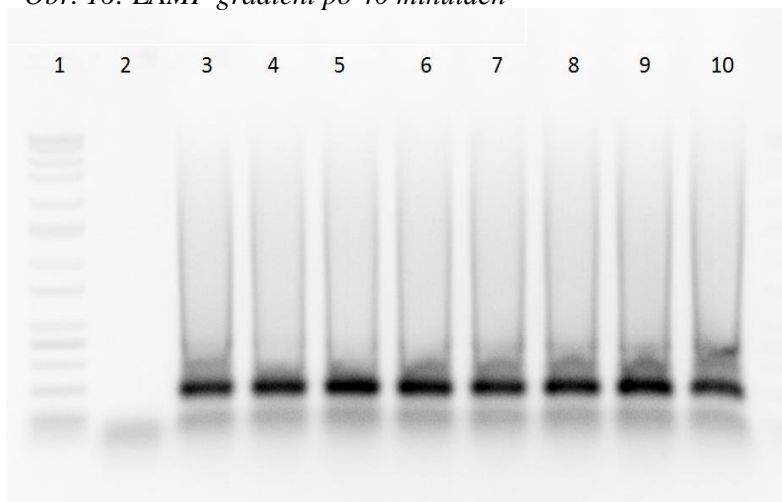
Tab. 7: Pozice vzorků v jamkách gelu

Jamka	Vzorek	Teplota
1	Molekulární standard (ladder)	---
2	Negativní kontrola	60,0 °C
3	<i>Ralstonia solanacearum</i>	60,0 °C
4	<i>Ralstonia solanacearum</i>	60,3 °C
5	<i>Ralstonia solanacearum</i>	62,8 °C
6	<i>Ralstonia solanacearum</i>	63,5 °C
7	<i>Ralstonia solanacearum</i>	64,1 °C
8	<i>Ralstonia solanacearum</i>	64,6 °C
9	<i>Ralstonia solanacearum</i>	64,8 °C
10	<i>Ralstonia solanacearum</i>	65,0 °C

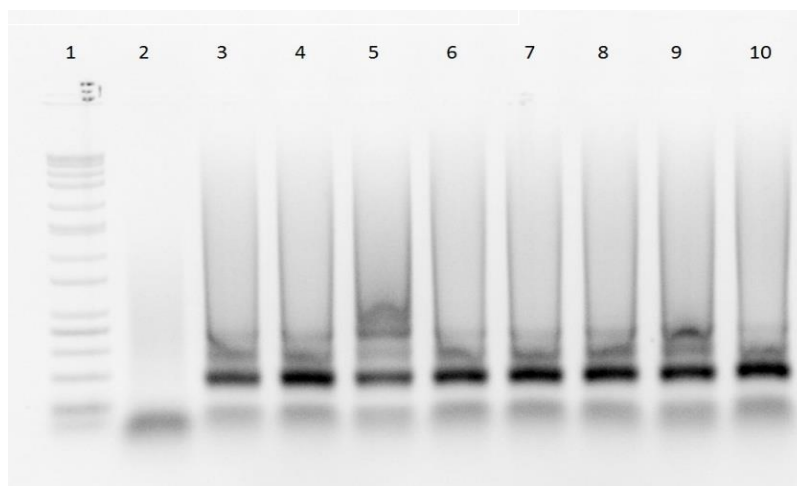
Obr. 15: LAMP gradient po 60 minutách



Obr. 16: LAMP gradient po 40 minutách



Obr. 17: LAMP gradient po 20 minutách



Pořadí vzorků odpovídá pořadí v Tab. 7

5.5.2 LAMP specifita

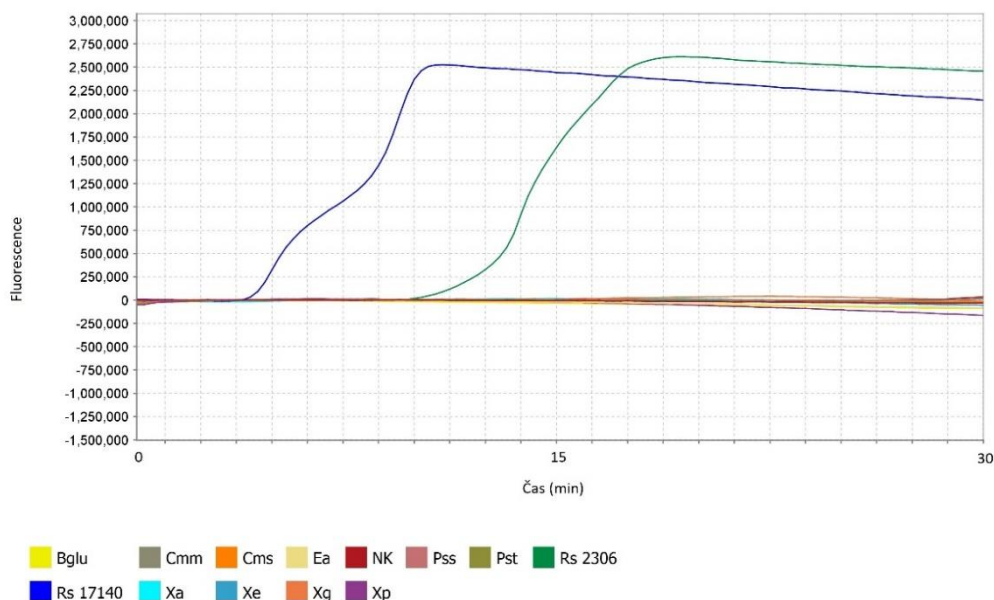
Cílem testování specifity LAMP metody bylo zjistit, zda je možné amplifikovat pouze cílové sekvence genu *fliC*, které jsou specifické pouze pro bakterii *Ralstonia solanacearum*. Metoda byla provedena ve dvou variantách a to ve formě real-time LAMP (Graf. 1) a s vizualizací pomocí gelové elektroforézy (Obr. 18). I když byly stanoveny optimální podmínky pro metodu prostřednictvím gradientu, kvůli nedostatečné specifitě bylo zapotřebí reakci mírně upravit. Zejména koncentrací $MgCl_2$ 5 mM a Betain 4 mM, zvýšením teploty na 65 °C a provádět amplifikaci pouze po dobu 20-30 minut. Tímto byla zajištěna vysoká specifita reakce. Graf č.: 1 zaznamenává průběh reakce v reálném čase a lze na něm pozorovat nárůst fluorescence pouze u vzorků, kde byla přítomná DNA z *Ralstonia solanacearum*. U ostatních vzorků nebyl zaznamenán nárůst fluorescence, tedy amplifikace neproběhla. Na Obr. 18 lze vidět, že amplifikace proběhla také pouze u vzorků obsahující DNA z *Ralstonia solanacearum*, tím bylo prokázáno, že reakce amplifikuje specificky pouze DNA *Ralstonia solanacearum* a ostatních bakterií nikoliv. Metodu tedy lze využít pro specifickou detekci *Ralstonia solanacearum*. Jelikož při nanášení amplifikované DNA na gel hrozí riziko kontaminace, je výhodnější metodu provádět v podobě real-time LAMP. To skýtá i další výhody, například možnost provedení přímo v terénu pomocí mobilních přístrojů od firem Diagenetix Inc. a OptiGene. Tento fakt může pomoci v boji proti patogenu a tím zmírnit ekonomické ztráty, které působí, neboť včasná detekce a identifikace je v ochraně proti bakteriím zásadní (Kubota, 2011).

Pro detekci *Ralstonia solanacearum* byla metoda LAMP už dříve několikrát navržena a testována a to jako real-time LAMP (Kubota a kol., 2008; Lenarčič, 2014; Huang a kol., 2017) i jako real-time FRET-LAMP (Kubota, 2011). Dokonce byla navržena ve formě duplex real-time FRET-LAMP pro rozlišení jednotlivých fylogrup a sequevarů zároveň (Kubota, 2015). Metoda však ještě nebyla navržena tak, aby detekovala specificky pouze *Ralstonia solanacearum* a všechny ostatní patogeny pro rajče, papriku a brambor testované v této práci nikoliv. Jako další metody a možnosti detekce *Ralstonia solanacearum* mohou být použity již výše zmíněné formy PCR metody, nebo metody založené na rozpoznávání SNP (single nucleotid polymorfism) pomocí restričních enzymů metodou RFLP v kombinaci s PCR (Poussier a Luisetti, 2000). Princip detekce založený na rozlišení pomocí SNP by v dnešní době bylo možné

využít s použitím nové varianty metody primer-activable LAMP (Du a kol., 2019). Což by mohlo rovněž poskytovat možnost rychlé a citlivé detekce.

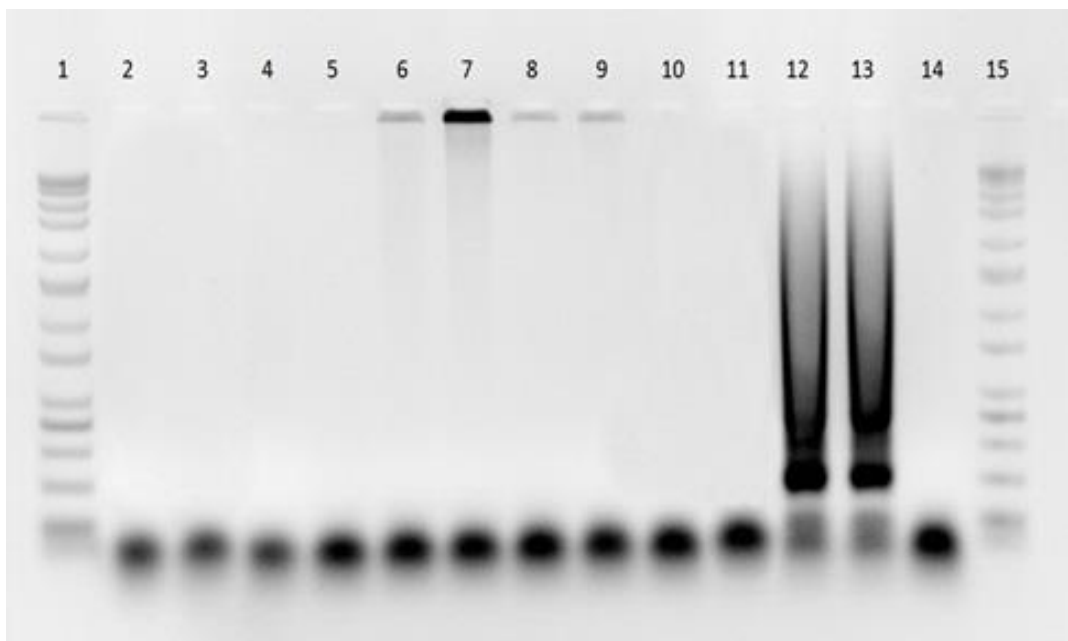
Metoda LAMP se už od počátku vývoje využívala pro detekci patogenů zejména v podobě komerčních kitů pro detekci bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* (Hara-Kudo, 2005; Song a kol., 2005). Dnes už metoda LAMP čím dál více přispívá k detekci patogenních mikroorganismů a je dostupná celá řada kitů jak pro humánní a veterinární medicínu (Wong a kol., 2018; Hu, 2018), tak pro rostlinné patogeny. Pomocí LAMP lze detekovat například *Clavibacter michigenesis* subsp. *michigenesis* patogenní pro rajče (Yasuhara-Bell a kol., 2013; Dobhal, 2019), *Xanthomonas euvesicatoria* způsobující velké ekonomické ztráty na rajčeti a paprice (Larrea-Sarmiento, 2018), *Erwinia amylovora* (Temple a kol., 2007), nebo, *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* způsobující bakteriální plíseň na rostlinách z čeledi *Araceae* (Jun-Hai a kol., 2015).

Graf č. 1: LAMP specifita



Bglu – *Bulghorderia glumae*, sbírka LMG, číslo sbírky 10906, *Cmm* – *Clavibacter michigeneis subps michigeneis* sbírka CRI, číslo sbírky 1033, *Cms* - *Clavibacter michigeneis subps. sepedonicus*, sbírka CRI, číslo sbírky 1835/98, *Ea* – *Erwinia amylovora*, sbírka CCM, číslo sbírky 1133, *NK* - negativní kontrola, *Pss* – *Pseudomonas syringae pv. syringae*, sbírka CCM, číslo sbírky 4073, *Pst* - *Pseudomonas syringae pv. tomato*, sbírka CRI, číslo sbírky 8120, *Rs 2306* - *Ralstonia solanacearum*, sbírka LMG, číslo sbírky 2306, *Rs 17140* – *Ralstonia solanacearum*, sbírka LMG, číslo sbírky 17140, *Xa* – *Xanthomonas arbuticola*, sbírka CCM, číslo sbírky 899, *Xe* – *Xanthomonas euvesicatoria*, sbírka BCCM/LMG, číslo sbírky 667, *Xg* – *Xanthomonas gardneri*, sbírka DSMZ, číslo sbírky 19127, *Xp* – *Xanthomonas perforance*, sbírka DSMZ, číslo sbírky 18975

Obr. 18: LAMP specifita

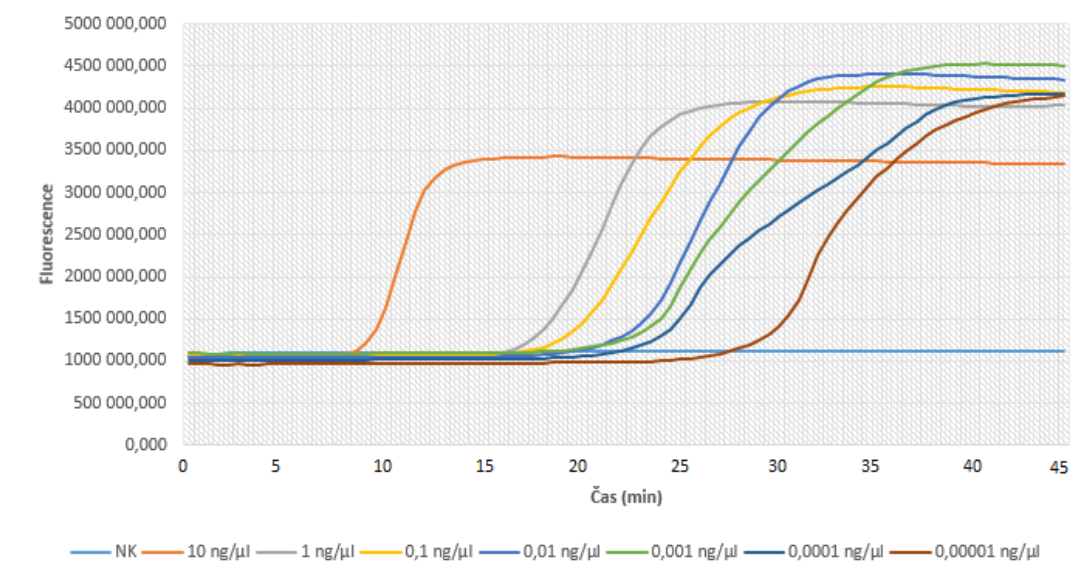


1 – Molekulární standard (ladder), 2 - *Xanthomonas vesicatoria*, sbírka CRI, číslo sbírky 9052, 3 - *Erwinia herbicola*, číslo sbírky 2, 4 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, sbírka CCM, číslo sbírky 9052, 5 - *Clavibacter michigensis* subps. *sepedonicus*, sbírka CRI, číslo sbírky 909/00, 6 – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, sbírka CRI, číslo sbírky 8113, 7 - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, sbírka CRI, číslo sbírky 8120, 8 – *Erwinia amylovora*, sbírka CCM, číslo sbírky 1133, 9 – *Burkholderia glumae*, sbírka MCCM/LMG, číslo sbírky 10906, 10 – *Xanthomonas gardneri*, sbírka DSMZ, číslo sbírky 19127, 11 - *Clavibacter michigensis* subps. *michigenesis*, sbírka CRI, číslo sbírky 1033, 12 – *Ralstonia solanacearum*, sbírka LMG, číslo sbírky 2306, 13 – *Ralstonia solanacearum*, sbírka LMG, číslo sbírky 17140, 14 – Negativní kontrola, 15 - Molekulární standard (ladder)

5.5.3 LAMP sensitivita

Z výsledku je patrné, že metodou LAMP lze detekovat DNA ve vzorku o velmi nízké koncentraci (Graf 2). U vzorku, který obsahoval DNA o koncentraci 10 ng/μl který představoval v této analýze nejvyšší koncentraci, byl zaznamenán nárůst fluorescence již okolo 10. minuty. U vzorku s nejnižší koncentrací, tedy 0,00001 ng/μl byl zaznamenán nárůst fluorescence okolo 30 minut. Pro metodu lze tedy využít DNA v koncentraci do 0,00001 ng/μl, vhodnější je však vyšší koncentrace, neboť reakce probíhá rychleji a pro specifickou detekci je potřeba provádět amplifikaci od 20 do 30 minut. V porovnání s metodou PCR je LAMP více než 100x účinnější (Seki a kol., 2018; Cheaveau a kol., 2018). Tato skutečnost dává metodě LAMP výhodu zejména v případech, kde je třeba detekovat patogena z velice malého množství DNA izolované například z rostlinné tkáně (Wilisiani a kol., 2019)

Graf 2: LAMP sensitivita



6 Závěr

Podářilo se navrhnout sadu LAMP primerů specifických pro *Ralstonia solanacearum* na základě analýzy sekvence genu *fliC*. Sada byla použita pro metodu LAMP, která byla optimalizována tak, aby byla schopna detekovat pouze *Ralstonia solanacearum* a rozlišit ji od ostatních fytopatogenních bakterií, patogeních pro rajče brambor a papirku. Metodu lze provést i v reálném čase a optimální čas pro co nejspecifičtější detekci byl stanoven na 20-30 minut, kdy je metoda schopna amplifikovat i velice nízkou koncentraci DNA. Pomocí metody lze amplifikovat i DNA o koncentraci 0,00001 ng/μl, avšak pro použití specifické detekce je vhodnější koncentrace vyšší.

7 Seznam zkratek

BLAST – Basic Local Aliment Search Tool

bp – Pár komplementárních nukleotidových bazí (Base pair)

CTAB – Cetrimoniumbromid

DMSO – Dimethyl sulfoxid

DNA – Deoxy ribozomální nukleová kyselina (Deoxyribosomal nuclid acid)

dNTP's – Volné deoxynukletidit (Deoxynucleotids)

ds – Dvouvláknová (Double strand)

FRET – Fluorescence resonace energy transfer

LAMP – Loop-mediated isothermal amplification

NCBI – National Centrum for Biotechnology Information

NK – Negativní kontrola

PCR – Polymerázová řetězcová reakce (Polymerase chain reaction)

qPCR – Kvantitativní polymerázová řetězcová reakce (Quantitative polymerase chain reaction)

RFLP – Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism)

ss – Jednovláknová (Single strand)

T_m – Teplota tání (Temperature melting)

UV – Ultra fialové (Ultra violet)

8 Seznam literatury

ÁLVAREZ B., VASSE J., LE-COURTOIS V., TRIGALET-DÉMERY D., LÓPEZ M. M., TRIGALET A., 2008. Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology*. **98**(1), 59–68. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-98-1-0059

ARAUD-RAZOU I., VASSE J., MONTROZIER H., ETCHEBAR C., TRIGALET A., 1998. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. *European Journal of Plant Pathology*. **104**(8), 795–809. ISSN 1573-8469. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008690712318

BENTSINK L., LEONE G.O.M., VAN BECKHOVEN J.R.C.M., VAN SCHIJNDEL H.B., VAN GEMEN B., VAN DER WOLF J.M., 2002. Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato. *Journal of Applied Microbiology*. **93**(4), 647–655. ISSN 1364-5072, 1365-2672. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01725.x

BÜHLMANN A., POTHIER J.F., REZZONICO F., SMITS T.H.M., 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), 332–339. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2012.12.017

CAI T., LOU G., YANG J., XU D., MENG Z., 2008. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification: A new tool for HBV management. *Journal of Clinical Virology*. **41**(4), 270–276. ISSN 13866532. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcv.2007.11.025

CASTILLO J.A., GREENBERG J.T., 2007. Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**(4), 1225–1238. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01253-06

CELLIER G., REMENANT B., CHIROLEU F., LEFEUVRE P., PRIOR P., 2012. Phylogeny and population structure of Brown Rot and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Applied and Environmental Microbiology*. **78**(7), 2367–2375. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.06123-11

CELLIER G., MOREAU A., CHABIRAND A., HOSTACHY B., AILLOUD F., PRIOR P., 2015. A duplex PCR assay for the detection of *Ralstonia solanacearum* phylotype ii strains in *Musa* spp. *PLOS ONE*. **10**(3), e0122182. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0122182

COUPAT B., CHAUMEILLE-DOLE F., FALL S., PRIOR P., SIMONET P., NESME X., BERTOLLA F., 2008. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred: Natural

transformation in *R. solanacearum*. *FEMS Microbiology Ecology*. **66**(1), 14–24. ISSN 01686496, 15746941. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00552.x

COUPAT-GOUTALAND B., BERNILLON D., GUIDOT A., PRIOR P., NESME X., BERTOLLA F., 2011. *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **24**(4), 497–505. ISSN 0894-0282. Dostupné z: doi:10.1094/MPMI-09-10-0197

DHAMA K., KARTHIK K., CHAKRABORT 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), 151–166. ISSN 10288880. Dostupné z: doi:10.3923/pjbs.2014.151.166

DOBHAL S., LARREA-SARMIENTO A., ALVAREZ A.M., ARIF M., 2019. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for specific detection of all known subspecies of *Clavibacter michiganensis*. *Journal of Applied Microbiology*. **126**(2), 388–401. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.14128

DREIER J., 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*. **85**(4), 462. ISSN 0031949X. Dostupné z: doi:10.1094/Phyto-85-462

DU WF., GE JH., LI JJ., LI J., YU RQ., JIANG JH., 2019. Single-step, high-specificity detection of single nucleotide mutation by primer-activatable loop-mediated isothermal amplification (PA-LAMP). *Analytica Chimica Acta*. **1050**, 132–138. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2018.10.068

ELPHISTONE J.G., 2005. “The Current Bacterial Wilt Situation: A Global Overview. Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex,” American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul.

ELSAS van J.D., KASTELEIN P., DE VRIES P.M., VAN OVERBEEK L.S., 2001. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**(9), 842–854. ISSN 0008-4166, 1480-3275. Dostupné z: doi:10.1139/w01-084

EPPO., 2004. *Ralstonia solanacearum*: Diagnostic protocols. *EPPO Bulletin*. **34**(2), 173–178. ISSN 02508052. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2338.2004.00715.x

ESPOSITO N., OVCHINNIKOVA O.G., BARONE A., ZOINA A., HOLST O., EVIDENTE A., 2008. Host and non-host plant response to bacterial wilt in potato: role of the lipopolysaccharide isolated from *Ralstonia solanacearum* and molecular analysis of plant-pathogen interaction. *Chemistry & Biodiversity*. **5**(12), 2662–2675. ISSN 16121872, 16121880. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.200890220

FALL S., MERCIER A., BERTOLLA F., CALTEAU A., GUEGUEN L., PERRIÈRE G., VOGEL T.M., SIMONET P., 2007. Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a “spandrel” of DNA repair mechanisms. *PLOS ONE*. **2**(10), e1055. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0001055

- FANG X., LI J., CHEN Q., 2008. One new method of nucleic acid amplification — Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Virologica Sinica*. **23**(3), 167–172. ISSN 1995-820X. Dostupné z: doi:10.1007/s12250-008-2929-8
- FEGAN, M., PRIOR P., 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australasian Plant Pathology*. **35**(2), 93. ISSN 0815-3191. Dostupné z: doi:10.1071/AP05105
- GRIEP R.A., VAN TWISK C., VAN BECKHOVEN J.R.C.M., VAN DER WOLF J.M., SCHOTS A., 1998. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3. *Phytopathology*. **88**(8), 795–803. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO.1998.88.8.795
- GUIDOT A., ELBAZ M., CARRÈRE S., SIRI M.I., PIANZZOLA M.J., PRIOR P., BOUCHER C., 2009a. Specific genes from the potato Brown Rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology*. **99**(9), 1105–1112. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-99-9-1105
- GUIDOT A., PRIOR P., SCHOENFELD J., CARRERE S., GENIN S., BOUCHER C., 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology*. **189**(2), 377–387. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00999-06
- GUIDOT A., COUPAT B., FALL S., PRIOR P., BERTOLLA F., 2009b. Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *The ISME Journal*. **3**(5), 549–562. ISSN 1751-7362, 1751-7370. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2009.14
- HARA-KUDO Y., YOSHINO M., KOJIMA T., IKEDO M., 2005. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*. **253**(1), 155–161. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsle.2005.09.032
- HAWWA R., AIKENS J., TURNER R.J., SANTARSIERO B.D., MESECAR A.D., 2009. Structural basis for thermostability revealed through the identification and characterization of a highly thermostable phosphotriesterase like lactonase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **488**(2), 109–120. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2009.06.005
- HAYWARD A. C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*. **27**(2), 265–277. ISSN 00218847. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x
- HAYWARD A. C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*. **29**(1), 65–87. ISSN 0066-4286, 1545-2107. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.py.29.090191.000433
- HU L., MA L.M., ZHENG S., HE X., HAMMACK T.S., BROWN E.W., ZHANG G., 2018. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella ser.* Enteritidis from egg products. *Food Control*. **88**, 190–197. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2018.01.006

- HUANG W., ZHANG H., XU J., WANG S., KONG X., DING W., XU J. FENG J., 2017. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Ralstonia solanacearum* phylotype i mulberry strains in china. *Frontiers in Plant Science*. **8**, 76. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2017.00076
- CHEAVEAU J., NGUYEN H., CHOW B., MARASINGHE D., MOHON A.N., YUAN H., VIANA G., VAN SCHALKWYK D., CHURCH D., CHAN D., PILLAI D.R., 2018. Clinical validation of a commercial LAMP test for ruling out Malaria in returning travelers: A prospective diagnostic trial. *Open Forum Infectious Diseases*. **5**(11). Dostupné z: doi:10.1093/ofid/ofy260
- JANSE, J. D., VAN DEN BELD H. E., ELPHINSTONE J., SIMPKINS S., TJOUTAM-SIN N. N. A., VAN VAERENBERGH J., 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology*. **86**(2), 147–155. ISSN 1125-4653.
- JENKINS D.M., KUBOTA R., DONG J., LI Y., HIGASHIGUCHI D., 2011. Handheld device for real-time, quantitative, LAMP-based detection of *Salmonella enterica* using assimilating probes. *Biosensors and Bioelectronics* . **30**(1), 255–260. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2011.09.020
- JUN-HAI N., YUE-RONG G., JUN-MEI Y., QING-YUN L., GUANG-SUI Y., CUN W., YU R., 2015. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bacterial blight pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) in anthurium. *European Journal of Plant Pathology*. **142**(4), 801–813. ISSN 0929-1873, 1573-8469. Dostupné z: doi:10.1007/s10658-015-0653-4
- KAMACHI K., TOYOIZUMI-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), 1899–1902. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.44.5.1899-1902.2006
- KANG J. S., KIM A.-Y., HAN H. R., MOON Y. S., KOH Y. H., 2015. Development of two alternative Loop-mediated isothermal amplification tools for detecting pathogenic pine wood nematodes. *Forest Pathology*. **45**(2), 127–133. ISSN 14374781. Dostupné z: doi:10.1111/efp.12147
- KELMAN A., HARTMAN G., HAYWARD A.C., 1994. Bacterial Wilt - the Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum* - Introduction. Wallingford: C a B International. ISBN 978-0-85198-875-7.
- KEREMANE M.L., RAMADUGU C., RODRIGUEZ E., KUBOTA R., SHIBATA S., HALL D.G., ROOSE M.L., JENKINS D., LEE R.F., 2015. A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop Protection*. **68**, 41–48. ISSN 02612194. Dostupné z: doi:10.1016/j.cropro.2014.10.026

- 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**, 61–66. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2014.05.021
- KIM S. H., OLSON T. N., SCHAAD N. W., MOORMAN G. W., 2003. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, the causal agent of brown rot of potato, identified in *Geraniums* in Pennsylvania, Delaware, and Connecticut. *Plant Disease*. **87**(4), 450–450. ISSN 0191-2917. Dostupné z: doi:10.1094/PDIS.2003.87.4.450C
- KOUGUCHI Y., FUJIWARA T., TERAMOTO M., KURAMOTO M., 2010. Homogenous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolates. *Molecular and Cellular Probes*. **24**(4), 190–195. ISSN 08908508. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcp.2010.03.001
- 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), 81–100. ISSN 2330-0337. Dostupné z: doi:10.13031/2013.38509
- KUBOTA R., VINE B. G., ALVAREZ A. M., JENKINS D. M., 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*. **98**(9), 1045–1051. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-98-9-1045
- KUBOTA R., JENKINS D.M., 2015. Real-Time duplex applications of loop-mediated amplification (LAMP) by assimilating probes. *International Journal of Molecular Sciences*. **16**(3), 4786–4799. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms16034786
- KUMAR S., STECHER S.G. TAMURA K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. **33**(7), 1870–1874. ISSN 0737-4038, 1537-1719. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msw054
- LARREA-SARMIENTO A., DHAKAL U., BOLUK G., FATDAL L., ALVAREZ A., STRAYER-SCHERER A., PARET M., JONES J., JENKINS D., ARIF M., 2018. Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. *Scientific Reports*. **8**(1), 14298. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-32295-4
- LENARČIČ R., MORISSET D., PIRC M., LLOP P., RAVNIKAR M., DREO T., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLOS ONE*. **9**(4), e96027. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0096027
- LI Y., FAN P., ZHOU S., ZHANG L., 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial Pathogenesis*. **107**, 54–61. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2017.03.016

- LIU A., GUAN G., DU P., GOU H., LIU Z., LIU J., MA M., YANG J., LI Y., NIU Q., REN Q., BAI Q., YIN H., LUO J., 2012. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology International*. **61**(4), 658–663. ISSN 13835769. Dostupné z: doi:10.1016/j.parint.2012.07.004
- MANSFIELD J., GENIN S., MAGORI S., CITOVSKY V., SRIARIYANUM M., RONALD P., DOW M., VERDIER V., BEER S.V., MACHADO M., TOTH I., SALMOND G., FOSTER G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*. **13**(6), 614–629. ISSN 14646722. Dostupné z: doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
- MCGARVEY J.A., DENNY T.P., SCHELL M.A., 1999. Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and *eps I* production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology*. **89**(12), 1233–1239. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO.1999.89.12.1233
- MILLING A., MENG F., DENNY T.P., ALLEN C., 2009. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology*. **99**(10), 1127–1134. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-99-10-1127
- MORI Y., KITAO M., TOMITA N., NOTOMI T., 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **59**(2), 145–157. ISSN 0165022X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbbm.2003.12.005
- MORI Y., NAGAMINE K., TOMITA N., NOTOMI T., 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **289**(1), 150–154. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2001.5921
- NAGAMINE K., HASE T., NOTOMI T., 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. **16**(3), 223–229. ISSN 08908508. Dostupné z: doi:10.1006/mcpr.2002.0415
- NOTOMI T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. **28**(12), 63e–663. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/28.12.e63
- ORGAMBIDE G., MONTROZIER H., SERVIN P., ROUSSEL J., TRIGALET-DEMERY D., TRIGALET A., 1991. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(13), 8312–8321. ISSN 0021-9258.
- PAIVA J., CAVALLINI J., SILVA M., ALMEIDA M., ÂNGELA H., BERCHIERI JUNIOR A., 2009. Molecular differentiation of *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. **11**(4), 271–275. ISSN 1516-635X. Dostupné z: doi:10.1590/S1516-635X2009000400009

- PARIDA M., SANNARANGAIAH S., DASH P.K., RAO P.V.L., MORITA K., 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*. **18**(6), 407–421. ISSN 10529276, 10991654. Dostupné z: doi:10.1002/rmv.593
- POUSSIER S., LUISETTI J., 2000. Specific Detection of Biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by nested-PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology*. **106**(3), 255–265. ISSN 1573-8469. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008742609761
- PRIOR, P., FEGAN M., 2005. Recent developemens in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulturae*. (695), 127–136. ISSN 0567-7572, 2406-6168. Dostupné z: doi:10.17660/ActaHortic.2005.695.14
- REMENANT B., BABUJEE L., LAJUS A., MEDIGUE C., PRIOR P., ALLEN C., 2012. Sequencing of K60, type strain of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*. **194**(10), 2742–2743. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00249-12
- REMENANT B., COUPAT-GOUTALAND B., GUIDOT A., CELLIER G., WICKER E., ALLEN C., FEGAN M., PRUVOST O., ELBAZ M., CALTEAU A., SALVIGNOL G., MORNICO D., MANGENOT S., BARBE V., MÉDIGUE C., PRIOR P., 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*. **11**(1), 379. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-11-379
- REMENANT B, DE CAMBIAIRE J.C., CELLIER G., JACOBS J.M., MANGENOT S., BARBE V., LAJUS A., VALLENET D., MEDIGUE C., FEGAN M., ALLEN C., PRIOR P., 2011. *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PLOS ONE*. **6**(9), e24356. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0024356
- SEAL S.E., JACKSON L.A., YOUNG J.P.W., DANIELS M.J, 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology*. **139**(7), 1587–1594. ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-139-7-1587
- SEKI M., KILGORE P.E., KIM E.J., OHNISHI M., HAYAKAWA S., KIM D.W., 2018. Loop-mediated isothermal amplification methods for diagnosis of bacterial Meningitis. *Frontiers in Pediatrics*. **6**, 57. ISSN 2296-2360. Dostupné z: doi:10.3389/fped.2018.00057
- SCHONFELD J., HEUER H., VAN ELSAS J.D., SMALLA K., 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(12), 7248–7256. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.69.12.7248-7256.2003

SMITH E.F., 1896. A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato. U.S. Dept. Agric. Div. Veg. Phys. Path. Bull. **12**, 1-26.

SONG T., TOMA C., NAKASONE N., IWANAGA M., 2005. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiology Letters*. **243**(1), 259–263. ISSN 03781097, 15746968. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsle.2004.12.014

STULBERG M.J., HUANG Q., 2015. A TaqMan-based multiplex qPCR assay and DNA extraction method for phylotype IIB Sequevars 1&2 (Select Agent) strains of *Ralstonia solanacearum*. *PLOS ONE*. **10**(10), e0139637. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0139637

STULBERG M.J., RASCOE J., LI W., YAN Z., NAKHLA M.K., HUANG Q., 2016. Development and comparison of TaqMan-based real-time PCR assays for detection and differentiation of *Ralstonia solanacearum* strains. *Current Microbiology*. **73**(4), 542–549. ISSN 0343-8651, 1432-0991. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-016-1091-z

SWANSON J.K., MONTES L., MEJIA L., ALLEN C., 2007. Detection of latent infections of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 in *Geranium*. *Plant Disease*. **91**(7), 828–834. ISSN 0191-2917. Dostupné z: doi:10.1094/PDIS-91-7-0828

SWANSON J.K., YAO J., TANS-KERSTEN J., ALLEN C., 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of *Geranium*. *Phytopathology*. **95**(2), 136–143. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-95-0136

TAKANO C., SEKI M., KIM D.W., GARDNER H., MCLAUGHLIN R.E., KILGORE P.E., KUMASAKA K., HAYAKAWA S., 2019. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification method to detect Guiana Extended-Spectrum (GES) β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. **10**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00025

TANNER N.A., EVANS T.C., 2014. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids: LAMP for detection of nucleic acids. In: Frederick M. AUSUBEL, Roger BRENT, Robert E. KINGSTON, David D. MOORE, J.G. SEIDMAN, John A. SMITH a Kevin STRUHL, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., s. 15.14.1-15.14.14. ISBN 978-0-471-14272-0. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb1514s105

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). In: K. B. JOHNSON a V. O. STOCKWELL, ed. *Proceedings of the Eleventh International Workshop on Fire Blight*. Leuven 1: International Society Horticultural Science, s. 497–503. ISBN 978-90-6605-511-7.

TOMLINSON J.A., DICKINSON M.J., BOONHAM N., 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification: *Botrytis cinerea* detection by LAMP. *Letters in Applied Microbiology*. **51**(6), 650–657. ISSN 02668254. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02949.x

- TOMLINSON J.A., OSTOJA-STARZEWSKA S., ADAMS I.P., MIANO D.W., ABIDRABO P., KINYUA Z., ALICAI T., DICKINSON M.J., PETERS D., BOONHAM N., SMITH J., 2013. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of the causal agents of cassava brown streak disease. *Journal of Virological Methods*. **191**(2), 148–154. ISSN 01660934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2012.07.015
- VAN VAERENBERGH J., BAEYEN S., DE VOS P., MAES M., 2012. Sequence diversity in the *dickeya fliC* gene: Phylogeny of the *dickeya* genus and TaqMan® PCR for „*D. solani*“, new biovar 3 Variant on Potato in Europe. *PLOS ONE*. **7**(5), e35738. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0035738
- WALLIS F.M., TRUTER S.J., 1978. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiological Plant Pathology*. **13**(3), 307–317. ISSN 00484059. Dostupné z: doi:10.1016/0048-4059(78)90047-4
- WANG L., ROTHEMUND D., CURD H., REEVES P. R., 2003. Species-wide variation in the *Escherichia coli* Flagellin (h-antigen) gene. *Journal of Bacteriology*. **185**(9), 2936–2943. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.185.9.2936-2943.2003
- WELLER S.A., ELPHINSTONE J.G., SMITH N.C., BOONHAM N., STEAD D.E., 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(7), 2853–2858. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000
- WILIAM S., FEIL H., COPELAND, A. (2012). Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. *Sigma*, 50, 6876.
- WILISIANI F., TOMIYAMA A., KATOH H., HARTONO S., NERIYA Y., NISHIGAWA H., NATSUAKI T., 2019. Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *Journal of Virological Methods*. **265**, 71–76. ISSN 0166-0934. Dostupné z: doi:10.1016/j.jviromet.2018.10.005
- WILSON K., 2001. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*. **56**(1), 2.4.1-2.4.5. ISSN 19343639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb0204s56
- WINSTANLEY C., HALES B.A., MORGAN J.A.W., GALLAGHER M.J., PUTHUCHEARY S.D., Cisse M.F., HART C.A., 1999. Analysis of *fliC* variation among clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Journal of Medical Microbiology*. **48**(7), 657–662. ISSN 0022-2615, 1473-5644. Dostupné z: doi:10.1099/00222615-48-7-657
- WONG Y.P., OTHMAN S., LAU Y.L., RADU S., CHEE H.Y., 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*. **124**(3), 626–643. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13647

WU A.M., WU J.H., SINGH T., SINGHA B., SUDAKEVITZ D., GILBOA-GARBER N., 2009. Multivalent human blood group ABH and Lewis glycotopes are key recognition factors for a IFuc>Man binding lectin from phytopathogenic *Ralstonia solanacearum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1790**(4), 249–259. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2009.02.006

YABUUCHIE., KOSAKO Y., YANO I., HOTTA H., NISHIUCHI Y., 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutro*. *Microbiology and Immunology*. **39**(11), 897–904. ISSN 03855600. Dostupné z: doi:10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x

YASUHARA-BELL J., KUBOTA R., JENKINS D.M., ALVAREZ A.M., 2013. Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *micA* gene is highly specific. *Phytopathology*. **103**(12), 1220–1226. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-03-13-0078-R

YI J., 2006. Molecular Zipper: a fluorescent probe for real-time isothermal DNA amplification. *Nucleic Acids Research*. **34**(11), e81–e81. ISSN 0305-1048, 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkl261

ZHANG X., LOWE S.B., GOODING J.J., 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*. **61**, 491–499. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2014.05.039

Vydané publikace související s touto prací

STRNAD A., STEHLÍKOVÁ D., BERAN P., ČURN V., 2018. Návrh a optimalizace primerů pro detekci *Ralstonia solanacearum* metodou loop-mediated isothermal amplification *Úroda*. 12, roč. LXVI 2018, vědecká příloha, 243 – 246. ISSN 0139-6013