

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Linda-Marie Kimmel

**Fenoolsed ühendid kui fütopatogeeni *Pectobacterium wasabiae*
voogamist kontrollivad signaalmolekulid**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad PhD Andres Mäe
bioloogiakandidaat Tiina Alamäe

TARTU 2016

Fenoolsed ühendid kui fütopatogeeni *Pectobacterium wasabiae* voogamist kontrollivad signaalmolekulid

Taimepatogeenide levimise piiramiseks on oluline mõista nende liikumist taimes. Selleks kasutatakse meie uurimisgrupis mudelorganismina märgmädanikku põhjustavat *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 tüve. Selles bakalaurusetöös analüüsitakse nii metanooliga kartulimugulatest ekstraheeritud fenoolsete ühendite kui ka üksikute fenoolsete ühendite, nagu salitsüülhape ja klorogeenhape, mõju mudelorganismi voogamisele *in vitro*.

Märksõnad: *Pectobacterium wasabiae*, fütopatogeen, märgmädanik, salitsüülhape, voogamine

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

To better limit the spread of plant pathogens, it is important to understand their motility and moving in a plant. For this, our research group uses a modelorganism *Pectobacterium wasabiae* SCC3193, that causes soft rot. In this study we examine effects of phenolic compounds such as salicylic and chlorogenic acid on swarming of this modelorganism.

Key words: *Pectobacterium wasabiae*, phytopathogen, salicylic acid, soft rot, swarming

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Märkmädanikku põhjustavad bakterid	8
1.2. <i>Pectobacterium wasabie</i>	9
1.3. <i>Pectobacterium wasabie</i> virulentsusfaktorid	10
1.3.1. PCWDE	11
1.3.2. Nip valk	12
1.3.3. Füsioloogilised protsessid taimes	13
1.4. Virulentsusfaktorite regulatsioon	15
1.5. <i>Pectobacterium wasabie</i> ja liikuvus	17
1.5.1. Voogamine	17
1.5.2. Voogamise regulatsioon	19
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1. Töö eesmärgid	21
2.2. Materjalid ja meetodika	22
2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid	22
2.2.2. Söötmed ja kasvatamine	23
2.2.3. PCR ehk polümeraasiahelreaktsioon	23
2.2.4. DNA geelelektroforees	24
2.2.5. Kloneerimine	24
2.2.6. Sekveneerimine	24
2.2.7. Transformatsioon. Elektroporatsioon.	25
2.2.8. β -glükuronidaasi aktiivuse mõõtmine	26
2.2.9. Liikuvuse (voogamise) testimine	26
2.2.10. Fenoolsete ühendite eraldamine summaarsest ekstraktist	27
2.3. Tulemused ja arutelu	28
2.3.1. Kartulist ekstraheeritud fenoolsete ühendite mõju <i>P_w SCC3193</i> liikuvusele	28
2.3.2. Metanooliekstrakti mõju <i>P_w SCC3193</i> geenide <i>fliC</i> ja <i>flhDC</i> transkriptsioonile	31
2.3.3. Metanooliekstrakti fraktsioonide mõju <i>P_w SCC3193</i> -le	33

2.3.4. Klorogeenhappe ja salitsüülhappe mõju <i>Pw</i> SCC3193 kasvule	35
2.3.5. Klorogeenhappe ja salitsüülhappe mõju <i>Pw</i> SCC3913 viburigeenide transkriptsioonile	37
2.3.6. Järeldused.....	41
KOKKUVÕTE	42
TÄNUAVALDUSED.....	43
SUMMARY	44
KASUTATUD KIRJANDUS	45
LIHTLITSENTS.....	53

KASUTATUD LÜHENDID

AHL – N-atsüül-homoseriinlaktoon (ingl.k *N-acyl-homoserine lactone*)

Amp – ampitsiliin

Cel – tsellulaas

CGA – klorogeenhape (ingl.k *chlorogenic acid*)

Cm – klooramfenikool

Csr – süsiniku säilitamise regulaator (ingl.k *carbon storage regulator*)

DAMP – kahjustusega seotud molekulaarne muster (ingl.k *damagae-associated molecular pattern*)

ExpA/S (GacA/S) – globaalne regulaator

FerE – ferredoksiini sarnane valk

FlhDC – viburi geenide ekspressiooni kontrolliv regulaatorvalk

fliA – viburigeenide sigmafaktor

fliC – viburifilamenti moodustava valgu geen

FliL – viburi mootori valk

HBB - viburi konks ja basaalkoha (ingl.k *hook-basal-body*)

HR – hüpertundlik kaitsevastus (ing.k *hypersensitive response*)

HSL – homoseriin laktoon (ingl.k *homoserine lactone*)

KDG – 2-keto-3-deoksüglükonaat

KdgR – pektiini lagundamise ensüüme kontrolliv regulaatorvalk

LB – Lurian-Bertani sööde

LPS – lipopolüsahhariidid

LuxI/R – hulgatunnetuse signaalmolekulide süsteem

MUG – 4-metüülumbelliferüül- β -D-glükuroniid

Nip – nekroosi esilekutsuv valk (ingl.k *necrosis inducing protein*)

OD – optiline tihedus (ingl. k *optical density*)

Pa – *Pectobacterium atrosepticum*

PAMP – patogeeniga seotud molekulaarsed mustrid (ingl.k *pathogen-associated molecular patterns*)

PCWDE – taime rakuseina lagundavad ensüümid (ing.k. *plant cell wall degrading enzymes*)

Peh – endopolügalakturonaas

Pel – pektaatlüaas

PGA – polügalakturoonhape

Pme – pektiinmetüülesteraaas

Pnl – pektiinlüaas

Prt – proteaas

PTI – mustri vallandatud immuunsus (ingl.k *pattern-triggered immunity*).

Pw – *Pectobacterium wasabiae*

QS – hulgatunnetus (ingl.k *quorum sensing*)

Rcs – fosforüleerimise süsteem

RFU – suhteline fluorestsentsi ühik (ingl. k. *relative fluorescence unit*)

Rsm – sekundaarsete metaboliitide regulaator (ingl. k *regulator of secondary metabolites*)

SA – salitsüülhape (ingl.k *salicylic acid*)

SD – Shine-Dalgarno

SOB – Super Optimal Broth

T6SS – tüüp VI sekretsioonisüsteem (ingl.k *type 6 secretion system*)

SISSEJUHATUS

Kartulil on oluline koht inimese toidulaual. Kartulit kahjustavate patogeenide hulgas omavad olulist rolli märgmädanikku põhjustavad fütopatogeensed bakterid. Märgmädanikku tekitavatel bakteritel on lai peremeeste ring. Lisaks kartulile on need patogeenid võimelised nakatama näiteks maisi, tomatit, kaalikat, porgandit ja mangot. Sellesse patogeenide rühma kuulub *Pectobacterium wasabiae* (*Pw*), mis on laialt levinud ka meie kliimavöötmes. Igal aastal tekitab see taimepatogeen suurt majanduslikku kahju, muutes tonnide viisi juur- ja puuvilju müügi- ning söögikõlbmatuks.

Märgmädanikku põhjustavate fütopatogeensete bakterite oluliseks virulentsusfaktoriteks on taime rakuseina lagundavad ensüümid, mis põhjustavad taimekoe matsratsiooni, mis viib nakatunud taime hukkumiseni. Nende ensüümide hulka kuuluvad pektinaasid ja tsellulaasid, mis lagundavad taime rakuseinas olevat pektiini ja tselluloosi. Lisaks kuuluvad sellesse ensüümide kompleksi ka proteaasid, mille funktsiooniks on taimsete valkude lagundamine, et suruda maha taime kaitsemehhanismid.

Lisaks taime rakuseina lagundavatele ensüümidele, soodustab patogeenide levikut nakatunud taimedes ka liikuvus. Liikumine viburite abil võimaldab patogeenil kiiresti levida primaarsest nakatumiskohast üle kogu taime. Kui siiani arvati, et patogeeni liikumine taimetes toimub tänu ujumisele, mil iga patogeeni rakk liigub individuaalselt, siis praeguseks on selgunud, et sarnaselt inim- ja loomapatogeenidele kasutavad ka taimepatogeenid nn kollektiivset liikumist ehk voogamist.

Käesoleva töö kirjanduse osas antakse ülevaade nii *Pw* olulistest virulentsusfaktoritest kui ka regulatsiooni mehhanismidest, mis tagavad nende koordineeritud ekspressiooni. Põhiliselt keskendutakse liikuvuse rollile *Pw* virulentsuses. Töö eksperimentaalses osas kirjeldan, millised taimest tulevad signaalid mõjutavad patogeeni voogamist.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Märgmädanikku põhjustavad bakterid

Märgmädanik on taimehaigus, mida põhjustavad fütopatogeensed bakterid. Peremeestaime tungimiseks kasutavad taimepatogeensed bakterid nematoodide, putukate abi või mehaanilisel käsitlemisel tekitatud vigastusi (Pérombelon *et al.*, 1995) ning putukvektoreid (Nykyri *et al.*, 2014), lisaks võivad patogeened tungida peremeestaime ka õhulõhede kaudu (Pérombelon *et al.*, 1995). Pärast taime nakatamist indutseeritakse patogeenis taime rakuseina lagundavate ekstratsellulaarsete ensüümide (PCWDE, ingl.k. *plant cell wall degrading enzymes*) süntees, et lagundada taime rakuseina komponente, mille tulemusena vabanevad toitained, mida paljunev patogeeni populatsioon kasutab oma elutegevuseks (Toth *et al.*, 2003). Märgmädanik võib põhjustada märkimisväärseid saagikuse kadusid kasvuhooajal ja samamoodi ka hoiustamise ajal. (Davidsson *et al.*, 2013). Märgmädanikku tekitavate bakterite olulisemateks virulentsusfaktoriteks on rakuseina lagundavad ensüümid, lisaks soodustavad patogeeni levikut nakatunud taimekoos ka viburid, mis võimaldavad patogeenil liikuda primaarsest nakatumiskohast üle kogu taime. Paljud fütopatogeensed bakterid produtseerivad ka siderofoore, mis võimaldavad bakteritel omastada keskkonnast elutegevuseks vajalikku rauda (Pérombelon 2002).

Põhilisteks märgmädaniku tekitajateks on *Dickeya* ning *Pectobacterium* (varasem nimetus *Erwinia*) perekondadesse kuuluvad fütopatogeensed bakterid, kellest suurimat majanduslikku kahju tekitavad *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. wasabiae* ning *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *brasiliense*, *odoriferum* (Nykyri *et al.*, 2012).

1917. aastal kirjeldati esimest korda perekonda *Erwinia* kui kõiki *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluvaid taimehaigusi põhjustavaid patogeene, kuid pärast 16S rDNA järjestuste analüüsi otsustati perekond ümber nimetada (Hauben *et al.*, 1998; Toth *et al.*, 2003). Pektobaktereid leidub nii mullas, põhjavees kui ka taime pinnal (Pérombelon *et al.*, 1995). Neile on iseloomulik lai peremeestaime ring, kuhu kuuluvad näiteks kartul, porgand, pirn, õun, mais, tomat, kapsas, puuvill, mango jne. (Alfano *et al.*, 1996; Barnard *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007). Tänu võimele toota teistest taimekoos sattunud mikroorganismidest oluliselt suuremates kogustes taime rakuseina lagundavaid ensüüme, suudavad pektobakterid kiiresti tungida sügavale taimekoos, seal paljuneda ning põhjustada haigusi. Selle perekonna patogeened on võimelised nakatama nii elustaimi kui kasvama mullas oleval surnud taimekoos. Seega võivad patogeened säilida mullas ka peale saagi koristamist (Pérombelon, 2002).

1.2. *Pectobacterium wasabiae*

Pektobakterid on oportunistlikud patogeenid, tekitades taimedel haigusi siis, kui nende vastupanuvõime on nõrgenenud (Pérombelon, 2002). *Pectobacterium wasabiae* (*Pw*) on gramnegatiivne mittesporuleeruv peritrihaalsete viburitega nekrotroofne bakter, mis isoleeriti esimest korda Jaapani mädarõikast (*Wasabia japonica*) 1980-ndate lõpus (Goto *et al.*, 1987). Hiljem on seda bakterit isoleeritud veel väga paljudest taimedest, sealhulgas ka majandusliku tähtsusega juurviljadest. Tegemist on laialevikulise fakultatiivse aneroobiga, mis levib edukalt parasvöötmelises kliimavöötmes (Toth *et al.*, 2003). Patogeeni on leitud nii USA-s, Kanadas, Uus-Meremaal, Süürias, Iraanis, Lõuna-Aafrikas, Malaisias kui ka mitmel pool Euroopas märgmädanikuga nakatunud kartulitest (Pitman *et al.*, 2010; Golkhanden *et al.*, 2013; Waleron *et al.*, 2013). Patogeeni levikut soodustab nii lai peremeestering kui ka võime säilida väljaspool taime, näiteks mullas või ka lühiajaliselt transpordiks kasutataval taaral (Pérombelon, 2002).

Nagu eespool mainitud, põhjustab *Pw* nagu teisedki pektobakterid nakatunud taimedel (mugulate) märgmädanikku ja varrepõletikku (ingl. k *blackleg*). Haiguse teket ja patogeeni levikut nakatunud taimes soodustavad kõrge õhuniiskus, toitainete kättesaadavus ning madal hapnikusisaldus. Anaeroobne keskkond pärsib peremeestaime hapnikust sõltuva kaitsemehhanismi tööd ning taime rakuseina lignifikatsiooni. Lisaks suureneb nendes tingimustes rakumembraani permeaablus, mille tagajärjel hakkab raku sisu lekkima, ja taime apoplasti vabanevad taimerakus olevad komponendid, mida patogeen saab kasutada kui elutegevuseks vajalikke toitaineid. Tänu sellele suudab bakter tungida sügavamale taimekoosse, seal paljuneda ning lõpuks käivitada rakuseina lagundavate ensüümide sünteesi juba kõrgemal, nn indutseeritud tasemel (Pérombelon, 2002). Tulemuseks on limane, must ja märg mädane kahjustus, mis levib üle kogu taime (nakatunud kartulitaimel hõlmab see nii mugulat kui ka vart ja lehti) (Czajkowski *et al.*, 2011).

Pw optimaalseks kasvutemperatuuriks on 28 °C. Hiljuti isoleeriti loodusest ka *Pw* tüved, mis sarnaselt *P.carotovorum*'ile suudavad kasvada ka 37 °C juures (Nykyri *et al.*, 2012). Lisaks on *Pw* mõned omadused tõenäoliselt omandatud horisontaalse geeniülekanne kaudu. Nii on mõnede *Pw* tüvede genoomist leitud eukarüootset päritolu ferredoksiini sarnast FerE valku ning metüültransferaasi kodeerivaid gene (Nykyri *et al.*, 2012). *Pw* genoomis leiduvad ka spetsiifilised saared, kus asuvad geenid tüüp VI sekretsioonimehhanismi (T6SS) kodeerimiseks (Davidsson *et al.*, 2013). Kuna *Pw* geneetilised eriärasused (eukarüootsed geenid) ning võime kasvada 37 °C juures on avastatud alles hiljuti, on tõenäoline, et *Pw* isolaate on eeltoodud põhjustel varasemalt

määratud hoopis *P.carotovorum*'iks. Seetõttu on keeruline öelda, kas *Pw* on uus esilekerkiv patogeen või on selle bakteri sagedasem leidmine kartulis seotud DNA järjestusepõhiste meetodite täiustumisega. See lubab spekuloida, et *Pw* on ka varem osalenud märgmädaniku ja on tema roll selles suurem kui seni arvatud. (Nykyri *et al.*, 2012; Waleron *et al.*, 2013)

Üks olulisim *Pw* tüvi on 1988. aastal Soomes kartulist isoleeritud tüvi SCC3193 (Pirhonen *et al.*, 1988), mida on kasutatud mudeltüvena, et selgitada erinevate taimerakuseina lagundavate ensüümide rolli infektsiooni protsessis (Koskinen *et al.*, 2012). Lisaks on selles tüves ka põhjalikult uuritud reguloorset võrgustikku, mis tagab virulentsusfaktorite koordineeritud ekspressiooni nakatunud taimes (Nykyri *et al.*, 2012; Kõiv *et al.*, 2013).

1.3. *Pectobacterium wasabie* virulentsusfaktorid

Pektobakterid pole võimelised mullas väljaspool peremeestaime eluvõimelisena kaua säiluma. Ellujäämine sõltub mulla temperatuurist (eriti tundlik on patogeen suurte temperatuuride kõikumiste suhtes), niiskusest ja pH tasemest. Kui mullas leidub bakterile lagundamiseks sobivaid taimejäänuseid, võib *Pectobacterium* pidada vastu kauem kui pool aastat. Patogeen säilib latentses olekus ka kartulimugulates ja võib edukalt levida nakatunud seemnekartuli vahendusel. Nakatunud peremeestaimest vabaneb bakter põhjavette, kust saab levida ja nakatada uusi peremeestaimi. Patogeen koloniseerib tervete taimede juuri, tungib vaskulaarsesse süsteemi ja nakatab uusi mugulaid. (Czajkowski *et al.*, 2011)

Pärast patogeeni tungimist taime apoplasti (intratsellulaarsesse ruumi), võib ta hakata aktiivselt paljunema, kasutades seal olevaid toitaineid, või püsida seal uinavas olekus märkamatuks (Pérombelon, 2002). See aeg on piisavalt pikk, et patogeen saaks üle elada perioodi kahe taimekasvuhooaja vahel (Pérombelon, 1992). Toitainete lõppemise korral apoplastis tuleb aga ellujäämiseks ja paljunemiseks hakata lagundama taimekudet PCWDE abil (Pérombelon, 2002; Davidsson *et al.*, 2013). Latentsest nakkusest üleminek aktiivsesse infektsiooni toimub bakterile sobivatel keskkonnatingimustel: temperatuur peab olema patogeeni kasvuks optimaalne, hapniku kontsentratsioon madal (hüpoksia) ning vesi peab olema kättesaadav (Pérombelon *et al.*, 1995; Toth *et al.*, 2003). Kui on saavutatud piisavalt suur bakterirakkude tihedus, käivitatakse virulentsusfaktorite produktsioon (Pirhonen *et al.*, 1993; Davidsson *et al.*, 2013). Pektobakterite populatsioonis reguleerib virulentsusfaktorite produktsiooni hulgatunnetus (QS, ingl.k *quorum sensing*) (Liu *et al.*, 2008). Lisaks PCWDE sünteesile, kontrollib QS bakterites veel ekstratsellulaarsete polüsahhariidide produktsiooni, antibiootikumide, siderofooride,

pigmentide ning Hrp valgu sünteesi, Ti plasmiidi ülekannet, biofilmi moodustumist ja ka liikuvust (viburite sünteesi) (Bodman *et al.*, 2003).

QS-i käivitatud PCWDE tootmine vabastab taimerakuseina fragmente, mis võivad aktiveerida peremeesorganismi kaitsevastuseid. Selleks, et bakter võiks riskida peremehe poolse tuvastamisega, peab olema virulentsusfaktorite tootmiseks tema populatsioonitihedus piisavalt suur, et vajaduse korral alla suruda peremehe kaitsevastused (Liu *et al.*, 2008). PCDWE tootmine võib olla ka vastuseks toitainete kriitilisele vähenemisele kasvukeskkonnas, mis on tingitud bakteripopulatsiooni kasvust. Sel juhul vallandub PCWDE geenide transkriptsioon bakteripopulatsiooni suurenedes ning taimekoe lagundamisel vabaneb keskkonda kasvuks ja elutegevuseks vajalikke toitaineid. (Pöllumaa *et al.*, 2012)

1.3.1. PCWDE

Taime rakuseina üheks olulisemaks komponendiks on pektiin, mis on galakturoonhappe jääkidest koosnev polümeer. Sõltuvalt taimest on teatud osa galakturoonhappe jääkidest metüleeritud, mis muudab ta vastupidavaks pektiini lagundavate ensüümide toimele. Lisaks pektiinile kuulub taime rakuseina koostisesse ka tselluloos. Tselluloos on polümeer, milles glükoosi molekulid on omavahel seotud 1,4-glükosiidsidemetega. (Collmer *et al.*, 1986) Märkmädanik tekib taimekoe matsratsiooni tagajärjel, mida põhjustavad patogeeni poolt massiliselt produtseeritavad taime rakuseina lagundavad ensüümid. *Pw*-l kuuluvad PCWDE hulka pektinaasid, tsellulaasid (Cel) ja proteaasid (Prt). (Toth *et al.*, 2003) Nagu juba eespool mainitud, on need ensüümid vajalikud nii taime vastupanuvõime nõrgestamiseks kui ka taimerakust vajalike toitainete kättesaamiseks.

Pektiini lagundamises osaleb ensüümide kompleks (nn. pektinolüütilised ensüümid), mis lagundavad pektiini polümeeri väiksemateks fragmentideks. Vastavad ensüümid toimivad kas pektiinile, mis on polügalakturoonhappe (PGA) metüleeritud ahel, milles sõltuvalt taimest võib 80% jääkidest olla metüleeritud, ning pektaadile, mis on polügalakturoonhappe mittemetüleeritud ahel (Barras *et al.*, 1994; Agrios, 1997).

Pektinolüütiliste ensüümide hulka kuuluvad pektiinmetüülesterasaas (Pme), pektaatlüaas (Pel), pektiinlüaas (Pnl) ja polügalakturonaas (Peh) (Collmer *et al.*, 1986). Ensüümkompleksi toimel lagundatakse pektiin oligogalakturoniidideks, mida bakterid on võimelised transportima rakku ja kasutama nii süsiniku- kui ka energiaallikana (Nasser *et al.*, 1994). Kuid samas võivad teatud ahelapikkusega oligogalakturoniidid indutseerida ka taimedes kaitsevalkude sünteesi (Davidsson *et al.*, 2013). *Pw* tüvi SCC3193 sünteesib nelja

erinevat pektaatlüaasi: PelA, PelB, PelC ja PelD (Heikinheimo *et al.*, 1995) ning ühte polügalakturonaasi PehA (Flego *et al.*, 2000). Taime edukaks ründamiseks vajab patogeen kogu pektinolüütiliste ensüümide kompleksi, samas on aga näidatud, et ühe või mõne üksiku ensüümi puudumine ei mõjuta oluliselt tüve SCC3193 virulentsust (Heikinheimo *et al.*, 1995).

Olgugi, et tsellulaase ei peeta esmatähtsateks virulentsuse seisukohalt, on nad siiski vajalikud peremeestaime edukaks nakatamiseks (Toth *et al.*, 2003). Tüves SCC3139 genoomis on leitud kaks tsellulaasi geeni, CelV₁ ja CelS, millest ainult CelV₁ ekspresseerub, kui patogeen on tunginud taimekoesse (Saarilahti *et al.*, 1990; Mäe *et al.*, 1995).

Bakterite poolt sünteesitavad proteaasid lagundavad valkuseid aminohapeteks. Rakusisesed proteaasid lagundavad rakus olevaid vigaseid valke või valke, mida bakterid antud eluetapis ei vaja. Ekstratsellulaarsed valgud toimivad aga virulentsusfaktoritena, aidates kaasa peremeesraku ründamisele. Fütopatogeenseseset bakterites ei ole ekstratsellulaarsete proteaaside funktsioon virulentsusprotsessis täpselt selge, sest sageli ei erine Prt⁻ mutantide võime nakatada peremeestaimi algsest (Prt⁺) tüvest (Tang *et al.*, 1987). Tüves SCC3193 on iseloomustatud ühte ekstratsellulaarset proteaasi PrtW. Ilmselt mängib ka PrtW minoorset rolli tüve SCC3193 virulentsuses, sest vastava geeni inaktivatsioon ei vähenda patogeeni virulentsust (Marits *et al.*, 1999).

1.3.2. Nip valk

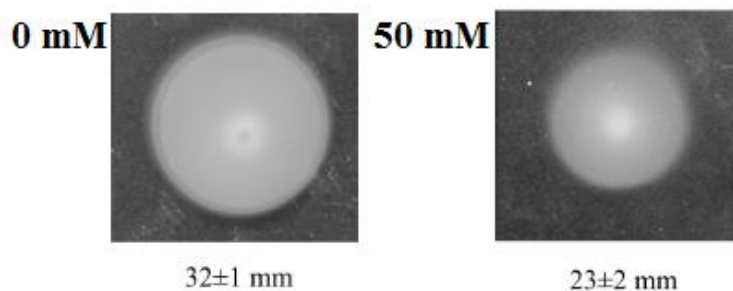
Nekrotoorsed bakterid, nagu seda on *Pw* ja *Pa* (*Pectobacterium atrosepticum*), kasutavad agressiivsemat nakatamise taktikat kui biotroorsed bakterid. Lisaks PCWDE kompleksile sünteesivad mõned eespool nimetatud bakteritüved taimekoe nekroosi põhjustavat valku – Nip (ingl.k *necrosis inducing protein*) (Mattinen *et al.*, 2004; Pemberton *et al.*, 2005). Nip valgu roll virulentsuses pole siiani lõplikult selge. Nii näitasid Pemberton jt, et *Pa* tüve SCRI1043 Nip negatiivse mutandi võime nakatada tubakataimi oli vähenenud võrreldes algse tüvega (Pemberton *et al.*, 2005). Lisaks näitasid Mattinen jt, et *nip* mutandil on vähenenud võime tekitada märgmädanikku kartuli mugulas, kuigi mutandi pektinaaside ja tsellulaaside produktsioon olid võrreldavad tüvega SCC3193 (Mattinen *et al.*, 2004). Bakteri poolt sünteesitud Nip valgu toimemehhanismist peremeestaimes teatakse siiani suhteliselt vähe. Tüves SCC3193 sünteesitud Nip valk transporditakse rakust välja läbi T2SS süsteemi (Laasik *et al.*, 2014). Peremeestaimes integreerub Nip valk taimeraku membraaniga, põhjustades sellega rakkude hukkumise (Ottmann *et al.*, 2009). Nip valgu ekspresseerumiseks on vajalik FlhDC (Laasik *et al.*, 2014).

1.3.3. Füsioloogilised protsessid taimes

Selleks, et bakter suudaks taime nakatada ja selles ka hiljem edukalt ellu jääda ning paljuneda, tuleb maha suruda taime immuunvastus. Kuigi taimedel puudub somaatilise kaasasündinud immuunvastus, on nad siiski võimelised end kaitsma. Taimed tunnevad sissetungija ära patogeeni seotud molekulaarsete mustrite järgi (PAMP, ingl.k *pathogen-associated molecular patterns*), mis kujutavad konserveerunud struktuure nagu näiteks bakteriaalne flagelliin, ning selle tagajärjel tekib taimes mustri vallandatud immuunsus (PTI, ingl.k *pattern-triggered immunity*). Taimed tunnetavad ohtu ka tänu kahjustustega seotud molekulaarsete mustrite (DAMP, ingl.k *damage-associated molecular patterns*) äratundmisele, mis indutseerivad peremehes PAMP indutseeritud kaitsevastustele sarnaseid mehhanisme. DAMP-ideks võivad olla taime rakuseina fragmendid, mis on vabanenud kas putuka närimise või nektrotroofi poolt sekreteeritud PCWDE-de tagajärjel. (Davidsson *et al.*, 2013)

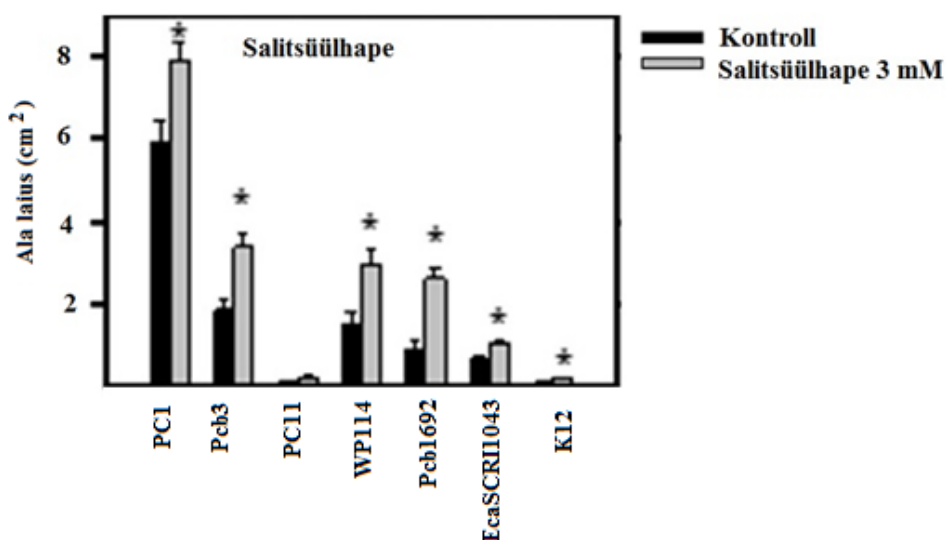
Taimede kaitsemehhanismide hulka kuuluvad ka keemilised struktuurid, mis käituvad kaitsebarjäärina sissetungivate bakterite vastu. Paljudes taimedes esineb fenoolseid ühendeid, millel on antimikroobne toime, kuid lisaks selle käitub osa neist ka signaalmolekulidena, mis indutseerivad taimes kaitsevastuse. Osad neist fenoolsetest ühenditest on taimes pidevalt olemas, teised moodustatakse taimes aktiivse kaitsemehhanismi osana, kui patogeen ründab taime. (Singhai *et al.*, 2011) Taimedes leiduvad fenoolsed ühendid on peamiselt kasulikud taimetele endale, kuid mõningad neist ühenditest tulevad ka kasuks taime nakatunud patogeenidele. *Agrobacterium tumefaciens*'i puhul on teada, et mõned taimses leiduvad ühendid indutseerivad selle bakteri virulentsuseks vajalike geenide ekspressiooni (Bolton *et al.*, 1986). Kartuli üheks iseloomulikuks ja põhiliseks fenoolseks ühendiks on klorogeenhape (CGA, ingl.k *chlorogenic acid*), mida leidub keskmiselt 16-18 µg grammi kartulikoore kohta ning millel on tugevalt antimikroobne toime (Singhai *et al.*, 2011). Klorogeenhapet hakatakse tootma ka siis, kui kartulimugulas tekib vigastustest põhjustatud stress. Klorogeenhape konverteeritakse ligniiniks ja suberiiniks haavaparanemise käigus (Torres-Conteras *et al.*, 2014). Veel üheks oluliseks fenoolseks ühendiks on salitsüülhape (SA, ingl.k *salicylic acid*), mis on taime fütohormoonina kaasasündinud immuunvastuse vahendajaks. Salitsüülhape reguleerib taimes nii normaalseid füsioloogilisi protsesse kui ka kaitsevalkude produktsiooni (Lagonenko *et al.*, 2013). On näidatud, et salitsüülhape mõjutab patogeeni elutegevust ja inhibeerib virulentsusfaktorite sünteesi. Salitsüülhape inhibeerib QS geenide ekspressiooni (Joshi *et al.*, 2016) biofilmi moodustumist, liikuvust

ning langetab AHL taset (Lagonenko *et al.*, 2013). Joonisel 1 on kujutatud salitsüülhappe inhibeerivat mõju liikuvusele (ujumine) selle kõrgel (50 mM) kontsentratsioonil.



Joonis 1. **Salitsüülhappe mõju *Pectobacterium carotovorum* liikuvusele.** Üleöö LB söötmes kasvatatud *Pectobacterium carotovorum* kultuurist inokuleeriti 10 µl rakususpensiooni pooltahkele 0,3% agarisisaldusega M9 minimaalsöötmele (süsinikuallikana 0,5% sahharoos), kuhu oli lisatud salitsüülhapet kontsentratsioonil 50 mM ning inkubeeriti 28 °C juures 48 h. Kontrolliks oli *P.carotovorum*'iga inokuleeritud M9 sööde, kuhu ei lisatud salitsüülhapet (0 mM). 50 mM kontsentratsioonil inhibeerib salitsüülhappe bakteri liikuvust (Lagonenko *et al.*, 2013).

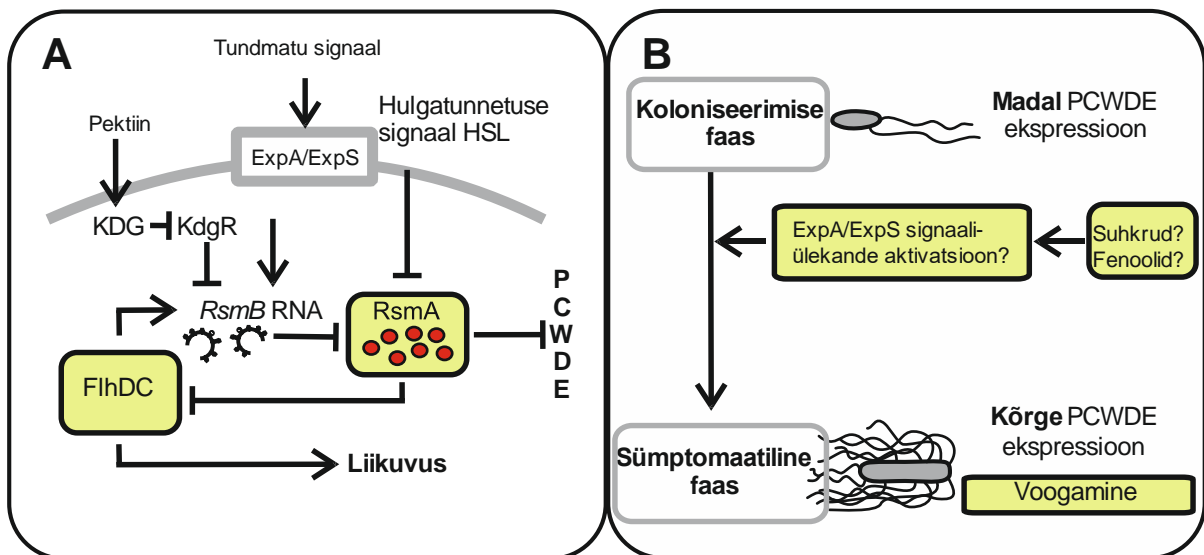
Samas on Joshi jt (Joshi *et al.*, 2015) näidanud salitsüülhappe liikuvust (ujumine) soodustavat toimet (joonis 2) *Pectobacterium carotovorum*'ile madalatel kontsentratsioonidel (ei inhibeeri bakteri kasvu rohkem kui 50%). Seega oleneb salitsüülhappe toime bakterile kontsentratsioonist.



Joonis 2. Salitsüülhappe mõju *Pectobacterium*'i liikide liikuvusele. Üleöö LB söötmes kasvatatud *Pectobacterium* liikide (*P. aroidearum* PC1; *P. carotovorum* PC11 ja WPP14; *P. brasiliensis* Pcb3 ja Pcb1692 ja *P. atrosepticum* EcaSCRI1043 ja *E. coli* K12. 200 µl kultuurile lisati salitsüülhapet, lõppkontsentratsiooniga 3 mM ning kasvatati 2 h. Salitsüülhappe juuresolekul kasvanud rakukultuur inokuleeriti pipetiotsaga pooltahkele 0,3% agarisisaldusega M9 minimaalsöötmele (süsinikuallikana 0,5% sahharoos). Kontrolliks olid M9 söötmele inokuleeritud rakukultuurid, millele ei lisatud salitsüülhapet. Inokuleeritud tase inkubeeriti 28 °C juures 24 h. Pärast inkubeerimist mõõdeti liikuvust liikumistsoonide laius järgi. Sellisel kontsentratsioonil (3 mM) indutseeris salitsüülhape bakteri liikuvust (Joshi *et al.*, 2015).

1.4. Virulentsusfaktorite regulatsioon

Pw virulentsusfaktorite regulatsioon toimub läbi keeruka regulatoorse kompleksi, mis peab tagama peremeestaimede efektiivse nakatamise ja aitama patogeenil maha suruda taime kaitsevastuse. Lisaks mitmetele keskkonnateguritele, mõjutavad virulentsusfaktorite tootmist hulgatunnetus ja erinevad kahekomponendilised süsteemid ning transkriptsiooni ja translatsiooni mõjutavad valgud (Joonis 3).



Joonis 3. Võimalikud sündmused, mis leiavad aset *Pectobacterium wasabiae*-s taime nakatamise ajal. (Kõiv *et al.*, 2013, modifitseeritud) A. Skemaatiline esitus *Pw* reguloorsest võrgustikust, kus on näidatud olulisemad regulaatorid, mis mõjutavad *Pw* liikuvust. ⊥ tähistab negatiivset regulatsiooni ning → positiivset regulatsiooni. B. Spekulatiivne joonis reguloorsetest sündmustest, mis käivitavad *Pw* infektsiooni ja patogeeni rakkude voogava liikumise.

Hulgatunnetust kirjeldati esimest korda *Vibrio fischeri*-l ja *Vibrio harveyi*-l (Nealson *et al.*, 1979). Selles süsteemis on olulised LuxI ja LuxR valk, millest esimene on vastutav signaalmolekulide sünteesi eest ning teine signaali vastuvõtmise ja äratundmise eest. Kõige levinumaks signaalmolekuliks ehk autoinduktoriks on N-atsüül-homoseriin laktoonid (AHL, ingl.k *N-acyl-homoserine lactones*) (Bodman *et al.*, 2003). *Pw* LuxI/R süsteemi homoloogiks on ExpI/ExpR1/ExpR2 süsteem (Pirhonen *et al.*, 1993; Põllumaa *et al.*, 2012). ExpR1 ja ExpR2 on regulaatorvalgud, mis AHL puudumisel seonduvad DNA-ga ning aktiveerivad *rsmA* transkriptsiooni. ExpR1 ja ExpR2 seonduvad aga AHL esinemisel sellega ning *rsmA* transkriptsiooni ei aktiveerita (Chatterjee *et al.*, 2010). Rsm süsteem koosneb RsmA valgust ja väikesest mittekodeerivast sRNA-st *rsmB*-st (Cui *et al.*, 2008). RsmA on võimeline moodustama kompleksi PCWDE geenide mRNA-dega (Põllumaa *et al.*, 2012). Seondues sihtmärk mRNA SD (Shine-Dalgarno) järjestusega, muudab RsmA mRNA ebastabiilseks ning kättesaadavaks RNAasidele (Cui *et al.*, 1995). *rsmB* reguleerib geeniekspressiooni, seondues RsmA valgule, vähendades nii selle aktiivsust kui ka negatiivset toimet (Cui *et al.*, 2008). RsmA (ingl.k *repressor of secondary metabolites*) on CsrA (ingl.k *carbon storage regulator*) homoloog ning seda leidub nii looma- kui ka taimepatogeenides. ExpI valku tootva geeni inaktiveerimine viib jällegi RsmA taseme

tõusuni (Kõiv *et al.*, 2013). Seega reguleerib ExpI/ExpR1/ExpR2 PCWDE tootmist ja liikuvust kaudselt läbi Rsm süsteemi (Sjobölm *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2010).

Lisaks hulगतunnetusele ja Rsm-süsteemile on nii *Pw*-s kui ka mitmetes teistes märgmädanikku tekitavates patogeenides kirjeldatud mitmeid kahekomponendilisi regulatsioonisüsteeme: ExpS/ExpA (Eriksson *et al.*, 1998), PehR/PehS (Flego *et al.*, 2000), PmrA/PmrB (Hyytiäinen *et al.*, 2003) ja Rcs (Andresen *et al.*, 2007). ExpS/ExpA on üks peamisi regulatsioonisüsteeme, mis on vajalik virulentsusgeenide aktiveerimiseks ja seega oluline ka *Pw* tüve SCC3193 patogeensuseks (Eriksson *et al.*, 1998; Hyytiäinen *et al.*, 2001). ExpS/ExpA regulatsiooni süsteem reguleerib virulentsusfaktorite sünteesi samuti läbi Rsm-süsteemi, mõjutades positiivselt regulatoorse *rsmB*-RNA sünteesi (Broberg *et al.*, 2013).

Virulentsusgeenide ekspressiooni *Pectobacterium*-ites kontrollib negatiivne transkriptsioonifaktor KdgR (Nasser *et al.*, 1994; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). KdgR mõjutab virulentsusgeenide ekspressiooni nii otse, seondudes vastavate geenide promootorpiirkonnaga ja takistades nende transkriptsiooni (Liu *et al.*, 1999) kui ka kaudselt läbi teiste süsteemide (Hyytiäinen *et al.*, 2001). Seega moodustavad *Pw* virulentsusfaktorite sünteesi kontrolliva regulatoorse võrgustiku hulगतunnetus, kahekomponendilised regulatsioonisüsteemid ja transkriptsiooni regulaator KdgR (joonis 3).

1.5. *Pectobacterium wasabie* ja liikuvus

Lisaks patogeenide nn primaarsetele virulentsusfaktoritele (toksiinid, lüütilised ensüümid jt), mis otseselt kahjustavad rünnatavaid peremeesorganismi rakke ja füsioloogilisi protsesse, on üheks oluliseks virulentsusfaktoriks ka patogeenide võime edukalt levida ning liikuda nakatunud organismis. Liikuvus aitab bakteritel paremini kätte saada toitaineid, vältida toksiine ja ebasoodsaid keskkondi, levida efektiivsemalt ning konkureerida teiste mikroorganismidega (Tans-Kersten *et al.*, 2001; Hossain *et al.*, 2005). Sageli pole liikumisvõimetud bakterid võimelised nakatama ega koloniseerima peremeesorganismi (Antúnez-Lamas *et al.*, 2009). Liikumine on oluliseks virulentsuse determinandiks nii looma- kui ka taimepatogeenidel (Matsumoto *et al.*, 2003).

1.5.1. Voogamine

Peamised viburist sõltuvad liikumistüübid on ujumine ja voogamine. Ujumine on bakteri individuaalne liikumine helikaalsete viburite abil vedelas keskkonnas (Alberti *et al.*, 1990; Partridge *et al.*, 2013). Voogamine on aga bakterite kollektiivne liikumine pöörleva viburi

abil üle viskoosete substraatide ja pooltahkete pindade, mis võivad olla voogamist indutseerivaks keskkonnasignaali (Copeland *et al.*, 2008; Patrick *et al.*, 2012). Bakterites, kes reguleerivad geeniekspressiooni vastuseks pinnamuutustele, pole õnnestunud välja selgitada universaalset pinnatunnetuse mehhanismi. Kuigi sensorsetes protsessides on vihjatud viburi mootori (FliL) ja raku ümbrise rollile, on ülekanderadade detailsed mehhanismid veel teadmata (Partridge *et al.*, 2013).

Voogajate hulka kuuluvad mitmed patogeensed ja mittepatogeensed bakterid, sealhulgas *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia* ja ka pektobakterid (Partridge *et al.*, 2013). Voogamiseks peavad rakud diferentseeruma. Rakkude diferentseerumist võib indutseerida kokkupuude tahke pinnaga (Rather, 2005). Suureneb oluliselt viburite arv raku pinnal ning moodustuvad lateraalsed viburid (Alberti *et al.*, 1990), rakud pikenevad ning moodustavad omavahel multirakseid parvi, et liikuda kollektiiviselt üle pinna (Inoue *et al.*, 2007). Osad bakterid, nagu näiteks *Aeromonas* sünteesivad voogamiseks tahkel söötmel spetsiaalseid lateraalseid Laf-vibureid (Belas *et al.*, 1986; Kirov *et al.*, 2002). Teised bakterid, nagu ka *Pw*, mitmekordistavad olemasolevate nn tavaliste, ujumiseks kasutatavate viburite arvu (Harshey *et al.*, 1994).

Voogamine erineb ujumisest mitme omaduse poolest. Selle kollektiivse liikumise käivitamiseks on kõigepealt vajalik keskkonna tunnetamine ja rakkude omavaheline suhtlemine (ingl.k *cell-cell interaction*). Paljud voogavad bakterid toodavad pindaktiivseid aineid, mis aitavad neil vähendada hõõrdumist ning pindpinevust ja muuta liikumist kergemaks. Isoleeritud üksikud voogavad rakud on liikumatud, mis näitab, et voogamiseks peavad rakud dünaamiliselt koonduma ning tegema kollektiivset koostööd. Ujumine seevastu on individuaalne liikumine. Kui inokuleerida vedelas söötmes kasvanud rakke voogamist soodustavale pinnale, ilmneb neil rakkudel voogamise viivitus (ingl.k *swarm lag*), mille käigus valmistavad ennast bakterid füsioloogiliselt ette voogamiseks (diferentseerumine) (Patrick *et al.*, 2012).

Voogav liikumine sõltub oluliselt viburist, mille abil saab bakter tunnetada teda ümbritsevat keskkonda ning tingimusi, mis soodustavad filamendi kokkupakkimist (Wang *et al.*, 2005; Copeland *et al.*, 2008). Viburi abil liikuval bakteritel on välja kujunenud keerukas süsteem viburivalkude sekretsiooniks ning nende kokku panemiseks, mis toimub rakus proksimaalsetest struktuuridest distaalseteni. Kuigi pektobakterite viburite sünteesi mehhanismi pole täielikult iseloomustatud ega kirjeldatud, on ulatuslikke uurimistöid läbi viidud bakteritel *Escherichia coli* ning *Salmonella*. Nendest tulemustest võib juhinduda

flagellaarse reguloni struktuursete ning reguloorsete omaduste ennustamisel ka pektobakterites (Chatterjee *et al.*, 2010).

E.coli ning *Salmonella* alamliikide viburi moodustamisel ja funktsionaliseerimisel osaleb 14 operoni ja üle 50 geeni, mille hulka kuuluvad struktuursete subühikute, reguloorsete valkude, mootorjõu generaatori ning kemosensoorsete valkude masinavärgi geenid. Nende geenide transkriptsioon on organiseeritud hierarhiliselt: klass I, klass II, klass III. (varajane, keskmine, hiline). Varajaste geenide hulka kuulub selle hierarhia tipus oleva flagellaarsete geenide ekspressiooni kontrolliv peamine reguloorne operon *flhDC*, mis kodeerib varajaste valkude hulka kuuluva tetrameerse DNA-d siduva proteiini FlhD₂C₂ subühikuid, mida kasutatakse keskmiste ja hiliste geenide transkriptsiooniks. (Karlinsey *et al.*, 2000; Aldridge *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2010). Keskmised geenid kodeerivad HBB (ingl.k *hook-basal body*) sünteesiks vajalikke valke ning samuti sigma-faktori *fliA* ja antisigma-faktori *flgM* reguloorseid geene. Hiliste geenide hulka kuuluvad geenid, mis kodeerivad viburi filamendivalke nagu näiteks FliC ja FlgM (Karlinsey *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2010). FliC on liikumiseks oluline, sest *fliC* mutandid on liikumatud ning võimetud voogama (Bowden *et al.*, 2013). Üheks voogamise signaali tajuva mehhanismi oluliseks komponendiks võib olla FliL – keskmise klassi flagellaarne operon, mis on võimeline seonduma staatoritega ning nii nende stabiilsust tõstma. FliL aitab staatorile seondudes viburi vardal vastu pidada voogamisel tekkivale suuremale tõukejõule. Arvatakse, et FliL sensoorne roll võib olla seotud mootori kiiruse jälgimisega või mõne teise pinnatajumise rajaga (Partridge *et al.*, 2013).

1.5.2. Voogamise regulatsioon

Edukaks taime nakatamiseks on *Pw* puhul oluline liikuvus, mille tagavad peritrihhaalselt paiknevad viburid. Vähenenud virulentsust on kirjeldatud nii täielikult liikumisvõimetutel kui ka osaliselt vähenenud liikumisvõimega *Pw* mutantidel, kusjuures PCWDE-de tootmine ei erine metsiktüvest (Pirhonen *et al.*, 1991).

Viburite kui ka PCWDE tootmine on FlhDC operoni kontrolli all (Cui *et al.*, 2008). Seega koordineeritakse *Pw* virulentsust mitte ainult taime rakuseina lagundavate ensüümide kompleksi sünteesiga, vaid ka viburite sünteesiga. FlhDC kontrollib 4 võtmeregulaatori – FliA, GacA, HexA ja RsmC ekspressiooni. HexA on LrhA homoloog, mis reguleerib negatiivselt FlhDC-d, AHL tootmist ning *rsmB* RNA-d. GacA reguleerib aga *rsmB*-d positiivselt. RsmC käitub kui anti-FlhDC faktor, mis seondub FlhDC-le ja moodustab viimasega inaktiivse kompleksi (Chatterjee *et al.*, 2009). FlhDC on negatiivselt reguleeritud ka RsmA poolt (Cui *et al.*, 2008). Praeguseks on selgunud, et FlhDC mõju

virulentsusgeenide ekspressioonile on kaudne ja toimub läbi Rsm-süsteemi, milles ta aktiveerib *rsmB* geeni ekspressiooni (Chatterjee *et al.*, 2010). Seega kontrollib FlhDC taimepatogeenides kahte protsessi – viburite ja virulentsusfaktorite sünteesi, mis mõlemad on patogeenile olulised peremeestaime nakatamisel (Chatterjee *et al.*, 2009; Andresen *et al.*, 2010; Chatterjee *et al.*, 2010).

Kaua arvati, et *Pw* levib primaarsest nakatumiskohast edasi individuaalselt, st ujudes. Hiljuti näitasid Kõiv jt, et *Pw* tüve SCC3193 rakkude inokuleerimisel kartulimugulale või pooltahkele agarile, millele oli lisatud kartuliekstrakti, toimub rakkude silmnähtav pikenemine ning lateraalsete viburite moodustumine. Rakkude pikenemiseks võib olla kolm põhjust. Esiteks on voogamine energiakulukas protsess ning energia kokkuhoiu mõttes surutakse alla rakkude jagunemine. Teiseks võib diferentseerumist soodustada peremehes toodetud antibiootikumidelaadsed ühendid, mis tekitavad bakterirakus stressi ning selle tulemuseks on filamentsed rakud. Kolmandaks teguriks võib olla kartulimugula komponent, mille tagajärjel ei teki stressi, vaid soodustub hoopiski liikumine peremehes (Kõiv *et al.*, 2013; Joonis 3).

Voogamist indutseerivad stiimulid ning mehhanismid on hetkel vähe mõistetud, kuigi teatakse, et signaal selleks tuleb keskkonnast. *Pw* puhul on näidatud, et erinevalt PCWDE-st ei indutseeri voogamist PGA, vaid kartulimugulast eraldatud ekstrakt. Antud tulemused tõstatavad küsimuse, milline kartuliekstrakti komponent paneb bakteri voogama.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie töögrupp uurib taimepatogeeni *Pw* virulentsusfaktoreid ja nende regulatsiooni. Kui taime rakuseina lagundavate ensüümide roll ja regulatsioon infektsiooni protsessis on siiani üsna põhjalikku käsitlemist leidnud, siis liikumise/voogava liikumise regulatsiooni tüves SCC3193 ei ole siiani uuritud. Sellest lähtuvalt on minu käesoleva bakalaaurusetöö eesmärkideks:

1. Uurida, kuidas taimedest (kartulimugulatest) ekstraheeritud fenoolsed ühendid mõjutavad tüve SCC3193 voogamist
2. Analüüsida kartulist ekstraheeritud summaarse fenoolsete ühendite preparaadi komponentide mõju voogamisele
3. Uurida, kas taimes olev signaalmolekul salitsüülhape ja antimikroobne ühend klorogeenhape mõjutavad voogamist

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüved	Iseloomustus	Allikas
<i>Pectobacterium wasabiae</i>		
SCC3193	Metsiktüvi	(Pirhonen <i>et al.</i> , 1988)
SCC3193 <i>rsmC</i>	<i>rsmC</i> ::Cm ^R	Meie labor (avaldamata)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE4</i> , <i>ΔlacU169</i> , (<i>lacZΔM15</i>), <i>hasdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA 96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
Plasmiidid		
pMW119:: <i>gusA</i>	Amp ^R , kloonimisvektor, mis sisaldab <i>HindIII</i> restriksioonisaidis ilma promootorita <i>gusA</i> geeni	(Marits <i>et al.</i> , 2002)
pMW119 <i>flhDC</i> :: <i>gusA</i>	<i>flhDC</i> promootorpiirkond kloonitud vektorisse pMW119:: <i>gusA</i>	(Andresen <i>et al.</i> , 2010)
pMW119 <i>fliC</i> :: <i>gusA</i>	Praimeritega <i>XbaI</i> ja <i>SmaI</i> amplifitseeritud <i>fliC</i> geen on kloonitud pMW119:: <i>gusA</i> vektorisse	Käesolev töö

Tabel 2. Kasutatud praimerid.

Praimeri nimi	Praimeri järjestus (5' → 3')
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT
GusMun	ACTGATCGTTAAACTGCCTGG

ASma_fliC (restriktsioonisait alla joonitud)	AGAC <u>CCCGGGT</u> TATATCGGCAACCGTAGTA
Xba_fliCZ (restriktsioonisait alla joonitud)	AGAT <u>CTAGAT</u> TTTGAGCTGTCAGAGACAG

2.2.2. Söötmed ja kasvatamine

Pectobacterium wasabiae tüvesid kasvatati temperatuuril 30 °C kas LB vedelsöötmes või M9 minimaalsöötmes, mis sisaldas süsinikuallikana 0,5% sahharoosi. *E.coli* rakke kasvatati temperatuuril 30 °C. Tardsöötmete valmistamisel lisati LB söötmele agarit (15 g/l) (Sambrook *et al.*, 2001). Vajadusel lisati söötmele 10% kartuliekstrakti (sort “Reet”), mis saadi purustatud kartulimugulate massi tsentrifuugimisel 15000g juures. Fenoolsete ühendite ekstraheerimiseks kasutati sama kartulisordi mugulaid. Toored kartulimugulad purustati ja saadud homogeenset massi kuivatati toatemperatuuril 24 h. Fenoolsete ühendite eraldamiseks ekstraheeriti kuivatatud kartulimassi 80% metanooliga (5 ml metanooli 1 g kartulimassi kohta) 24 h + 4 °C juures. Seejärel metanooliekstrakti kontsentreeriti 10 korda vaakumkontsentraatoris (Eppendorf Vacufuge Concentrator, Eppendorf, Saksamaa). Kontsentreeritud fenoolsete ühendite ekstrakti (edaspidi nimetatud kui metanooliekstrakt) lisati söötmetele vastavalt vajadustele. Vajadusel lisati söötmetele ka antibiootikume: ampitsilliin (Amp, 140 µg/ml), klooramfenikool (Cm, 20 µg/ml). Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti bakterikultuure loksutil.

2.2.3. PCR ehk polümeraasiahelreaktsioon

PCR-i matriitsina kasutati rakulüsaati. Rakkude lüüsimiseks lisati 25 µl-le steriilsele veele tikuotsaga rakke ning kuumutati 96 °C juures 10 minutit PCR-i masinas. Seejärel lüsaat tsentrifuugiti 10000 g juures (Eppendorf Centrifuge 5415R) ning PCR-i reaktsiooni matriitsina kasutati DNA-d sisaldavat supernatanti.

PCR-i reaktsioonisegu üldmahuga 20 µl sisaldas: 1x PCR puhvrit (10x PCR puhvri koostis: (75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix-i (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,05 U/µl Taq DNA polümeraasi (Prof. J. Sedman), 0,4 pmol praimereid *Fw* ja *GusMun* (Tabel 2), 0,5 µl rakulüsaati ja reaktsioonisegu viidi lõppmahuni destilleeritud veega.

PCR-i etapid:

1. DNA esialgne denaturatsioon, polümeraasi aktiveerimine: 95 °C 3 minutit
2. DNA denaturatsioon: 95 °C 30 sekundit

3. Praimerite seondumine DNA-le: 53 °C-55 °C 30 sekundit

4. DNA süntees: 72 °C 40 sekundit

Etappe 2-4 korrati 25 korda.

2.2.4. DNA geelelektroforees

DNA fragmentide olemasolu ja pikkuste kontrollimiseks kasutati geelelektroforeesi. PCR reaktsioonisegule lisati 1/10 üldmahust markervärvi, mis sisaldas 0,04% broomfenoolsinist 50%-lises glütseroolis. PCR-i proovi ja markervärvi segu kanti 1%-lisele agarosgeelile (1% agarosi 1x TAE puhvris: 50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA, pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi (0,25 µg/ml). Elektroforees viidi läbi 100 voldi juures 1x TAE puhvris ning DNA fragmendid visualiseeriti UV valguses (312 või 254 nm).

2.2.5. Kloneerimine

pMW119*fliC::gusA* konstrukti valmistamiseks amplifitseeriti *fliC* geen *P_w* tüve SCC3193 kromosoomilt praimeritega *Xba*I ja *Sma*AI. DNA fragmendi amplifitseerimiseks kasutati *Pfu* DNA polümeraasi, mis omab 3'-5' eksonukleaasist aktiivsust ja tõmbistab kaheaheelalise DNA üleulatuvad otsad. PCR tingimused olid samad, mis *Taq* polümeraasi kasutamisel, ainult DNA sünteesi aeg oli *Pfu* polümeraasi kasutamisel 2 min. PCR fragmendi kloneerimisel lõigati plasmidi pMW119::*gusA* restriктаasidega *ASma_fliC* ja *Xba_fliCZ* ja fragmenti restriктаasiga *Xba_fliCZ*. Vektor ja fragment puhastati DNA Clean & Concentrator™-5 Kit'ga (Zymo Research, USA) ning ligeeriti kokku T4 DNA ligaasiga vastavalt tootja protokollile (Thermo Fischer Scientific, Leedu). Vektorisse pMW119::*gusA* kloneeritud *fliC* geeni järjestuse kindlaks tegemiseks sekveneeriti PCR-i fragment, mis saadi kasutades primereid GusMun ja M13Fw.

2.2.6. Sekveneerimine

Kaheaheelalise DNA järjestuse määramiseks kasutati Sangeri ensümaatilist meetodit, kus uute ahelate süntees peatatakse didesoksüribonukleotiididega (Sanger *et al.*, 1977).

Eraldamaks PCR-i reaktsioonisegust kasutamata jäänud primereid ja dNTP-d, lisati 5 µl-le proovile 1 µl aluselist fosfaasi FastAP (1 U/µl) ja 0,2 µl eksonukleas I (20 U/µl). Proove töödeldi PCR masinas tingimustel: inkubeerimine 15 minutit 37 °C, ensüümide inaktiveerimine 15 minutit 80 °C.

Sekveneerimisproovide reaktsioonisegud üldmahus 10 µl, sisaldasid: 1 µl töödeldud PCR-i produkti, 2 µl 5x lahjendamispuhvrit, 0,7 µl premix, 0,4 µl primereid GusMun või M13 Fw, üldmahuni destilleeritud vett. Proove töödeldi PCR-i masinas tingimustel:

1. DNA denaturatsioon 95 °C 15 sek
2. Praimerite seondumine 55 °C 15 sek
3. DNA süntees 60 °C 1 min

Tsükleid korrati 30 korda.

Saadud proovid sadestati, lisades neile 2 µl dekstraani (10 mg/ml) ning 30 µl 96% külma filtreeritud etanooli (2,5 mahtu) ning hoiti 15 minutit -20 °C juures. Seejärel proove tsentrifuugiti 10 minutit 13000 g juures, eemaldati etanool ning sadet pesti 2 korda 200 µl 70% piiritusega. Sademelt eemaldati täielikult etanool, lasti õhu käes kuivada ja lahustati 10 µl-s 70%-lises formiaadis ning säilitati -20 °C juures.

Proovid sekveneeriti TŪMRI automaatsekvenaatoril (Applied Biosystems). Saadud tulemuste analüüsiks kasutati programmi „BioEdit 7.2.2“ ja võrreldi NCBI GenBank andmebaasis olevate järjestustega, kasutades programmi blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.7. Transformatsioon. Elektroporatsioon.

E. coli DH5α rakke kasvatati SOB vedelsöötmes temperatuuril 18 °C, tiheduseni OD₆₀₀~0.6 ning seejärel töödeldi rakke TB puhvri (10 mM Hepes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂: pH 6.7) ja dimetüülsulfoksiidiga (lõppkonts. 7%) ning säilitati temperatuuril -80 °C.

Plasmiid pMW119*fl*C::*gusA* viidi transformatsiooniga DH5α tüvesse, kasutades Inoue jt meetodit (Inoue *et al.*, 1990). Kompetensetele *E. coli* DH5α rakkudele lisati 10 µl ligeerimisseguga. DNA ja bakterirakkude segu hoiti 20 minutit jääl, seejärel tehti kuumašokk 42 °C juures 1 min ja 20 sekundit ning asetati koheselt viieks minutiks tagasi jääle. Lisati 1ml LB söödet ning kasvatati 37 °C juures 45-60 minutit. Rakud plaaditi LB tardsöömele, kuhu oli lisatud selektsiooniks vajalik Amp, 40 µl IPTG-d (100 mM) ja 40 µl X-Gal-i (40 ng/µl) kolooniate kontrollimiseks sini-valge testiga.

Elektroporatsioonikompetentsete rakkude saamiseks kasvatati *Pw* erinevate tüvede rakke 5 ml-s LB söötmes (üleöö statsionaarsesse kasvufaasi), kuhu vajadusel oli lisatud sobiv antibiootikum. Hommikul tehti üleöö kultuurist lahjendus (1:100) 50 ml-sse LB söötmesse ning rakke kasvatati tiheduseni OD₅₈₀~0,6. Seejärel rakud jahutati jääl ning tsentrifuugiti (1500 g, 15 min) 4 °C juures. Rakke pesti kaks korda 50 ml 10% glütserooliga ning üks kord 25 ml 10% glütserooliga. Rakud võeti üles 40 µl-s 10% glütseroolis.

Elektrokompetentidele lisati ~10 ng plasmiidset DNA-d ning rakkude-DNA segu viidi eelnevalt jääl jahutatud elektroporatsiooniküvetti. DNA elektroporeeriti rakkudesse BIO-RAD Pulser-iga (USA) pingel 2,5 kV. Pärast seda lisati rakkudele jääl jahutatud 1 ml LB söödett ning hoiti enne kasvatamist segu 15 minutit jääl ning seejärel kasvatati ~30 minutit 30 °C juures loksutil. Järgnevalt tsentrifugeeriti rakud söötmetest välja ning plaaditi ampitsilliini sisaldavale tardsöötmele.

2.2.8. β -glükuronidaasi aktiivsuse mõõtmine

β -glükuronidaasi (GusA) aktiivsuse määramiseks vedelkultuurist kasvatati tüvesid statsionaarse kasvufaasini ~10 tundi LB söötmes ampitsilliini juuresolekul. Seejärel tehti 1:100 lahjendus M9 minimaalsöötmesse, mis sisaldas 0,5% sahharoosi ning kultuure kasvatati üleöö.

Hommikul tehti üleöökultuuridest lahjendused $OD_{580}=0,05$ M9 minimaalsöötmesse, kuhu oli lisatud süsinikuallikana 0,5% sahharoosi. 150 μ l lahjendatud kultuure pipeteeriti steriilsesse 96 kaevuga mikrotiiterplaadile ning kasvatati aereerides loksutil (Heidolph Titramax 1000) 30 °C juures. GusA aktiivsust määrati ajapunktides 2, 4, 6 ja 8 tundi.

β -glükuronidaasid aktiivsust mõõdeti mustal läbipaistmatul 96 kaevuga mikrotiiterplaadil (Greiner bio-one), kus 5 μ l rakke permeabiliseeriti 90 μ l-s CTAB puhvril (0,05% heksadetsüültrimetüülammooniumbromiid, 0,27% β -merkaptopetaanool ja 1 mM EDTA 50 mM naatriumfosfaatpuhvril pH=7) ning loksutati 10 minutit. Seejärel lisati 5 μ l MUG (4-metüülumbelliferüül- β -D-glükuroniid, 0,6 mg/ml) lahust, mis on substraadiks *gusA* geeni produktile β -D-glükuronidaasile. Substraadi lagunemisel tekib fluorestseeruv produkt 4-metüülumbelliferoon (MU). Loksutati veelkord 10 minutit ning seejärel mõõdeti MU akumulatsioonist ergastades 360 nm ja emiteerides fluorestsentsi 465 nm juures spektrofotomeetril Infinite M200 PRO (Tecan). Arvutati relatiivse fluorestsentsi ühiku tõusu minutis rakutiheduse suhtes (RFU/min OD_{580}). Kõik proovid määrati vähemalt kolmes korduses.

2.2.9. Liikuvuse (voogamise) testimine

Liikuvuse testimiseks kasvatati tüvesid üleöö 5 ml-s LB söötmes, kuhu vajadusel oli lisatud sobiv antibiootikum: SCC3193 *rsmC*-le lisati 10 μ l Cm (20 μ g/ml). Hommikul viidi üleöö kasvanud kultuuride tihedused $OD_{580}\sim 1,0$ -ni. Seejärel pipeteeriti 2 μ l bakterikultuuri M9 minimaaltassidele (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi), mis sisaldasid 0,4% agarit. Voogamise indutseerimiseks lisati söötmele kas 10% kartuliekstrakti, 3% või 4% metanooliekstrakti, 1,25 mM Na-salitsülaati või 1,25 mM klorogeenhapet.

2.2.10. Fenoolsete ühendite eraldamine summaarsest ekstraktist

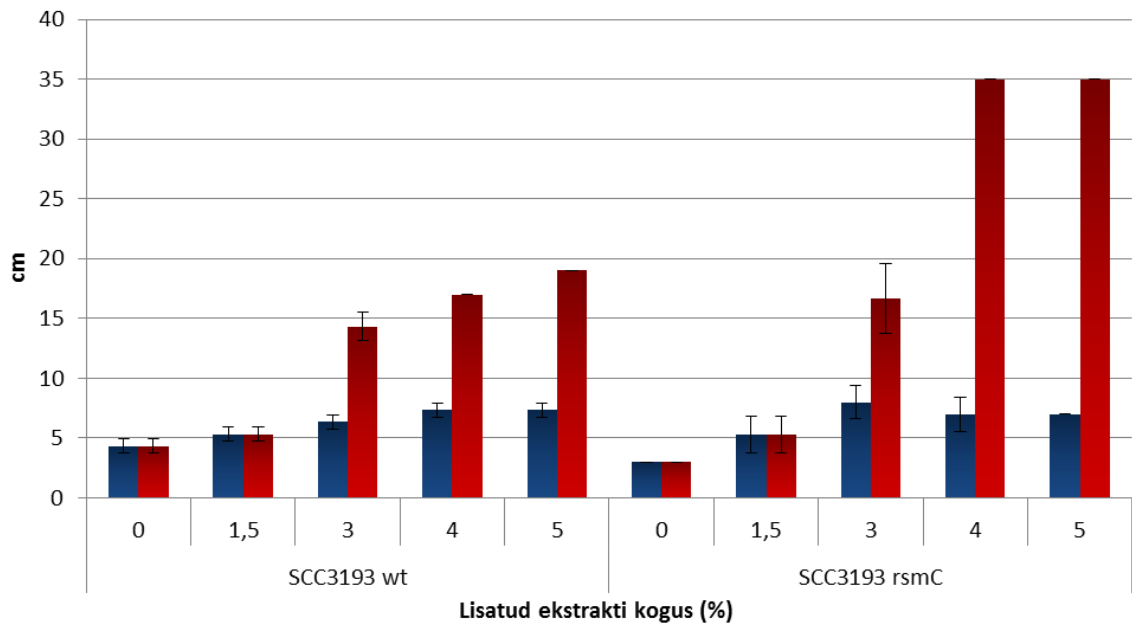
Kartulist ekstraheeritud summaarne fenoolsete ühendite ekstrakt (40 ml) kontsentreeriti vaakum-evaporaatoriga, aurutades välja metanool. Saadi 100 mg tahket fraktsiooni. Saadud tahke fraktsioon lahustati 2 ml-s tolueen:atsetoon (suhtes 1:1) segus ning voolutati Isolera One (Biotage) kiirkromotograafil läbi Biotage SNAP Vetra 10g (HP Sphere™, 25µm) silikaatkolonni 50 ml voolutiga tolueen:atsetoon:vesi (suhtes 20:20:1). Voolutamise tulemusel saadi 4 erinevat fraktsiooni, mis võeti üles metanoolis ning voolutati õhukese kihi kromotograafia meetodil DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG) 0,20 mm silikaplaadil. Tulemused visualiseeriti fosformolübdeenhappega (95%-ses etanooli lahuses).

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Kartulist ekstraheeritud fenoolsete ühendite mõju *Pw* SCC3193 liikuvusele

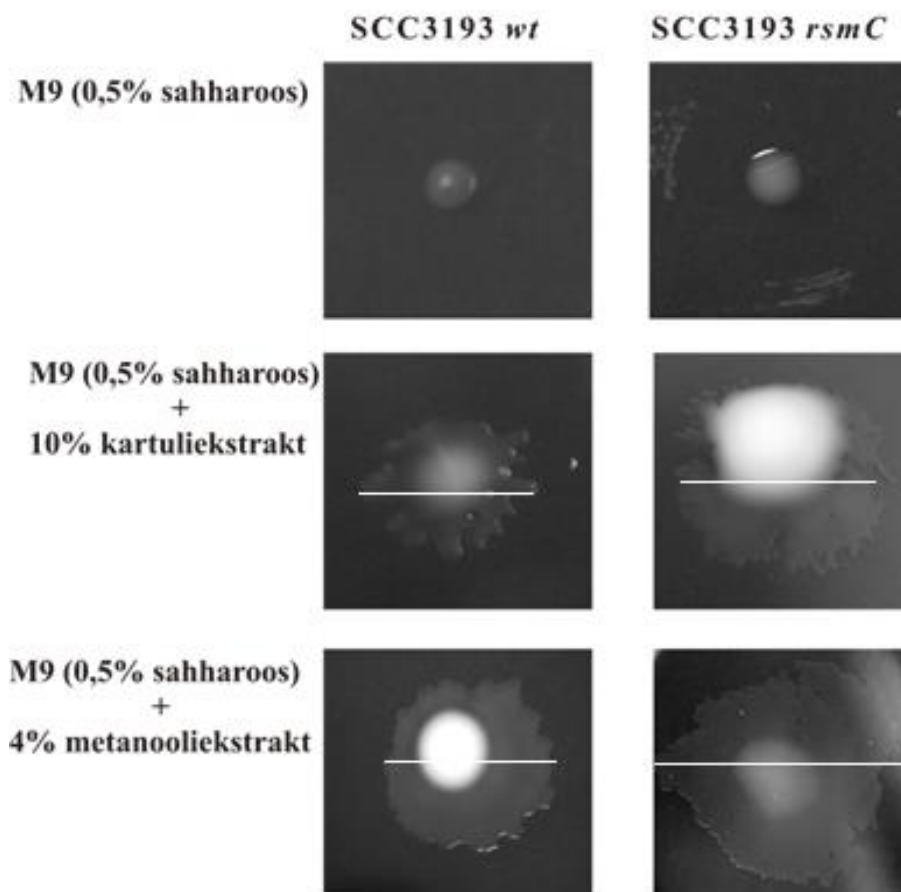
Kõiv jt poolt avaldatud andmetest oli teada, et *Pw* tüvi SCC3193 on võimeline tahkel söötmel edasi liikuma kahel viisil – nii ujudes (rakkude individuaalne liikumine viburite abil) kui ka voogamise abil (bakterite kollektiivne liikumine) (Kõiv *et al.*, 2013). Läbiviidud katsed näitasid, et tüved SCC3193 *wt* ja *rsmC* on võimeline voogama tardsöötmel (agari sisaldus 0,4%) ainult siis, kui sinna on lisatud kartuliekstrakti (mugulatest pressitud „mahl“). Nakatunud kartulimugulast ja taimeekstrakti sisaldavalt söötmelt eraldatud bakteritele oli iseloomulik viburite suur arv võrreldes bakteritega, mis olid kasvanud minimaalsöötmel, kuhu polnud lisatud kartuliekstrakti. Kui siiani arvati, et patogeen liigub nakatunud taimekoos ujudes, siis saadud tulemused näitavad selgelt, et pigem toimub patogeeni liikumine peremeestaimes kollektiivselt voogamise abil.

Nendest olemasolevatest tulemustest lähtuvalt püstitasin oma töö eesmärgiks välja selgitada, millised taimeekstrakti komponendid indutseerivad tüves SCC3193 *rsmC* intensiivse viburite sünteesi, mis omakorda käivitab patogeeni rakkude voogava liikumise. SCC3193 *rsmC* mutant sai valitud seetõttu, et antud mutant ei tooda anti-FlhDC faktorit RsmC ning seega on selles tüves suurem vaba FlhDC hulk. FlhDC-1 on viburigeenide ekspressioonile positiivne mõju (Aldridge *et al.*, 2002), mistõttu saab SCC3193 *rsmC* mutandis edukalt uurida kartuliekstrakti toimet viburite sünteesile ja liikuvusele. Kuna taimed (ka kartulimugulad) sisaldavad erinevaid fenoolseid ühendeid, siis otsustasin kontrollida, kas fenoolsed ühendid võivad olla induktoriks(teks), mis käivitab patogeeni rakkude voogava liikumise. Selleks ekstraheerisin kartulimugula purustatud massi 80% metanooliga ja lisasin saadud metanooliga ekstraheeritud fenoolsete ühendite ekstrakti (edaspidi „metanooliekstrakt“) 0,4% agari sisaldusega tardsöötmele. Saadud tulemused on esitatud joonisel 4 ning joonisel 5 oleval fotol.



Joonis 4. **Kartulist ekstraheeritud metanooliekstrakti mõju *Pw* SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutandi voogamisele tahkel söötmel.** Metsiktüve *Pw* SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutandi kasvatati 30 °C juures tahkel M9 minimaalsöötmel (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi), mis sisaldas 0,4% agarit. Voogamise indutseerimiseks lisati kartulist eraldatud metanooliekstrakti 1,5%, 3%, 4% ja 5%. Kontrolltassidele fenoolsete ühendite ekstrakti ei lisatud. Uuritavate tüvede voogamist tassil mõõdeti 4 (■) ja 14 (■) tunni järel. Esitatud on 3 mõõtmise keskmised tulemused. Näidatud on standardhälve.

Katsetest saadud tulemused näitavad, et testitud katsetingimustes soodustab metanooliekstrakt SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutandi voogamist 0,4% agari sisaldusega tardsöötmel. Nii SCC3193 *wt* kui SCC3193 *rsmC* mutant hakkab voogama, kui söötmele on lisatud minimaalselt 3% metanooliekstrakti. Metanooli lisamine 0,4% agari sisaldusega tardsöötmel bakterite voogamist ei indutseerinud (andmeid pole näidatud). Metanooliekstrakti kontsentratsiooni suurendamine 5%-ni soodustab nii SCC3193 *rsmC* mutandi kui ka *wt* voogamist. Saadud tulemused näitavad, et kartulimugulast saadud metanooliekstrakt indutseerib mõlema tüve voogamist maksimaalselt, kui selle kontsentratsioon söötmes on 4% (Joonis 4).



Joonis 5. Kartulist ekstraheeritud metanooliekstrakti mõju *Pw* SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutandi voogamisele tahkel söötmel. Metsiktüve *Pw* SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutanti kasvatati 30 °C juures tahkel M9 minimaalsöötmele (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi), mis sisaldas 0,4% agarit. Voogamise indutseerimiseks lisati kartulist eraldatud kartuliekstrakti 10% ja metanooliekstrakti 4%. Kontrolltassidel M9 minimaalsöötmele ei ole lisatud ei kartuli- ega metanooliekstrakti. Tassid fotografeeriti 12 tundi pärast inokuleerimist. Valge joonega on tähistatud voogava laigu läbimõõt.

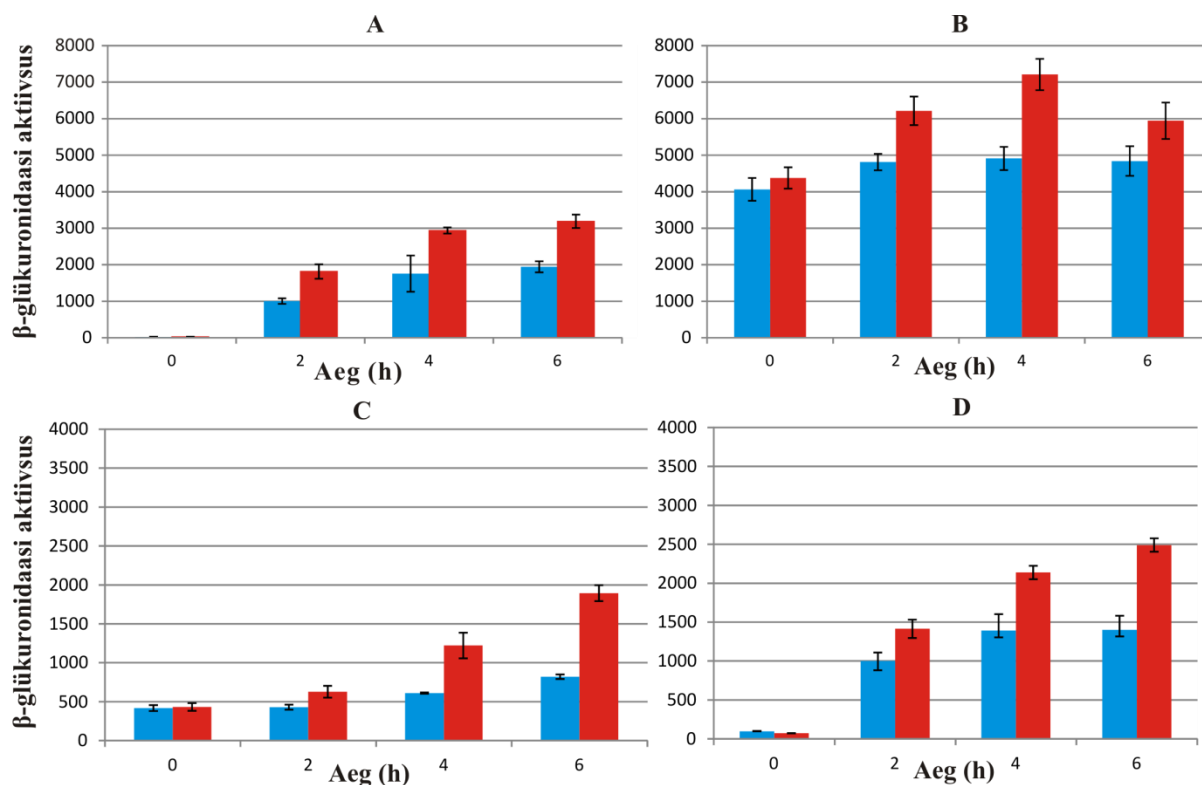
Katsest saadud tulemused näitavad, et nii kartulimahl kui ka metanooliekstrakt indutseerivad voogamist. Voogamist indutseerivaid ühendeid on võimalik kartulimugulast metanooliga ekstraheerida ning saadud metanooliekstrakt (4%) indutseerib voogamist madalamatel kontsentratsioonidel kui kartulimahl (10%). SCC3193 *rsmC* mutandis on voogamine suurem kui SCC3193 metsiktüves.

Joonisel 4 ja 5 kujutatud katsest võib järeldada, et kartuliekstrakt ja metanooliekstrakt indutseerivad voogamist. Paljudel bakteritel, nagu näiteks *Proteus mirabilis*, on keskkonnast tulevaks signaaliks, mis indutseerib voogava liikumise, bakterite kokkupuude tahke pinnaga (Rather, 2005). Minu poolt läbiviidud katse puhul on näha, et ainult tahkest pinnast voogamise indutseerimiseks ei piisa, sest ilma metanooliekstrakti lisamata tahkel

pinnal voogamist ei toimu. On teada, et P_w suudab voogata ilma *laf*-viburiteta (Harshey *et al.*, 1994; Partridge *et al.*, 2013). Selle asemel P_w suurendab diferentseerumise käigus viburite arvu raku pinnal (Kõiv *et al.*, 2013). Antud katsetest võib järeldada, et metanooliekstrakt indutseerib lateraalsete viburite sünteesi, tagades efektiivse voogamise. Oluliselt paremini suudavad voogata SCC3193 *rsmC* mutandid kõrgematel metanooliekstrakti kontsentratsioonidel, mis tuleneb vaba FlhDC suuremast hulgast mutandi rakkudes, mis omakorda indutseerib viburi moodustamiseks vajalike valkude sünteesi. Vaatamata sellele, et vaba FlhDC tase on SCC3193 *rsmC*-s kõrgem kui metsiktüves, ei vooga SCC3193 *rsmC* ilma metanooliekstraktita. Sellest võib järeldada, et ainult viburivalgude kõrgeast ekspressioonitasemest (nagu see on SCC3193 *rsmC* mutandis), voogamiseks ei piisa.

2.3.2. Metanooliekstrakti mõju P_w SCC3193 geenide *fliC* ja *flhDC* transkriptsioonile

FlhDC on oluline viburigeenide regulaatorvalk, millest sõltub paljude viburigeenide ekspressioon ning sellest tulenevalt ka liikuvus (Aldridge *et al.*, 2002). Funktsionaalse viburi moodustumisel mängib olulist rolli flageliini sünteesi määrav geen *fliC*, mis on vajalik viburifilamendi moodustamiseks (Karlinsky *et al.*, 2000). Ilma viburi filamendita on bakter liikumatu. Selleks, et uurida metanooliekstrakti mõju *fliC* geeni transkriptsioonile, konstrueerisin *fliC::gusA* transkriptsioonikonstrukti. Lisaks uurisin ka metanooliekstrakti mõju viburigeenide ekspressiooni kontrolliva *flhDC* geenide transkriptsioonile. Selleks kasutasin meie laboris varem konstrueeritud *flhDC::gusA* transkriptsioonikonstrukti (Andresen *et al.*, 2010). Elektroporeerisin mõlemad transkriptsioonikonstruktid *fliC::gusA* ja *flhDC::gusA* tüvedesse SCC3193 *wt* (metsiktüvi) ja SCC3193 *rsmC* mutant. Kasvatasin tüvesid 30 °C juures M9 minimaalsöötmes ja mõõtsin β -glükuronidaasi aktiivsused. Saadud tulemused *fliC* ja *flhDC* aktiivsustest (β -glükuronidaasi tase) on esitatud joonisel 6.



Joonis 6. Metanooliekstrakti mõju *Pw* SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutandi *fliC* ja *flhDC* geenide transkriptsioonile. Transkriptsioonikonstruktid *fliC::gusA* ja *flhDC::gusA* elektroporeeriti tüvedesse SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC*. **A** – *fliC::gusA* SCC3193 *wt* tüves, **B** – *fliC::gusA* SCC3193 *rsmC* tüves, **C** – *flhDC::gusA* SCC3193 *wt* tüves, **D** – *flhDC::gusA* SCC3193 *rsmC* tüves. Tüvesid kasvatati 30°C juures M9 minimaalsöötmes (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi) vedelkultuuris. β -glükuronidaasi aktiivsust mõõdeti 2, 4, 6 ja 8 tunni järel M9 minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud kartulist ekstraheeritud metanooliekstrakti 4% (■) ning M9 minimaalsöötmes ilma metanooliekstraktita (■). GusA aktiivsus on avaldatud kui RFU min⁻¹ OD₅₈₀⁻¹. Esitatud on 3 mõõtmise keskmised tulemused. Näidatud on standardhälve.

Katsest saadud tulemused näitavad, et metanooliekstrakt indutseerib nii *fliC* ja *flhDC* transkriptsiooni mõlemas tüves. SCC3193 *rsmC* mutandis on *fliC* transkriptsioon võrrelduna SCC3193 metsiktüvega eelviimasel ajapunktil (4 h) ligikaudu 3 korda suurem. Metanooliekstrakti lisamine suurendab mõlemas tüves *flhDC* transkriptsiooni - SCC3193 *wt* tüves keskmiselt 2 korda ning SCC3193 *rsmC* mutandis 1,5 korda eelviimases ajapunktis (4 h). SCC3193 *rsmC* mutandis on *flhDC* transkriptsioon nii indutseeritud kui indutseerimata tingimustes poole suurem kui SCC3193 *wt*-s.

SCC3193 *rsmC* mutandi suurem *fliC* transkriptsioon võrrelduna metsiktüvega tuleneb vaba FlhDC valgu suuremast hulgast SCC3193 *rsmC* tüves, kus ei toodeta RsmC valku. Seetõttu

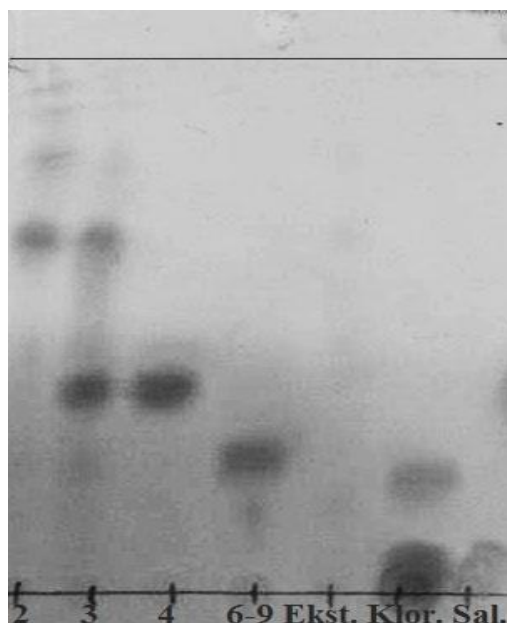
ei toimu SCC3193 *rsmC* mutandis ulatuslikku valk-valk interaktsiooni *RsmC* ja FlhDC vahel ning vaba FlhDC hulk rakkudes on tavalisest suurem. Seetõttu on võimalik ka suurem viburigeenide ekspressioon. Lisaks indutseerib metanooliekstrakti lisamine söötmesse ka *flhDC* geenide transkriptsiooni, mis omakorda suurendab viburigeenide transkriptsiooni.

Kuna metanooliekstrakt ilmutas tugevat voogamist soodustavat toimet SCC3193 *rsmC* mutandile ka voogamistassidel, võib olla tõenäoline, et metanooliekstrakt mõjutab viburigeenide ekspressiooni regulaatorit FlhDC, mistõttu on viburigeenide ekspressioon kõrgem ning voogamine suurem.

Kokkuvõttes näitavad minu tulemused, et kartulimugulatest valmistatud metanooliekstrakt indutseerib nii *flhDC* kui ka *fliC* mõlemas tüves, nii SCC3193 *wt* kui SCC3193 *rsmC* mutandis. Minu tulemustest selgub, et metanooliekstrakti lisamine soodustab voogamist tänu sellele, et suureneb viburigeenide ekspressioon, mis lõpptulemusena kiirendab viburite sünteesi ja arvu raku kohta. Need tulemused on kooskõlas Kõiv jt poolt esitatud andmetega, kes näitasid, et voogavate rakkude pinnal suureneb viburite arv ja ka suurus (Kõiv *et al.*, 2013). Lisaks ei saa ka välistada võimalust, et metanooliekstrakti lisamine suurendab ekstratsellulaarsete polüsahhariidide sünteesi, mis transporditakse rakkudest välja ja mis vähendavad hõõrdumist söötme pinna ja rakkude vahel. Nii näiteks indutseeritakse *Proteus mirabilis* pindaktiivsete ainete süntees just rakkude sattumisel tahkele pinnale (Gygi *et al.*, 1995; Partridge *et al.*, 2013).

2.3.3. Metanooliekstrakti fraktsioonide mõju *Pw* SCC3193-le

Kuna kartulimugulates saadud metanooliekstrakt sisaldab suure tõenäosusega erinevaid fenoolseid ühendeid, siis töö järgnevas etapis püüdsin sellest ekstraktist eraldada üksikuid komponente. Töö esimeses etapis aurustasin vaakumaurutil ekstraktist metanooli ja lahustasin järgi jäänud kuivjäägi 2 ml-s toluen:atsetoon (1:1) lahuses. Saadud kontsentrati analüüsisin kiirkromatograafia meetodil. Kandsin proovi 25 µm läbimõõduga silikaatkolonnile ja voolutasin kolonni toluen:atsetoon:vesi (20:20:1) voolutiga. Kiirkromatograafia tulemusena lahutus ekstrakt 4 erinevaks fraktsiooniks. Fraktsioonidest eemaldati vooluti ning tahke jääk lahustati metanoolis ning kanti õhukese kihi kromatograafia plaadile (silikageel), mida voolutati sama voolutiga (tolueen:atsetoon:vesi). Plaat ilmutati fosformolübdeenhappega ja vaadeldi UV-s ja nähtavas valguses. Fraktsioonide analüüs õhukese kihi kromatograafiaga näitas, et eraldatud fraktsioonides on mitu komponenti. Joonisel 7 oleval kromatogrammil on näha, et antud tingimustes lahutus metanooliekstrakt 4 erinevaks mitmekomponendiliseks fraktsiooniks.



Joonis 7. **Metanooliekstrakti fraktsioonide õhukese kihi kromatogramm.** Metanooliekstraktist fraktsioonide eraldamiseks kasutati kiirkromatograafia meetodit. Saadud fraktsioonid nummerdati: (2), (3), (4), (6-9). Võrdluseks lisati klorogeenhape (**Klor.**), salitsüülhape (**Sal.**) ning lahutamata metanooliekstrakt (**Ekst.**).

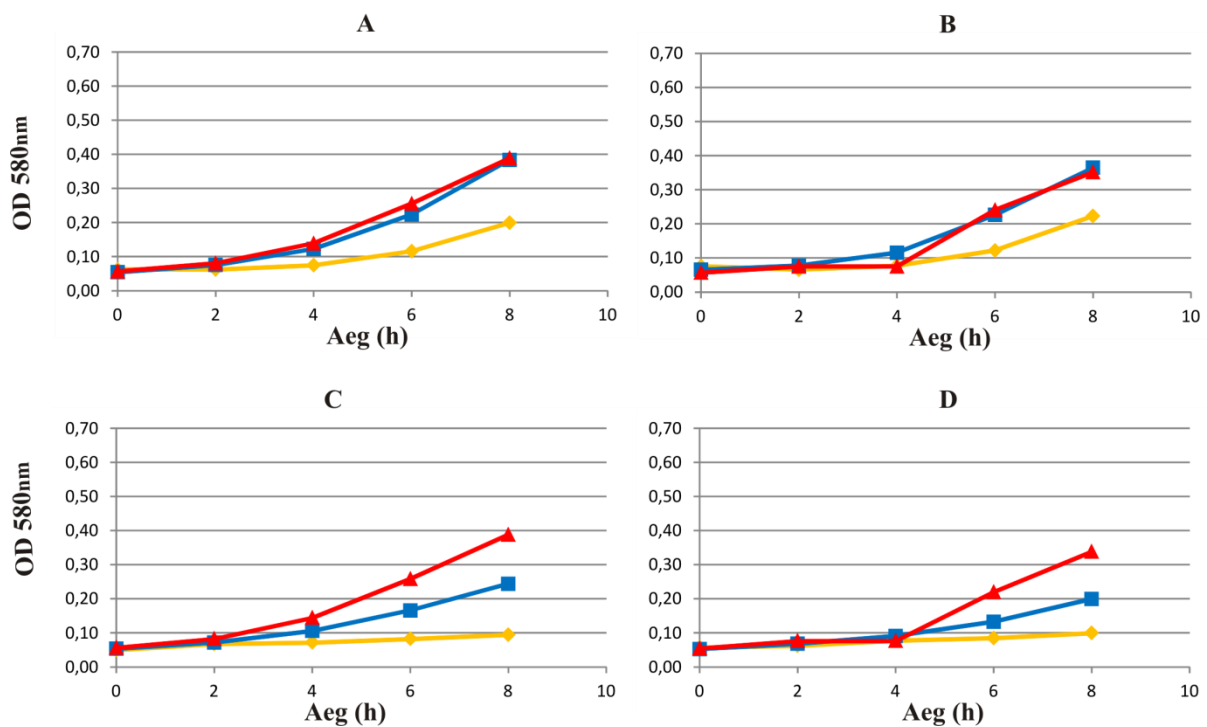
Kasutasin neid metanoolis üles võetud fraktsioone, et mõõta nende mõju SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* tüvede kasvule ja liikuvusele. Fraktsioonide mõju uurimiseks SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* viburigeenide ekspressioonile elektroporeerisin *fliC::gusA* ning *flhDC::gusA* transkriptsioonikonstruktid tüvedesse SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC*. Seejärel kasvasin mõlemat tüve, mis sisaldasid uuritavaid transkriptsioonikonstrukte, temperatuuril 30°C M9 minimaalsöötmes (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi), kuhu oli lisatud 3% fraktsioone 2, 3, 4 ja 6-9 ning mõõtsin β -glükuronidaasi aktiivsust. Võrdluseks kasutasin M9 minimaalsöödet (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi), kuhu polnud lisatud ühtegi indutseerivat ainet.

Ükski analüüsitud fraktsioonidest ei mõjutanud kummagi tüve – SCC3193 *wt*, SCC3193 *rsmC* liikuvust (ükski lisatud fraktsioon ei inhibeerinud patogeeni kasvu söötmes). Kahjuks ei mõjutanud eraldatud fraktsioonide lisamine söötmele *flhDC::gusA* ega *fliC::gusA* aktiivsust (andmeid pole näidatud).

Minu poolt saadud negatiivsetel tulemustel võib olla mitu põhjust – eraldatud ja katses kasutatud fraktsioonid ei ole iseseisvalt piisavalt stabiilsed, ekstrakti lahutamise käigus on muutunud komponentide konformatsioon või antud fraktsioonid ei oma iseseisvalt piisavalt bioaktiivsust. Lisaks ei saa ka välistada võimalust, et bioloogilist aktiivsust omab ainult kindel fraktsioonide (keemiliste ühendite/fenoolsete ühendite) kombinatsioon.

2.3.4. Klorogeenhape ja salitsüülhappe mõju *Pw* SCC3193 kasvule

Varasemalt on teada, et kartulimugulates kogunevad mitmesugused fenoolsed ühendid, milledest osa omab kaitsefunktsiooni, samas kui mõned käituvad kui signaalmolekulid, mis reguleerivad taimes mitmesuguseid füsioloogilisi protsesse. Samas on fenoolsete ühendite hulgas ka selliseid, mille süntees käivitatakse just patogeeni poolt kahjustatud taimerakkudes. Sellised ühendid käituvad kui signaalmolekulid, mis indutseerivad kaitsevalkude sünteesi nakatunud taimes (Singhai *et al.*, 2011; Torres-Conteras *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2015). Erinevate fenoolsete ühendite mõju patogeenide elutegevusele on testitud *Pectobacterium* mitmetel alamliikidel (Joshi *et al.*, 2015). Kuna fenoolsete ühendite mõju fütopatogeensete bakterite liikuvusele (eriti voogamisele) on vähe uuritud, huvitas mind, kas sellised, ka kartulimugulates olevad fenoolsed ühendid nagu salitsüülhape (signaalmolekul) ja klorogeenhape (antimikroobne ühend), mõjutavad *Pw* voogamist. Selleks, et analüüsida nende ühendite mõju *Pw* liikuvusele, tuleb välja selgitada optimaalne kontsentratsioon, mis ei pärsi bakterite kasvu ja on lähedane taimedes (mugulates) olevale kontsentratsioonile. Joshi jt (Joshi *et al.*, 2015) näitasid, et selliseks kasvu mitteinhibeerivaks (pärsib bakterite kasvu maksimaalselt 50%) kontsentratsiooniks *Pectobacterium carotovorum* WPP14 tüves on salitsüülhappe puhul 3 mM ning klorogeenhappe puhul 5 mM.



Joonis 8. Salitsüülhappe ja klorogeenhappe mõju *Pw* SCC3193 *wt* ja *rsmC* mutandi kasvule. *Pw* SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutanti kasvatati 30°C juures M9 minimaalsöötmes (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi) vedelkultuuris, mis sisaldas klorogeenhapet ja salitsüülhapet (Na-salitsülaat). **A** – SCC3193 *wt* klorogeenhappe juuresolekul, **B** – SCC3193 *rsmC* klorogeenhappe juuresolekul, **C** – SCC3193 *wt* salitsüülhappe juuresolekul **D** – SCC3193 *rsmC* salitsüülhappe juuresolekul. Nende lõppkontsentratsioon söötmes oli: 5 mM (—), 1,25 mM (—), või 0 mM (—). Bakterikultuuri optilist tihedust mõõdeti 0, 2, 4, 6 ja 8 tunni möödudes. Esitatud on 3 mõõtmise tulemused. Mõõtmisel esinenud vead oli alla 10%.

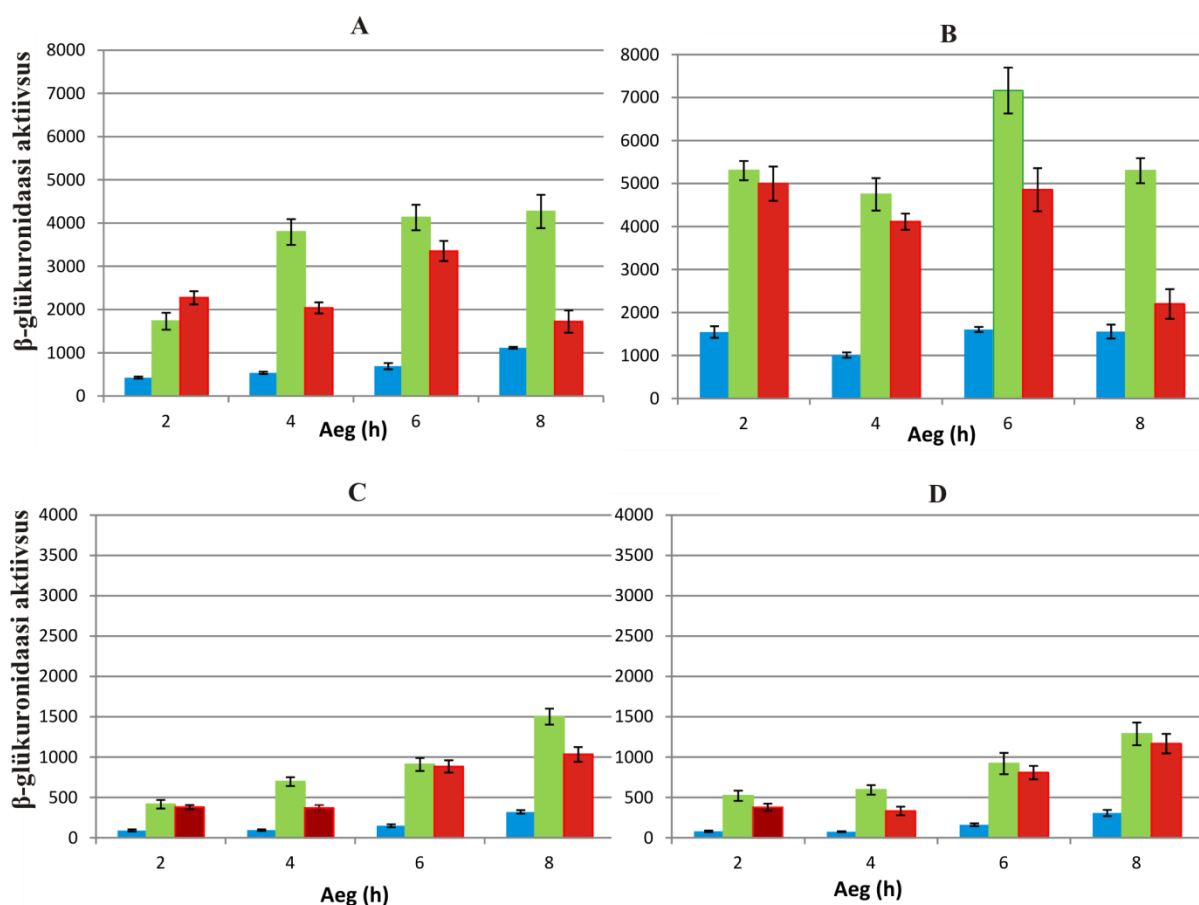
Minu tulemustest näeme, et nii SA kui ka CGA inhibeerivad 5 mM juures bakterite kasvu rohkem kui 50%, samas mõlema fenoolse ühendi lisamine söötmele lõppkontsentratsioonil 1,25 mM ei pärssinud kummagi tüve kasvu M9 minimaalsöötmes. Minu tulemustest näeme, et testitud kasvutingimustes oli tüvede SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* kasvatamisel M9 minimaalsöötmes (0,5% süsinikuallikana sahharoosi) optimaalseks kontsentratsiooniks 1,25 mM (joonis 8).

Minu tulemused olid kooskõlas Joshi tulemustega (Joshi *et al.*, 2015) – salitsüülhappe pärssis kasvu, eriti kõrgematel kontsentratsioonidel. On teada, et SA toime bakteritele käib läbi hulgatunnetuse. SA inhibeerib autoinduktorite sünteesi ja seega mõjutab ka kõikide hulgatunnetusega reguleeritavate geenide ekspressiooni. Lisaks virulentsusgeenidele, mõjutab SA ka nende geenide ekspressiooni, mis kontrollivad mitmete füsioloogiliste protsesside toimumist bakterites väljaspool peremeestaimet (Joshi *et al.*, 2016). SA toime

geenide ekspressioonile erinevates *Pectobacterium* alamliikides varieerub (Joshi *et al.*, 2016) ning sellest tulenevalt võib SA mõju konkreetsete geenide ekspressioonile sõltuda bakteritüvest (Lagonenko *et al.*, 2013). Klorogeenhappe kasvu inhibeeriv toime tuleneb ühendi antimikroobsest toimest (Torres-Conteras *et al.*, 2014).

2.3.5. Klorogeenhappe ja salitsüülhappe mõju *Pw* SCC3913 viburigeenide transkriptsioonile

Lähtudes sellest, et kartulist ekstraheeritud metanooliekstrakt soodustab voogamist, tahtsin kindlaks teha, kas salitsüülhappe või klorogeenhappe panustavad selle efekti saavutamisse. Selle uurimiseks elektroporeerisin *fliC::gusA* ning *flhDC::gusA* transkriptsioonikonstruktid tüvedesse SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC*. Tüvesid kasvasin 1,25 mM salitsüülhappe või klorogeenhappe juuresolekul M9 minimaalsöötmel ning mõõtsin β -glükuronidaasi aktiivsused. Tulemused on toodud joonisel 9.



Joonis 9. Salitsüülhappe ja klorogeenhappe mõju viburigeenide transkriptsioonile.

Transkriptsioonikonstruktid *fliC::gusA* või *flhDC::gusA* elektroporeeriti tüvedesse SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC*. **A** – *fliC::gusA* SCC3193 *wt* tüves, **B** – *fliC::gusA* SCC3193 *rsmC* tüves, **C** – *flhDC::gusA* SCC3193 *wt* tüves, **D** – *flhDC::gusA* SCC3193 *rsmC* tüves. Tüvesid kasvatati 30 °C juures M9 minimaalsöötmes (süsinikuallikana 0,5% sahharoosi) vedelkultuuris 1,25 mM salitsüülhappe (Na-salitsülaat) (■) või klorogeenhappe (■) juuresolekul. Kontrollile (■) pole lisatud fenoolseid ühendeid. β -glükuronidaasi aktiivsust mõõdeti 2, 4, 6 ja 8 tunnil. GusA aktiivsus on avaldatud kui RFU min⁻¹ OD₅₈₀⁻¹. Esitatud on 3 mõõtmise tulemused. Näidatud on standardhälve.

Minu katsete tulemused näitavad, et antud kontsentratsioonil klorogeenhappe inhibeerib ja salitsüülhappe indutseerib *fliC* ja *flhDC* transkriptsiooni mõlemas tüves. Vaadeldes transkriptsiooni aktiivsust 4 tunni möödudes, siis on näha, et CGA inhibeerib *fliC* transkriptsiooni SCC3193 *wt* tüves 67% ja SCC3193 *rsmC* tüves 60% võrreldes kontrolliga. SA indutseerib *fliC* transkriptsiooni SCC3193 *wt* tüves 23% ja SCC3193 *rsmC* tüves 27% võrreldes kontrolliga. CGA inhibeerib ka 4 tunni möödudes *flhDC* ekspressiooni SCC3193 *wt* tüves 76% ja SCC3193 *rsmC* tüves 78% võrreldes kontrolliga. SA indutseerib *flhDC* ekspressiooni SCC3193 *wt* tüves 22% ja SCC3193 *rsmC* tüves 23% võrreldes kontrolliga.

Minu tulemused on kooskõlas Joshi jt tulemustega, kuid vastuolus Lagonenko jt saadud tulemustega (Lagonenko *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2015). Lagonenko jt töös selgus, et salitsüülhape pärssib tugevalt *Pectobacterium carotovorum* liikuvust. Salitsüülhappe puhul on teada, et see mõjutab mitmeid virulentsusfaktoreid, kaasaarvatud hulgatunnetust, AHL tootmist ning liikuvust. Salitsüülhappel ei ole universaalset toimet. Teatakse, et salitsüülhape ei ole taime jaoks oluline mitte ainult signaalmolekulina, vaid ka bakteritsiidse ühendina (Joshi *et al.*, 2015). Olenevalt kontsentratsioonidest ning organismidest võib salitsüülhappel olla nii liikuvust inhibeeriv kui ka stimuleeriv toime. *Pectobacterium* perekonna puhul on täheldatud enamasti SA inhibeerivat toimet liikuvusele (ujumine) kõrgetel kontsentratsioonidel (25 mM ja 50 mM) (Lagonenko *et al.*, 2013) ning *Pseudomonas aeruginosa* puhul on näidatud SA inhibeerivat toimet *fliC* geeni ekspressioonile (Dong *et al.*, 2012). Samas on leitud, et fenoolsed ühendid, mis tugevalt inhibeerivad kasvu, nagu salitsüülhape, indutseerivad madalamatel kontsentratsioonidel liikuvust (Joshi *et al.*, 2015). Minu tulemused näitavad, et SA indutseerib *fliC* ja *flhDC* ekspressiooni, mis omakorda soodustab viburite moodustumist ja liikuvust. Saadud tulemused on vastuolus Lagonenko jt esitatud tööga, kes näitasid, et SA lisamine kasvukeskkonda pärssib *Pectobacterium carotovorum* liikuvust. Selline vastuolu võib olla tingitud sellest, et Lagonenko jt kasutasid tunduvalt kõrgemaid SA kontsentratsioone, mis võivad pärssida bakteris toimuvaid füsioloogilisi protesse. Salitsüülhape toimib taimes kui signaalmolekul, mille kogus suureneb, kui taim nakatub patogeeniga. SA transporditakse kahjustatud rakkudest edasi ka tervetesse rakkudesse, mille tulemusena käivitatakse kaitsevalkude süntees üle kogu taime. Kirjanduses esitatud andmete ja minu poolt saadud katsetulemuste põhjal võib püstitada hüpoteesi, et *Pw*-taim interaktsiooni protsessis indutseerivad SA madalad kontsentratsioonid patogeenis virulentsusfaktorite, nagu voogamine, sünteesi. Voogamise kiire indutseerimine infektsiooni varases etapis võimaldab patogeenil taimes kiiresti levida, enne kui taim jõuab käivitada kaitsevastuse ja patogeeni leviku ning paljunemise maha suruda. Klorogeenhappel on erinevalt salitsüülhappest tugevalt inhibeeriv toime *fliC* ja *flhDC* geenide ekspressioonile. Klorogeenhappe toimemehhanismid virulentsusele pole täpselt teada, kuid ilmselt peitub vastus selle ühendi antimikroobses toimes, mis koos patogeeni kasvu inhibeerimisega mõjutab mitmeid teisi füsioloogilisi protesse bakterirakus.

Lõppkokkuvõttes näitavad minu tulemused, et kuigi taimedest (kartulimugulad) ekstraheeritud fenoolsed ühendid indutseerivad *Pw* viburigeenide ekspressiooni, võivad individuaalsed fenoolsed ühendid taimes omada nii geenide ekspressiooni soodustavat kui

ka pärssivat toimet. Taimeekstrakti mõju voogamisele tuleneb erinevate taimsete fenoolsete ühendite summaarsest toimest.

2.3.6. Järeldused

Uuritud tüvel *Pw* SCC3193 erineb voogamine teistest bakteritest, mis kasutavad tahkel pinnal edasi liikumiseks sama kollektiivse liikumise vormi. Erinevalt *Proteus vulgaris* tüvedest, ei kasuta minu poolt uuritud *Pw* tüvi voogamiseks *laf*-vibureid. Lisaks näitasid minu katsete tulemused, et tahke pind ei indutseri *Pw* voogavat liikumist. Erinevalt teistest virulentsusfaktoritest (PCWDE) ei indutseeri PGA lisamine M9 minimaalsöötmel patogeeni voogamist. Viburigeenide positiivse regulaatori FlhDC ülehulk SCC3193 *rsmC* mutandis ei ole piisav, et indutseerida voogavat liikumist. Need tulemused lubavad teha järelduse, et vaatamata voogamise olulisele rollile infektsiooniprotsessis, on voogamine reguleeritud teistest virulentsusfaktoritest erinevalt.

Minu tehtud katsete tulemused kinnitavad, et taimne ekstrakt (kartulimahla) soodustab nii *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 *wt* kui ka SCC3193 *rsmC* voogamist. Kartulist ekstraheeritud fenoolsed ühendid (metanooliekstrakt) indutseerivad voogamist tahkel söötmel juba madalatel kontsentratsioonidel (3%). Need tulemused näitavad selgelt, et voogamine käivitatakse patogeenis pärast tema tungimist rakku.

Metanooliekstrakt indutseerib *fliC* ja indutseerib *flhDC* geenide transkriptsiooni nii SCC3193 *wt* kui SCC3193 *rsmC* mutandis, mis näitab, et metanooliekstraktis leidub fenoolseid ühendeid, mis indutseerivad viburigeenide ekspressiooni. Kuigi SCC3193 *rsmC* mutandis on vaba FlhDC hulk suurem kui metsiktüves, ei ole see piisav, et käivitada voogavat liikumist. Seega võivad taimest pärinevad signaalmolekulid (fenoolsed ühendid) täiendavalt indutseerida viburigeenide ekspressiooni tasemini, mis on vajalik voogamiseks. Siiani saadud tulemuste põhjal ei saa ka välistada teisi võimalusi. Näiteks võivad taimest pärit fenoolsed ühendid indutseerida ka pindaktiivsete ainete sünteesi patogeeni rakkudes, mis soodustavad rakkude libisemist tahkel pinnal.

Kartulis leidub fenoolne ühend salitsüülhape, mille mõju on varasemalt uuritud vaid ujumisele. On leitud, et salitsüülhape pärsib kõrgetel kontsentratsioonidel liikuvust ning madalatel kontsentratsioonidel soodustab seda. Minu katsed näitavad, et salitsüülhape mõjutab ka voogamist. Salitsüülhape soodustab nii *fliC* kui ka *flhDC* transkriptsiooni, mis võib viidata sellele, et bakter on õppinud antud fenoolset ühendit ära tundma kui signaalmolekuli ja vastavalt reageerima, indutseerides viburite sünteesi. Kartulis leiduvas klorogeenhappel on *Pw*-le ainult antimikroobne mõju, inhibeerides nii bakteri kasvu kui ka liikuvust. Need tulemused lubavad teha järelduse, et patogeeni voogav liikumine peremeestaimes sõltub erinevate fenoolsete ühendite spektrist ja kontsentratsioonist primaarses nakatumiskohas.

KOKKUVÕTE

Vaatamata sellele, et voogamine on üks virulentsusfaktoritest, ei indutseeri seda erinevalt teistest virulentsusfaktoritest (PCWDE) PGA lisamine kasvukeskkonda. Käesoleva töö eesmärgiks oli välja selgitada kartulis leiduvate fenoolsete ühendite mõju *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 voogamisele. Selleks ekstraheerisin kartulist fenoolsed ühendid. Töö esimeses etapis kasutasin summaarset fenoolsete ühendite preparaati (metanooliekstrakt), mis oli saadud kartulimugulate ekstraheerimisel metanooliga. Saadud metanooliekstrakt indutseeris *Pw* SCC3193 *wt* ja SCC3193 *rsmC* mutandi voogavat liikumist tahkel söötmel. Edasi analüüsisin metanooliekstrakti mõju viburigeenide *fliC::gusA* ja *flhDC::gusA* transkriptsioonikonstruktidele. Saadud tulemused näitasid, et metanooliekstrakt indutseerib mõlema geeni transkriptsiooni. Edasi analüüsisin kahe kartulis enamleiduva fenoolse ühendi – klorogeenhappe ja salitsüülhappe - mõju nimetatud konstruktide transkriptsioonile. Uuritud fenoolsete ühendite mõju oli antagonistlik: klorogeenhappe inhibeeris ning salitsüülhappe indutseeris viburigeenide transkriptsiooni. Seega omavad kartulimugulas olevad fenoolsed ühendid patogeeni voogamisele nii indutseerivat kui ka pidurdavat toimet.

Minu tulemustest võib järeldada, et erinevate virulentsusfaktorite sünteesi indutseerivad erinevad taimeraku komponendid. Seega indutseeritakse kogu virulentsusfaktorite kompleks tingimustes, mis on võimalikult lähedased keskkonnale nakatunud taimekoes.

Saadud tulemused on edasiseks aluseks *Pectobacterium wasabiae* voogamise mehhanismide uurimisele kartulis olevate fenoolsete ühendite toimel.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada kõiki inimesi, kes mind lõputöö kirjutamise juures toetasid. Eelkõige tänan oma juhendajat Andres Mäed suure abi ning tarkade õpetussõnade eest. Suur tänusõnad Uno Mäeorule, kes pühendas oma vaba aega, et aidata mul tegeleda kartuliekstraktist fenoolsete ühendite eraldamisega. Suur aitäh, Tiina Alamäe, Viia Kõiv ning Lee Põllumaa, juhendamise, abi ning toetuse eest.

Suured tänud minu perele ja sõpradele igakülgse toetuse eest lõputöö kirjutamisel.

SUMMARY

Pectobacterium wasabie (*Pw*) is a phytopathogenic bacterium that causes soft rot disease. *Pw* has a wide host range, including potato, carrot, mango, maize and cabbage, and because of that it causes serious economical damage. *Pw* main virulence factors are plant cell wall degrading enzymes, which include pectinases, polygalacturonases, proteases, and cellulases. In addition to these enzymes, motility also contributes to the virulence. Motility helps the pathogen to quickly spread from the primary infection site to all over the plant. Until so far, it was thought that pathogens use swimming as a way to move around the plant, which is considered to be an individual movement. Now, however, it is known that plant pathogens use collective movement, swarming, similarly to human and animal pathogens, and that swarming of *Pw* is affected by plant signals.

The aim of this study is to determine how swarming of *Pw* is regulated by signals induced by phenolic compounds of potato. In order to find out, I extracted phenolic compounds from potato tubers (methanol extract) and constructed *fliC::gusA* transcription construct. Methanol extract induced *Pw* SCC3193 *wt* and SCC3193 *rsmC* swarming on a solid agar. Next I analyzed the effect of methanol extract on transcription constructs of flagellar genes *fliC::gusA* and *flhDC::gusA*. Aquired results showed, that methanol extract induces expression of both of these genes. After that I analyzed the effect of two most common phenolic acids found in potato (salicylic and chlorogen acid) on transcription of given *gusA* constructs. Effect of salicylic and chlorogenic acid was antagonistic – chlorogenic acid inhibited and salicylic acid induced transcription of flagellar genes.

Despite swarming is one of virulence factors of *Pw*, it differs from other virulence factors such as PCWDE, because swarming is not induced by PGA. My results show that swarming is rather induced by phenolic acids found in plants (potato tubers), which promote expression of flagellar genes and flagella synthesis.

Given results are basis for futrher studies to have a better understanding of swarming-inducing mechanisms and effects of other phenolic compounds found in potato on swarming.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. **Agrios, G. N.** (1997) Plant Pathology. 4th ed. Academic Press, New York
2. **Alberti, L.; Harshey, R. M.** (1990). Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. J. Bacteriol. 178(8): 322-4328.
3. **Aldridge, P.; Hughes, K.** (2002). Regulation of flagellar assembly. Curr. Opin. Microbiol. 5: 160-165.
4. **Alfano, J. R.; Collmer, A.** (1996). Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. Plant Cell. 8: 1683-1698.
5. **Andresen, L.; Kõiv, V.; Alamäe, T.; Mäe, A.** (2007). The Rcs phosphorelay modulates the expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. FEMS Microbiol. Lett. 273: 229-238.
6. **Andresen, L.; Sala, E.; Kõiv, V.; Mäe, A.** (2010). A role for the Rcs phosphorelay in regulating expression of plant cell wall degrading enzymes in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Microbiology 156: 1323-1334.
7. **Antúñez-Lamas, M.; Cabrera-Ordóñez, E.; López-Solanilla, E.; Raposo, R.; Trelles-Salazar, O; Rodríguez-Moreno, A.; Rodríguez-Panenzuela, P.** (2009). Role of motility and chemotaxis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysantemi* 3937). Microbiology. 155: 432-442.
8. **Barnard, A, M. L.; Bowden, S. D.; Burr, T.; Coulthurst, S. J.; Monson, R. E.; Salmond, G. P. C.** (2007). Quorum sensing, virulence and secondary metabolite production in plant soft-rotting bacteria . Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 362(1483): 1165-1183.
9. **Barras, F.; Gijsegem, van, F.; Chatterjee, A. K.** (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 201-234.
10. **Belas, R.; Simon, M.; Silverman, M.** (1986). Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 167(1): 210-218.
11. **Bodman, von, S. B.; Bauer, W. D.; Coplin, D. L.** (2003). Quorum-sensing in plant-pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 41: 455-482.
12. **Bolton, G. W.; Nester E. W.; Gordon, M. P.** (1986). Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. Science. 232(4753): 983-985.
13. **Bowden, S. D.; Hale, N.; Chung, J. C. S.; Hodgkinson, J. T.; Spring, D. R.; Welch, M.** (2013). Surface swarming motility by *Pectobacterium atrosepticum* is a latent phenotype that requires O antigen and is regulated by quorum sensing. Microbiology. 159: 2375-2385.

14. **Broberg, M.; Lee, G. W.; Nykyri, J.; Lee, Y. H.; Pirhonen, M.; Palva, E. T.** (2013). The global response regulator ExpA controls virulence gene expression through RsmA-mediated and RsmA-independent pathways in *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(6): 1972-1984.
15. **Chadsey, M. S.; Hedges, K. T.** (2001). A multipartite interaction between *Salmonella* transcription factor sigma28 and its anti-sigma factor FlgM: Implications for sigma28 holoenzyme destabilization through stepwise binding. *J. Mol. Biol.* 206: 915-929.
16. **Chatterjee, A.; Cui, Y.; Chakrabarty, P.; Chatterjee, A. K.** (2010). Regulation of motility in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*: Quorum-sensing signal controls FlhDC, the global regulator of flagellar and exoprotein genes, by modulating the production of RsmA, an RNA-Binding protein. *MPMI.* 23(10): 1316-1323.
17. **Chatterjee, A.; Cui, Y.; Chatterjee, A. K.** (2009). RsmC of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* negatively controls motility, extracellular protein production, and virulence by binding FlhD and modulating transcriptional activity of the master regulator, FlhDC. *J. Bacteriol.* 191(14): 4582-4593.
18. **Collmer, A.; Keen, N.T.** (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 383-409.
19. **Copeland, M. F.; Weibel, D. B.** (2008). Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter.* 5(6): 1174-1187.
20. **Czajkowski, R.; Pérombelon, M. C. M.; Veen, van, J. A., Wolf, van der, J. M.** (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathol.* 60(6): 999-1013.
21. **Cui, Y.; Chatterjee, A.; Liu, Y.; Dumenyo, C. K.; Chatterjee, A. K.** (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft rotting *Erwinia* spp. *J. Bacteriol.* 177: 5108-5115.
22. **Cui, Y.; Chatterjee, A.; Yang, H.; Chatterjee, A. K.** (2008). Regulatory network controlling extracellular proteins in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*: FlhDC, the master regulator of flagellar genes, activates *rsmB* regulatory RNA production by affecting *gacA* and *hexA (lrhA)* expression. *J. Bacteriol.* 190(13): 4610-4623.
23. **Davidsson, P. R.; Kariola, T.; Niemi, O.; Palva, E. T.** (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Front. Plant Sci.* 4(191): 1-13.
24. **Dong, Y.; Huang, C.; Park, J.; Wang, G.** (2012). Growth inhibitory levels of salicylic acid decrease *Pseudomonas aeruginosa fliC* flagellin gene expression. *JEMI.* 16: 73-78.

25. Eriksson, A. R. B.; Andersson, R. A.; Pirhonen, M.; Palva, E. T. (1998). Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *MPMI*. 11(8): 743-752.
26. Flego, D.; Marits, R.; Eriksson, A. R. B.; Kõiv, V.; Karlsson, M. B.; Heikinheimo, R.; Palva, E. T. (2000). A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. *MPMI*. 13(4): 447-455.
27. Frolova, J. (2012). Magistritöö. Plasmiidsete vektorsüsteemide konstrueerimine ja rakendamine Rsm süsteemi mõju uurimiseks taimepatogeenis *Pectobacterium carotovorum* alamli. *carotovorum*
28. Golkhanden, E.; Kamaruzaman, S.; Sariah, M.; Abidin, M. A. Z.; Nazerian, E.; Yassoralipour, A. (2013). First report of soft rot disease caused by *Pectobacterium wasabie* on sweet potato, tomato and eggplant in Malaysia. *Plant Dis*. 97(5): 685.
29. Goto, M.; Matsumoto, K. (1987). *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim.). *Int. J. Syst. Bacteriol*. 37(2): 130-135.
30. Gygi, D.; Rahman, M. M.; Lai, H. C.; Carlson, R.; Guard-Petter, J.; Hughes, C. (1995). A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol*. 17: 1167-1175.
31. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*. 166: 557-580.
32. Harshey, R. M.; Matsuyama, T. (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Dev. Biol*. 91: 8631-8635.
33. Hauben, L.; Moore, E. R.; Vauterin L.; Steenackers, M.; Margaert, J.; Verdonock, L.; Swings, J. (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol*. 21(3): 384-397.
34. Heikinheimo, R.; Flego, D.; Pirhonen, M.; Karlsson, M. B.; Eriksson, A.; Mäe, A.; Kõiv, V.; Palva, E. T. (1995). Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *MPMI*. 8(2): 207-217.
35. Hossain, M. M.; Shibata, S.; Aizawa, S. I.; Tsuyumu, S. (2005). Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiol. Mol. Plant, Path.* 66(4): 134-143.
36. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Nasser, W.; Condomine, G.; Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia carotovora*. *Annu. Rev. Microbiol*. 50: 213-257.

37. **Hyytiäinen, H.; Montesano, M.; Palva, E. T.** (2001). Global Regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-*rsmB* system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. MPMI. 14(8): 931-938.
38. **Hyytiäinen, H.; Sjöblom, S.; Palomäki, T.; Tuikkala, A.; Palva, E. T.** (2003). The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. Mol. Microbiol. 50(3): 795-807.
39. **Inoue H.; Nojima H.; Okayama H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96: 23-28.
40. **Inoue, T.; Shingaki, R.; Hirose, S.; Waki, K.; Mori, H.; Fukui, K.** (2007). Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12 . J. Bacteriol. 189(3): 950-957.
41. **Joshi, J. R.; Burdman, S.; Lipsky, A.; Yariv, S.; Yedidia, I.** (2016). Plant phenolic acid affect the virulence of *Pectobacterium aroidearum* and *P.carotovorum* ssp. *brasiliense* via quorum sensing regulation. Plant Pathol. 17(4): 487-500.
42. **Joshi, J. R.; Burdman, S.; Lipsky, A.; Yedidia, I.** (2015). Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium* . Res. Microbiol. - 2015. 166: 535-545.
43. **Karlinsey, J. E.; Tanaka, S.; Bettenworth, V.; Yamaguchi, S.; Boos, W.; Aizawa, S. I.; Hughes, K.** (2000). Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. Mol. Microbiol. 37(5): 1220-1231.
44. **Kirov, S. M.; Tassell, B. C.; Semmler, A. B. T.; O'Donovan, L. A.; Rabaan, A. A.; Shaw, J. G.** (2002). Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species . J. Bacteriol. 184 (2): 547-555.
45. **Koskinen, J. P.; Laine, P.; Niemi, O.; Nykiri, J.; Harjunpää, H.; Auvinen, P.; Paulin, L.; Pirhonen, M.; Palva, E. T.; Holm, L.** (2012). Genome sequence of *Pectobacterium* sp. strain SCC3193. J. Bacteriol. 194(21): 6004.
46. **Kõiv, V.; Andersen, L.; Broberg, M.; Frolova, J.; Somervuo, P.; Auvinen, P.; Pirhonen, M.; Tenson, T.; Mäe, A.** (2013). Lack of RsmA-mediated control results in constant hypervirulence, cell elongation, and hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae* . PLoS One. 8(1): 1-12.
47. **Laasik, E.; Pöllumaa, L.; Pasanen, M.; Mattinen, L.; Pirhonen, M.; Mäe, A.** (2014). Expression of *nipP.w* of *Pectobacterium wasabiae* is dependent on functional *flgKL* flagellar genes . Microbiology. 160: 179-186.

- 48. Lagonenko, L.; Lagonenko, A.; Evtushenkov, A.** (2013). Impact of salicylic acid on biofilm formation by plant pathogenic bacteria. *Journal of Biology and Earth Sciences*. 3(2): B176-B181.
- 49. Liu, H.; Coulthurst, S. J.; Pritchard, L.; Hedley, P. E.; Ravensdale, M.; Humpris, S.; Burr, T.; Takle, G.; Brurberg, M. B.; Birch, P. R. J.; Salmond, G. P. C.; Toth, I. K.** (2008). Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLOS Pathog*. 4(6): e1000093.
- 50. Liu, Y.; Jiang, G.; Cui, Y.; Mukherjee, A.; Ma, W. L.; Chatterjee, A. K.** (1999). *kdgREcc* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, harpinEcc, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol*. 181: 2411-2422.
- 51. Ma, B.; Hibbing, M. E.; Kim, H. S.; Reedy, R. H. M.; Yedidia, I.; Breuer, J.; Breuer, J.; Glasner, J. D.; Perna, N. T.; Kelman, A.; Charkowski, A. O.** (2007). Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*. 97(9): 1150-1163.
- 52. Marits, R.; Kõiv, V.; Laasik, E.; Mäe, A.** (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*. 145: 1959-1966.
- 53. Marits, R.; Tshuikina, M.; Pirhonen, M.; Laasik, E.; Mäe, A.** (2002). Regulation of the expression of *prtW::gusA* fusion in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiology* 148: 835-842.
- 54. Matsumoto, H.; Umehara, M.; Muroi, H.; Yoshitake, Y.; Tsuyumu, S.** (2003). Homolog of FlhDC, a master regulator for flagellum synthesis: required for pathogenicity in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Plant Pathol*. 69: 180-193.
- 55. Mattinen, L.; Tshuikina, M.; Mäe, A.; Pirhonen, M.** (2004). Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *MPMI*. 17(12): 1366-1375.
- 56. Mäe, A.; Heikinheimo, R.; Palva, E. T.** (1995). Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celVI* and the role of cellulase in phytopathogenicity. *MGG*. 247(1): 17-26.
- 57. Nasser, W.; Reverchon, S.; Condomine, G.; Robert-Baudouin, J.** (1994). Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. *J. Bacteriol*. 236(2): 427-440.
- 58. Nealson, K. H.; Hastings, J. W.** (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev*. 43: 496-518.

- 59. Nykyri, J.; Fang, X.; Bakr, R.; Pasanen, M.; Pirhonen, M.; Dorati, F.; Jackson, R.W.; Niemi, O.; Palva, E. T.** (2014). Evidence that nematodes may vector the soft rot-causing enterobacterial phytopathogens. *Plant Pathol.* 63(4): 747-757.
- 60. Nykyri, J.; Niemi, O.; Koskinen, P.; Nokso-Koivisto, J.; Pasanen, M.; Broberg, M.; Plyusin, I.; Törönen P.; Holm L.; Pirhonen, M.; Palva, E. T.** (2012). Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinant of the model soft rot phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLOS Pathog.* 8(11): e1003013.
- 61. Ottmann, C.; Luberacki, B.; Kufner, I.; Koch, W.; Brunner, F.; Weyand, M.; Mattinen, L.; Pirhonen, M.; Anderluh, G.; Seitz, H. U.; Nürnberger, T.; Oecking, C.** (2009). A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *PNAS.* 106(25): 10359-10364.
- 62. Partridge, J. D.; Harshey, R. M.** (2013). Swarming: Flexible roaming plans. *J. Bacteriol.* 195(5): 909-918.
- 63. Partridge, J. D.; Harshey, R. M.** (2013). More than motility: *Salmonella* flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. *J. Bacteriol.* 195(5): 919-929.
- 64. Patrick, J. E.; Kearns, D. B.** (2012). Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 83(1): 14-23.
- 65. Pemberton, C. L.; Whitehead, N. A.; Sebaihia, M.; Bell, K. S.; Hyman, L. J.; Harris, S. J.; Matlin, A. J.; Robson, N. D.; Birch, P. R. J.; Carr, J. P.; Toth, I. K.; Salmond, G. P. C.** (2005). Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: Identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *MPMI.* 18(4): 343-353.
- 66. Pérombelon, M. C. M.** (1992). Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Neth. J. Plant Pathol.* 98(2): 135-146.
- 67. Pérombelon, M. C. M.** (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.* 51(1): 1-12.
- 68. Pérombelon, M. C. M.; Salmond, G. P. C.** (1995). Bacterial Soft Rots. p. 1-21. *In* G. Meurant, Pathogenesis and host specificity in plant diseases. 1st ed., vol.1. Elsevier Science Ltd, Oxford
- 69. Pirhonen, M.; Flego, D.; Heikinheimo, R.; Palva, E. T.** (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12(6): 2467-2476.

- 70. Pirhonen, M.; Heino, P.; Palva, E. T.; Helander, I.; Harju, P.** (1988). Bacteriophage T4 resistant mutants of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microb. Pathog.* 4(5): 359-367.
- 71. Pirhonen, M.; Saarilahti, H.; Karlsson, M. B.; Palva, E. T.** (1991). Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by transposon mutagenesis. *MPMI.* 4(3): 276-283.
- 72. Pitman, A. R.; Harrow, S. A.; Visnovsky, B.** (2010). Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *Eur. J. Plant. Pathol.* 126(3): 423-435.
- 73. Pöllumaa, L.; Alamäe, T.; Mäe, A.** (2012). Quorum sensing and expression of virulence in pectobacteria. *Sensors (Basel).* 12: 3327-3349.
- 74. Rather, P. N.** (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ. Microbiol.* 7(8): 1065-1073
- 75. Saarilahti, H. T.; Heino, P.; Pakkanen, R.; Kalkkinen, N.; Palva, I.; Palva, E. T.** (1990). Structural analysis of the *pehA* gene and characterization of its protein product, endopolygalacturonase, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Microbiol.* 4: 1037-1044.
- 76. Sambrook, J.; Russell, D. W.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 77. Sanger, F.; Nicten, S.; Coulson, A. R.** (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463- 5467.
- 78. Singhai, P. K.; Sarma, B. K.; Srivastava, J. S.** (2011). Phenolic acid content in potato peel determines natural infection of common scab caused by *Streptomyces* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(7): 1559-1567.
- 79. Sjöblom, S.; Brader, G.; Koch, G.; Palva, E. T.** (2006). Cooperation of two distinct ExpR regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Microbiol.* 60(6): 1474-1489.
- 80. Tang, J. L.; Cough, C. L.; Barber, C. E.; Dow, J. M.; Daniels, M. J.** (1987). Molecular cloning of protease genes from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* 210: 443-448.
- 81. Tans-Kersten, J.; Huang, H.; Allen, C.** (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* 183(12): 3597-3605.
- 82. Torres-Conteras, A. M.; Nair, V.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D. A.** (2014). Plants as biofactories: Stress-induced production of chlorogenic acid isomers in

potato tubers as affected by wounding intensity and storage time. *Industrial Crops and Products*. 62: 61-66.

83. **Toth, I. K.; Bell, K. S.; Holeva, M. C.; Birch, P. R. J.** (2003). Soft rot erwinia: from genes to genomes. *Plant Pathol.* 4(1): 17-30.
84. **Waleron, M.; Waleron K.; Lojkowska E.** (2013). Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *Eur. J. Plant Pathol.* 137(1): 149-158.
85. **Wang, Q.; Suzuki, A.; Mariconda, S.; Porwollik, S.; Harshey, R. M.** (2005). Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *EMBO J.* 24(11): 2034-2042.
86. **Waters, C. M.; Bassler, B. L.** (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 319-346.

LIHTLITSENTS

Mina, Linda-Marie Kimmel (18.01.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Fenoolsed ühendid kui fütopatogeeni *Pectobacterium wasabiae* voogamist kontrollivad signaalmolekulid,

mille juhendajad on Andres Mäe ja Tiina Alamäe,

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 23.05.2016