

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
RAKU- JA MOLEKULAARBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kristel Toppi

**Kultiveeritavad bakterid kartulimugula mädanikus**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Viia Kõiv

Kaitsmisele lubatud .....

Juhendaja .....

*allkiri, kuupäev*

Tartu 2014

## Sisukord

Sisukord.....	2
<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>5</b>
<b>1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. <i>Pectobacterium</i> ei ela üksi, kes veel?.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1. Endofüüdid taimedes .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2. Endofüüdid kartulis .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Sekretsioonisüsteemid Gram-negatiivsetes bakterites .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.1. T1SS.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.2. T2SS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.3. T3SS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.4. T4SS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.5. T5SS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.6. T6SS.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Kultiveerimine.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. 16S rRNA DNA sekveneerimine.....</b>	<b>12</b>
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Töö eesmärgid .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Materjalid ja meetodika.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1. Kasutatud bakteritüved.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2. Nakatamine .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.3. Proovide võtt ning mäda kaalumine.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.4. Lahjendused ja väljakülvid .....</b>	<b>14</b>

2.2.5. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon .....	14
2.2.6. DNA elektroforees .....	15
2.2.7. 16S rRNA DNA sekveneerimine .....	16
2.3. Tulemused ja arutelu .....	17
2.3.1. Mäda hulga võrdlus SCRI1043- ja T6::Cm-ga nakatatud kartulites. ....	17
2.3.2. Kultiveeritavate bakterite hulk kartulis .....	18
2.3.3. <i>P. atrosepticumi</i> hulk kultiveeritavate bakterite hulgas.....	19
2.3.4. Kultiveeritavate bakterite hulk Amp ja PolyB agari peal.....	21
2.3.5. Kartulimugulas olevad kultiveeritavad bakterid .....	23
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>27</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>28</b>
<b>TÄNUAVALDUSED .....</b>	<b>29</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>29</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....</b>	<b>35</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>36</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

Amp	ampitsilliin
<i>Pa</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
QS	hulgatunnetus (ing. k. Quorum-Sensing)
HSL	homoseriinlaktoon
PGPR	taime kasvu edendavad risosfääri bakterid (ing.k plant growth-promoting rhizobacteria)
PCWDE	rakuseina lagundavaid ensüümid (ing. k. plant cell wall degrading Enzymes)
PGA	polügalakturoonhape
Cm	klooramfenikool
Rnaas	ribonukleas
T1SS	tüüp 1 sekretsioonisüsteem
T2SS	tüüp 2 sekretsioonisüsteem
T3SS	tüüp 3 sekretsioonisüsteem
T4SS	tüüp 4 sekretsioonisüsteem
T5SS	tüüp 5 sekretsioonisüsteem
T6SS	tüüp 6 sekretsioonisüsteem
OMP	välimise membraani valk (ing.k. outer membrane protein)
ABC	ATP-ga ühilduv transporter (ing.k ATP-binding cassette transporter)
MFP	membraane ühendav valk (ing.k. membrane fusion protein)
R2A	Reasoni R2A agar
PGA	polügalakturoonhape
CMC	karboksümetüülselluloosi

## SISSEJUHATUS

Järjest rohkem kannatavad inimesed näljahäda ja vaesuse pärast. Inimeste arv, keda on vaja toita, aina kasvab, aga haritava maa suurus, jääb kas samaks või lausa väheneb. Seega tuleks leida lahendus probleemile, kuidas toidusaaki suurendada. Kartulikasvatusel on maailmas väga suur roll, sest ta on suuteline kasvama erinevates kliimaatilistes tingimustes (Diallo jt., 2011). Arvatavasti oleks kartulikasvatus veelgi laiahaardelisem, kuid kartuleid vaevavad mitmed haigused, mis rikuvad taime nii põldude peal kui ka saagihoidlates. Kokku kannatab erinevate patogeenide ja putukate tõttu kuni 25% kogu kartuli toodang (Priou, 1996; FAO, 2008). Ühed suurimad kartulisaagi pärssijad on sugukonda *Enterobacteriaceae* kuuluvad *Pectobacterium ssp.* esindajad, mis tekitavad kartulis märgmädanikku.

Kui vaadelda bakterite kogumikku pealt steriilitud ja *Pectobacteriumi*-ga nakatatud kartulimugulas, siis on näha, et hoolimata kartuli steriilimisest, on kartuli mugula sees erinevaid baktereid, kes on suutnud muidu bakteritele halvad tingimused üle elada, päris palju. Seetõttu arvatakse, et märgmädanik on tekitatud palju mitmekesisema bakterite populatsiooni kaasabil, kui ainult tuntud taimepatogeen *Pectobacterium* (Kõiv jt., 2013).

Bakterirakkudel on 6 erinevat tüüpi sekretsioonisüsteemi, mis aitavad neil ümbritsevas keskkonnas toime tulla. Viimasel ajal kõige rohkem tekitab põnevust just tüüp 6 sekretsioonisüsteem. Selle süsteemi kindlad funktsioonid on teadmata, kuid on näidatud, et sellel sekretsioonisüsteemil on suur osa bakteri virulentsusel ning erinevate bakteriliikide omavahelistel interaktsioonidel (Filloux, 2013).

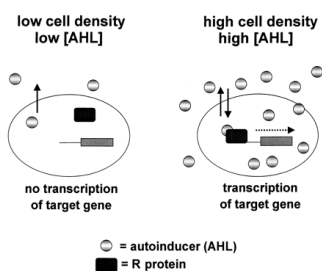
Töö eesmärgiks on uurida *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*) virulentsust kartulimugulale ning teada saada, millised mikroorganismid kartulites pesitsevad ja kuidas osaleb nende omavahelisel suhtlemisel T6 sekretsioonisüsteem.

# 1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. *Pectobacterium atrosepticum*

Selle töö uurimisobjektiks on bakter nimega *Pectobacterium atrosepticum*, mida algselt tunti nime all *Erwinia carotovora* ja esmakordselt isoleeriti porgandist (Gardan jt., 2003). Tegemist on Gram-negatiivse, fakultatiivse anaeroobse bakteriga, sugukonnast *Enterobacteriaceae*, mida võib leida nii mullast, putukate sisikonnast, kui ka veest. See on pulga-kujuline bakter, mis ei moodusta spore ning saab kõige paremini hakkama temperatuurivahemikus 27- 30 °C. *Pa* on meil üks levinumaid taimepatogene, mis põhjustab kartulis märgmädanikku. Lisaks kartulile nakatab *Pa* ka teisi köögivilju, nagu näiteks porgandeid, kurke, sibulaid, tomateid, salateid ja lilledest näiteks iirist.

Kõige suurem probleem põllumajanduses on bakterite lakkamatu sissetung kartulite ja teiste köögiviljade põldudele või ladudesse, mis põhjustavad nende taimede kudede pehmeks ja vesiseks muutmise, mis lõpuks lähevad limaseks ning hakkavad vastikult haisema. Kuidas *Pa* seda teeb, seisneb tema võimes produtseerida ja sekreteerida väliskeskkonda ekstratsellulaarseid ensüüme ehk virulentsusfaktoreid, mis suudavad lagundada taimeraku kesti. Nendeks ensüümideks on tsellulaasid, pektinaasid ja proteaasid, mis lagundavad tselluloosi, pektiini ja valke (Agrios, 1997). Nende virulentsusfaktorite produtseerimine on kontrollitud rakkudevahelise suhtluse hulgatunnetuse (QS) ja N-atsüül homoseriinlaktooniga (AHL) (Joonis 1). Kui bakterid tunnetavad ära teatud AHL kontsentratsiooni rakust väljas, tekib reaktsioonide kaskaad, mis paneb bakteri tootma virulentsusfaktoreid (Pirhonen jt., 1993)



Joonis 1. Virulentsusfaktorite sünteesi regulatsioonisüsteem hulgatunnetusega (QS).

Hulgetunnetuse kaskaadi viimaseks reguleerivaks etapiks on valk RsmA, mis omakorda kuulub Rsm-regulatsioonisüsteemi. See süsteem koosneb RsmA-st, mis mõjutab ekstratsellulaarsete ensüümide mRNA-de stabiilsust ning *rsmB*-st, mis on väike reguleeriv RNA (Cui jt., 1995; Liu jt., 1998). RsmA-l on negatiivne mõju virulentsusfaktorite sünteesile, kuna seondub sihtmärk mRNA-le, blokeerides mRNA-lt translatsiooni, mille tõttu mRNA muutub ebastabiilseks ning see lagundatakse RNAaside poolt. *RsmB*-RNA on RsmA antagonist, mis eemaldades RsmA virulentsusgeenide mRNA-delt, võimaldab virulentsete geenide ekspresiooni rakus (Liu jt., 1998).

## **1.2. *Pectobacterium* ei ela üksi, kes veel?**

On kindlaks tehtud, et *Pectobacterium wasabiae*-ga nakatunud kartulis ei ela *Pw* üksi. Kui uuriti eelnevalt kartuli pinda steriilitud ning hiljem *P.w*-ga nakatunud kartulit, näitasid tulemused, et kartuli mädanikus oli väga suur ja mitmekesine bakterite kogukond. See võis tulla sellest, et kartulikoos oli mingi väike lõhe, kust bakterid sisse olid saanud või kartuli enda sees olid juba enne (kasvamise käigus) teised bakterid (Kõiv jt., 2013).

Valk RsmA on posttranskriptsiooniline regulaator, läbi mille kohandatakse virulentsusfaktorite sünteesi (Kõiv ja Mäe, 2001). Katses, kus vaadeldi *Pw* *rsmA*<sup>-</sup> tüve tekitatud haiguskoldeid, kus oli näha, et bakterite arvukus oli väga suur. *RsmA*<sup>-</sup> tüvi toodab väga suures koguses taime rakukesta lagundavaid ensüüme, kuid ise on nõrga kasvuga, tekitades sellega rakukesta laguprodukte - suhkruid, mis võivad olla toiduks teistele kartulimugulas resideeruvatele mikroobidele, kellel endal rakukesta lagundamisvõimet ei ole. Samad tulemused saadi ka metsiktüüpi bakteriga. Seega arvatakse, et kartuli kudede märgumine ja lagunemine ei pruugi olla tekitatud vaid ühe bakteritüve olemasolul, vaid väga mitmekesise bakteripopulatsiooni esinemisel (Kõiv jt., 2013).

### **1.2.1. Endofüüdid taimedes**

Endofüüdid on bakterid või seened, mis koloniseeruvad taime sisemistesse kudedesse ilma, et nad kahjustaksid taime või kutsuks esile tugevaid kaitsevastuseid. Erinevalt endosümbiontidest, ei ela nad ümbritsetud membraaniga ruumides ega elavates taimerakkudes. Kuigi ei ole palju teadmisi endofüütsete interaktsioonide kohta, on siiski teada, et paljud endofüütsed bakterid on taimedele head. On näidatud, et endofüüdid aitavad

paremini taimedel kasvada, stressis hakkama saada, toitaineid kätte saada ning patogeenide vastu võidelda. Kultivatsiooni-põhiste uuringute tulemused on näidanud, et endofüütsete bakterite hulk on lai. Kõige rohkem on endofüüte *Proteobacteria* hõimkonnast, aga ka *Firmicutes*-e, *Actinobacteria* ja *Bacteroides*-e hõimkonna seast. Kõige rohkem koloniseeruvad endofüüdid taimes epidermi ja väliskihi intertsellulaarsetesse ruumidesse ning lüüsunud taime rakkudesse (Reinhold-Hurek ja Hurek, 2011).

### 1.2.2. Endofüüdid kartulis

Inimeste toidulaua mängib väga suurt rolli kartuli. Kartuli saak sõltub sellest, kuidas suudetakse kontrollida erinevaid mikroobilisi haigusi, mis pär�ivad kartuli kasvu ja säilimist. Selleks on oluline teada, millised on kartuli endofüüdid. Uuringud näitavad, et kartuli risosfääris, mükorisosfääris ja endoriias on väga mitmekesine ja tihe mikroobide kogukond. Kõige suuremad bakterite populatsioonid on taime risosfääris. Risosfääris on 100-1000 korda tihedam populatsioon, kui endoriisa intertsellulaarsetes ruumides (Krechel jt., 2002; Berg jt., 2005; Rasche F, 2006). Kõige rohkem on taime risosfääris baktereid perekonnast *Agrobacterium*, *Bacillus* ja *Pseudomonas*, aga ka vähemas ulatuses on taime lähedalt leitud *Arthrobacter*, *Comamonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Variovorax* ja *Xanthomonas* perekonna esindajaid. Just perekonna *Pseudomonas* bakterid on suure huvi all, sest neil on taime kaitsmisel suur roll. Arvatakse, et suur osa teisi bakterite perekondi, mis seostuksid kartuliga, on veel täiesti avastamata.

Mõnedel risosfääri bakteritel on positiivne mõju taimede kasvule. Neid baktereid kutsutakse taime kasvu edendavateks risosfääri bakteriteks (PGPR) (Compant jt., 2005). PGPR suudavad stimuleerida taime kasvu tänu hormoonide sünteesile ja varustades taime talle sobivate toitainetega. Kasvu edendamine võib olla seotud ka patogeenide kahjuliku mõju maha surumise ja selle ennetamisega. On näidatud, et kasvatades kartuliseemneid koos pseudomonaadidega on kartulite saak 10% suurem võrreldes nendega, mis kasvasid ilma pseudomonaadideta (Burr, 1978; Kloepper, 1980). Kokkuvõttes on kasvu paranemist näidatud varre, stooloni ja mugula juures (Kloepper, 1981; Van Peer, 1989; Frommel, 1993).

Uuritud on ka baktereid, mis kaitseksid taime, patogeenide *Proteobacteria* ja *Firmicutes* hõimkonnast. Esimestes uuringutes vaadati taimepatogeeni *Erwinia carotovora* (praegune

*Pectobacterium*) vastu võitlevaid pseudomonaade. Katse tulemused näitasid, et mõnedel pseudomonaadidel tekkisid kaitsevastused taimepatogeeni vastu. Ometi mitmetes teistes katsetest ilmnis, et paljud *Pseudomonas* perekonna kandidaadid ei andnud positiivseid vastused *Pectobacterium*-i tekitatud haiguse maha surumisele. Kuna kõik need tulemused ei andnud positiivset vastust, hakati otsima teisi bakteri kandidaate, mis võiksid kaitsta taimi patogeenide eest. Kuna ka *Bacillus* perekonna bakterid jäid silma oma visadusega taluda stressitingimusi ja ka andes mingisuguseid kaitsevastuseid taimedele, hakati tegema katseid nendega (Jacobsen jt., 2004). Uuriti *Bacillus subtilis* tüvesid koos kartuli haigusi tekitavate *Pectobacterium*-ga ning leiti, et vähenesid *Pectobacteriumi* poolt tekitavate lagunenenud kudede arv (Sharga ja Lyon, 1998). Nendel teatud tüvedel, mis andsid kaitsevastusi, on kas antibiootiline aktiivsus patogeenide vastu, suur võime koloniseeruda taime juurele või võime tekitada kartuli taimele resistentsust patogeenide vastu (Diallo jt., 2011).

### **1.3. Sekretsioonisüsteemid Gram-negatiivsetes bakterites**

Kõik bakterid peavad suutma taluda raskeid keskkonna tingimusi. Selleks on kõikidel Gram-negatiivsetel bakteritel kuus erinevat valkude sekretsioonisüsteemi, millega nad suudavad valke viia, kas rakuvälisesse ruumi või kohe otse peremeesraku tsütosooli (Records, 2011).

#### **1.3.1. T1SS**

Esimest tüüpi sekretsioonisüsteemiga (T1SS) saab bakter sekreteerida ühe sammuga tsütoplastmast ekstratsellulaarsesse ruumi palju erineva suurustga ja funktsiooniga valke ja toksiine. See sekretsioonisüsteem koosneb kolmest erinevast valgust: välismembraani valgust (OMP) ja kahest tsütoplastmas asuvast valgust, ATP-siduvast valgust (ABC) ning membraane ühendavast valgust (MFP). Kõigepealt peab olema valgul C-terminaalne sekretsiooni signaal, mis tunneb ära ABC valgu, mis omakorda viib kogu selle valgu rakust välja. See sekretsioonisüsteem transpordib mitmeid erinevaid hüdrolaase, nende hulgas näiteks proteaase (Delepelaire, 2004). T1SS abil viiakse välja *Pectobacteria*-s virulentsusfaktorit proteaasi (Marits jt., 1999).

### **1.3.2. T2SS**

Teist tüüpi sekretsioonisüsteem (T2SS) e. Sec-sõltuv sekretsioonisüsteem on kaheosaline süsteem, kus alguses viiakse valk läbi tsütoplasma membraani periplasmasse Sec või Tat raja kaudu ning hiljem läbi välismembraani. Valk, mida tahetakse sekreteerida, peab olema N-terminaalse signaaliga. See eemaldatakse periplasmas, kus ka valgu konformatsioon muutub, ja valmis valk saab liikuda läbi välismembraani. Selle mehhanismiga sekreteeritakse paljusi toksine ja rakuseina lagundavaid ensüüme (PCWDE) näiteks pektinaase ja tsellulaase (Filloux, 2004).

### **1.3.3. T3SS**

Tüüp 3 sekretsioonisüsteem (T3SS) on väliselt sarnane süstlaolisele struktuurile. T3SS geenid asuvad Hrp lookuses. Selle mehhanismiga saab bakter viia valgud otse eukarüootsetesse peremeesrakkudesse. Valgud, mis tahavad läbida T3SS, peavad omama N-terminaalset signaali ning seejärel viiakse nad ühe sammuga läbi bakteriraku membraani ja eukarüootse plasmamembraani. Seda mehhanismi kasutavad enamasti patogeenid toksiinide või aktiivsete valkude viimiseks peremeesrakku (Cornelis, 2006).

### **1.3.4. T4SS**

Võrreldes teiste sekretsioonisüsteemidega on tüüp 4 sekretsioonisüsteem (T4SS) kõige mitmekülgsem. See suudab viia palju erinevaid makromolekule, DNA-d ja valke otse eukarüootsetesse peremeesrakkudesse, et tekitada seal infektsioon või manipuleerida nende füsioloogiat. T4SS sarnaneb bakterite konjugatsioonielemendiga, peale selle, et bakter suudab DNA-d ja valke viia peremeesrakkudesse, haarab ta sealt vastu bakterielutegevuseks vajalikke makromolekule (Voth jt., 2012).

### **1.3.5. T5SS**

Tüüp 5 sekretsioonisüsteem (T5SS), mida kutsutakse ka autotransportesüsteemiks on samamoodi kaheosaline süsteem nagu ka T2SS. Selleks, et valk läbiks tsütoplasmaatilise

membraani, peab valgul olema N-teminaalne signaal, tänu millele saab valk liikuda periplasmasse Sec süsteemi abil. Valkudel, mis on liikunud periplasmasse on võime moodustuda poore, mis lükkavad ennast välismembraani sisse, mille kaudu saab valk läbi välismembraani liikuda (Gerlach ja Hensel, 2007).

### **1.3.6. T6SS**

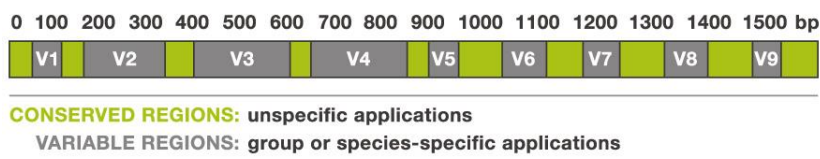
Kõige esimesena kirjeldati tüüp 6 sekretsioonisüsteemi (T6SS) 2006. aastal Mekalanose laboris (Mougous jt., 2006; Pukatzki jt., 2006). Sellest ajast saadik on leitud aina rohkem informatsiooni selle sekretsioonisüsteemi kohta. Kui vaadeldi T6SS geene, siis nähti seal suurt sarnasust T4 faagi infektsiooni mehhanismile. T6SS on nagu pööratud faagi saba, mis viib valgud rakust välja või otse sisestab need peremeesraku sisse (Cascales, 2008; Leiman jt., 2009; Bonemann jt., 2010). Paljud asitõendid näitavad, et T6SS on üks virulentsusfaktoritest (Potvin jt., 2003; Pilatz jt., 2006; Pukatzki jt., 2007; Schell jt., 2007; Shalom jt., 2007; Wang jt., 2009; Suarez jt., 2010). Kuid on näidatud ka, et T6SS lookused on kõrgelt konserveerunud ka mittepatogeensetes bakterites. Sellest ajast alates on otsitud palju erinevaid kohti, kus T6SS-i võib veel vaja olla. Kuigi T6SS kõik täpsed funktsioonid on teadmata, on näidatud, et see on ka väga tähtis suhtlusvahend erinevate bakterite ja eukarüootide vahel (Records, 2011).

### **1.4. Kultiveerimine**

Sellest ajast alates, kui mikroorganismid avastati, on otsitud võimalusi, kuidas saaks mikroorganisme kultuuris üles kasvatada ning nendega eksperimente läbi viia. Meetodid on varieerunud päris palju. Algul kasutati erinevate mikroobide kasvatamiseks nii liha puljongit, kui ka kartulit, hiljem želatiini. Nüüd kasutatakse laborites eelkõige agaril põhinevaid söötmeid, kuna želatiin laguneb kõrgemate temperatuuride juures ning bakterid, mis toodavad proteolüütilisi ensüüme võivad selle ära lagundada (Reasoner, 2004). Selleks, et mikroorganismid agari peal kasvaksid, tuleb söötmesse lisada erinevaid kasvuks vajalikke lisandeid. On näidatud, et parim sööde erinevate mikroobide koos kasvatamiseks on Reasoneri agar (R2A). See agar töötati välja puhta joogivee heterotroofsete mikroorganismide uurimisel. See on minimaalsööde, mis pikema aja ja madalama temperatuuri juures inkubeerimisel suudab stimuleerida nii stressis olevate, kui ka kloori vastu tolerantsete bakterite kasvu (Reasoner ja Geldreich, 1985).

## 1.5. 16S rRNA DNA sekveneerimine

Kuigi on olemas palju erinevaid selektiivsõotmeid, millega erinevaid mikroorganisme eristada, ei anna selline meetod päris täpseid tulemusi. Selleks on hakatud kasutama 16S rRNA DNA sekveneerimist, mis võimaldab kindlaks teha ka mittekultiveeritavaid ja aeglaselt kasvavaid baktereid. Kuna kogu bakteri genoomi sekveneerimisel ei ole mõtet, on hakatud kasutama 16S rRNA määrava geeni sekveneerimist. Seda kasutatakse sellepärast, et see geen on olemas kõikides bakterites, geeni funktsioon ei ole aja jooksul väga muutunud ning on väike (1,500 bp), kuid samas sisaldab piisavalt informatsiooni kõige vajaliku kohta (Janda ja Abbott, 2007). Geen koosneb konserveerunud regioonidest ja üheksast varieeruvast regioonist, milles on spetsiifilised saidid, tänu millele saab mikroorganisme määratleda.



**Joonis 2.** 16S geen, mis koosneb nii konserveerunud regioonidest, kui ka varieeruvatest regioonidest.

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Antud bakalaaurusetöö eesmärgiks on uurida taimepatogeeni *Pectobacterium atrosepticum*-i ning endofüütseid baktereid kartulimugulas. Selleks püstitati järgmised küsimused:

- Kes elab steriilses kartulis.
- Mis toimub kartulis mädanemise jooksul?
- Kas tüüp 6 sekretsioonisüsteem mõjutab endofüütide populatsiooni kartulis?

### **2.2. Materjalid ja meetodika**

#### **2.2.1. Kasutatud bakteritüved**

Antud töös kasutati kartulite (Ants) nakatamiseks *P. atrosepticum*i tüvesid wt SCRI1043 (Hinton jt., 1985) ja T6::Cm, mis saadi J.Nykyri käest (J. Nykyri, avaldamata). Rakke kasvatati üleöö M9 minimaalsöötmes, mis sisaldas ainsa süsinikuallikana 0,4% PGA-d. Seejärel tsentrifuugiti bakterirakud põhja 5000 pööret minutis 5 minutit ning saadi kätte supernatant. Supernatant omakorda filtreeriti läbi 0,2 µm poori läbimõõduga filtri, et kõikidest bakteritest kindlasti lahti saada. Rakud suspendeeriti taas 10 mM MgSO<sub>4</sub>-ga üles ning tehti lahjendusrida. Esimesed lahjendused tehti MgSO<sub>4</sub>-ga ning viimane lahjendus tehti filtreeritud supernatandiga. Kartulite nakatamisel kasutati 10<sup>-5</sup> lahjendust.

#### **2.2.2. Nakatamine**

Kartulimugulaid pesti kraaniveega ning hoiti 3 tundi vee sees, pärast seda steriiliti kartuleid 10 minutit 10% Na-hüpokloritiga. Hiljem loputati kartuleid kolm korda steriilse veega ja üks kord 96° etanooliga ning lasti õhu käes kuivada. Mugulad asetati kõik eraldi steriilsetesse plastmassist karpidesse, kus oli märg rätik all (tehti märjaks u. 30 ml H<sub>2</sub>O ga) ning karp oli pealt kaanega kaetud. Igasse kartulisse tehti pipetiotsikuga auk ning pipeteeriti sinna sisse

vastavalt 30 µl SCRI1043 või T6::Cm raku suspensiooni ( $5 \times 10^5$ ). Nakatatud kartuleid inkubeeriti pimedas ruumis ning toatemperatuuril vastavalt ajapunktidele 2, 5, ja 8 päeva. Katses kasutati Märtsikuu kartuleid.

### **2.2.3. Proovide võtt ning mäda kaalumine**

Esimesed proovid võeti teisel päeval pärast nakatamist viiest kartulist, mis olid nakatatud metsiktüvega SCRI1043 ja viiest kartulist, mis olid nakatatud tüvega T6::Cm-ga. Kartul lõigati steriilse noaga pooleks ja steriilse skalpelliga kraabiti tekkinud mäda 5ml-sse tuubidesse. Järgmisena kaaluti mäda ning lisati sinna võrdses mahus steriilset 0,9% NaCl lahust. Teisel (5. päev) ning kolmandal (8. päev) ajapunktil korrati nakatatud kartulitega täpselt sama protsessi, mida tehti esimesel ajapunktil, ainult kolmandas ajapunktis võeti kaalumisele kokku 16 kartulit, sest neid jäi lihtsalt üle. Tekkinud mäda kasutati bakterite arvukuse määramiseks ning nende identifitseerimiseks.

### **2.2.4. Lahjendused ja väljakülvid**

Kõikidest saadud mäda ja 0,9% NaCl segudest tehti  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  lahjendusread ning nendest omakorda tehti väljakülvid erinevatele söötmetele. Terve bakteripopulatsiooni arvukuse määramiseks kartulis kasutati R2A agarit (LabM). Pseudomonaadide arvukuse määramiseks kasutati R2A agarit, millele oli lisatud ampitsiliini (150 µg/ml) ning erinevate batsillide määramiseks kasutati R2A tassi, millele oli lisatud Polümüksiin B-d (5µg/ml). Mäda väljakülv tehti ka tärklise tassi peale, et vaadata, kes kartulis olevatest bakteritest tärklis sööb.

Selleks, et eristada *Pa*-d teistest kartulimugulas olevatest kartulitest, testiti erinevaid bakterikolooniaid PCWDE produktsiooni järgi indikaatortassidel. Selleks kasutati polügalakturoonhappe (PGA), karboksümetüültselluloosi (CMC) ja piima agari tasse.

### **2.2.5. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon**

Bakterite identifitseerimiseks kasutati 16S rRNA DNA järjestusi. Selleks oli vaja PCR-iga amplifitseerida erinevates bakteritüvedes 16 rRNA geen. PCR-i maatriksina kasutati

bakterirakkude lüsaati. Rakud suspendeeriti 50 µl-s steriilses vees ning lüüsi suspensioone PCR-i masinas 15 minutit 97 °C juures. Pärast tsentrifuugiti suspensiooni 15 000 p/min 5 minutit ja PCR-i maatriksiks kasutati supernatanti, mis sisaldas märklaud DNA-d.

PCR'i reaktsioonisegu üldmaht oli kokku 20µl. Reaktsioonisegu sisaldas: 1x PCR-i puhvrit (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20); 0,2 mM dNTP mix-i (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4 pmol praimerit PCRI ja PCRII (Tabel 1.0); 0,009 u/µl Taq DNA polümeraasi (Fermentas); 2 µl märklaud DNA-d ning reaktsiooni maht viidi 20µl-ni autoklaavitud veega.

PCR'i reaktsiooni etapid:

1. 95°C algne denaturatsiooni, DNA polümeraasi aktivatsioon 5 minutit
2. 95°C DNA denaturatsioon 45 sekundit
3. 52°C Praimerite seondumine DNA-le 45 sekundit
4. 72°C DNA süntees 1 minut ja 30 sekundit
5. 72°C lõpusüntees 10 minutit

Etappe 2-4 oli kokku 30 tsüklit

**Tabel 1. Töös kasutatud praimerid**

NIMI	JÄRJESTUS (5'→3')
PCRI	5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'
PCRII	5'TACGGTTACCTTGTTACGACTT 3'
SEQ1	5'GTATTACCGCGGCTGCTGG 3'
SEQ2	5'TTGCGCTCGTTGCGGGACT 3'
SEQ2F	5'AGTCCCGCAACGAGCGCAA 3'

## 2.2.6. DNA elektroforees

PCR-i produktide vaatlemiseks ning pikkuse kontrollimiseks kasutati geelelektroforeesi.

Selleks lisati PCR produktile 2/5 üldmahust markervärvi, mis sisaldas 0,04%

broomfenoolsinist 50%-lises glütseroolis ning kanti 1%-lisele agarosgeelile. Geeli

valmistamiseks kasutati 0,5x TAE puhvrit (50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA pH 8,2),

agaroosi pulbrit ja etiidiumbromiidi (0,5 µg/ml). Elektroforees viidi läbi pingel 100 volti 0,5x

TAE puhvril. Selleks, et kontrollida PCR-i produktide õiget suurust, kasutati suurusmarkerina

1 kb DNA markerit (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). DNA fragmente visualiseeriti UV valguses (302 nm).

### **2.2.7. 16S rRNA DNA sekveneerimine**

Igast kartulist valiti välja 50 esimest bakterit, need külvati omavaheliseks eristamiseks 6-le erinevale söötmele: CMC (0,1%), PGA(0,4%), Piim, tärklise sööde (Heinaru, 2011), tsitraadi sööde (Heinaru, 2011), R2A+ampitsilliin (Amp; 150 µg/ml). Nende söötmete põhjal grupeeriti bakterid ning sekveneeriti kõigi gruppide esindajate 16S rRNA DNA.

Sekveneeritud järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi BioEdit

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) ning sekveneerimisel saadud DNA nukleotiidseid järjestusi võrreldi BLASTN programmiga

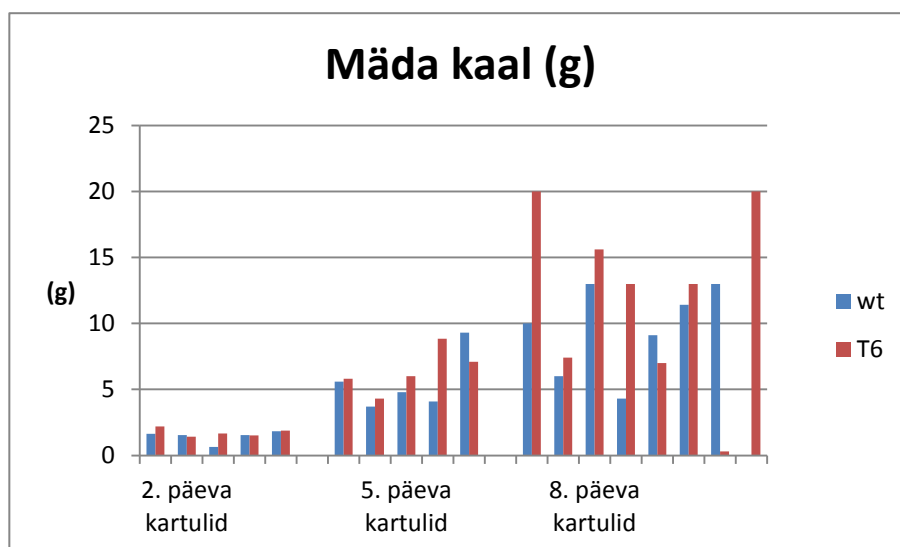
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) NCBI GenBank andmebaasis olevate nukleotiidsete järjestustega ja programmi RDP Release 11. (The Ribosomal Database Project).

Proovid viidi sekvereerimisele Eesti Biokeskuse DNA sekveneerimise tuumiklaborisse, milles kasutati paraimereid SEQ1, SEQ2 ja SEQ2F tabelis 1.

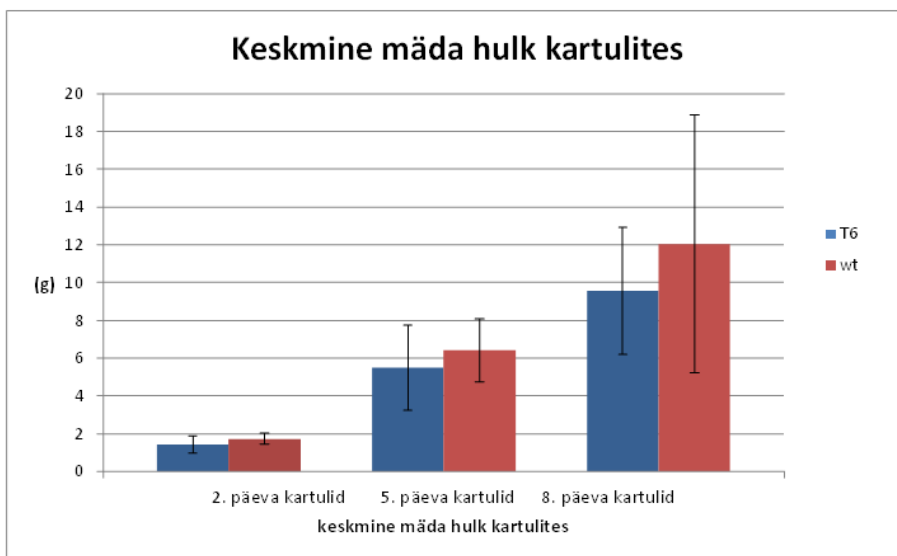
## 2.3. Tulemused ja arutelu

### 2.3.1. Mäda hulga võrdlus SCRI1043- ja T6::Cm-ga nakatatud kartulites.

Selle töö eesmärgiks oli vaadelda kultiveeritavate bakterite arvukuse muutust mädanemise käigus. Selleks nakatati kartuleid nii wt *Pa*-ga, kui ka T6SS *knockout*-iga ning uuriti neid kolmel erineval ajapunktil: teisel, viiendal ja kaheksandal päeval pärast nakatamist. T6SS tähtsust veel päris täpselt ei teata, kuid Mattineni jt., 2008 töös toodi välja, et T6SS *knockout Pa*-s tekitab suuremat virulentsust kartulis, kui wt. Esmalt võrreldi ka selles katses mõlema bakteritüvega nakatatud kartulite mäda hulka. Mäda kaaluti esimese ja teise ajapunktis kummagi tüvega nakatatud viiel kartulil. Viimases ajapunktis kaaluti mäda seitsmel kartulil, mis olid nakatatud metsiktüvega ning kaheksal kartulil, mida oli nakatatud T6 sekretsioonisüsteemi *knockout*-iga. Iga ajapunkti mäda kaalu tulemused on välja toodud joonistel 3. Mäda kaalutistest arvutati keskmised ning standardhälve, need on näha joonisel 4. Vaadates jooniseid 3 ja 4 saab teha järeldused, et ka selles töös tekitasid T6SS *knockout*-iga nakatatud bakterid kartulis veidike suuremat virulentsust, kui nakatatud metsiktüvi, kuid see erinevus ei jää vea piiridesse. Eriti suur kõikumine mäda hulgas on 8 päeva mädanenud kartulitel. Nii suure varieeruvuse korral oleks pidanud katses olema väga palju rohkem kartuleid.



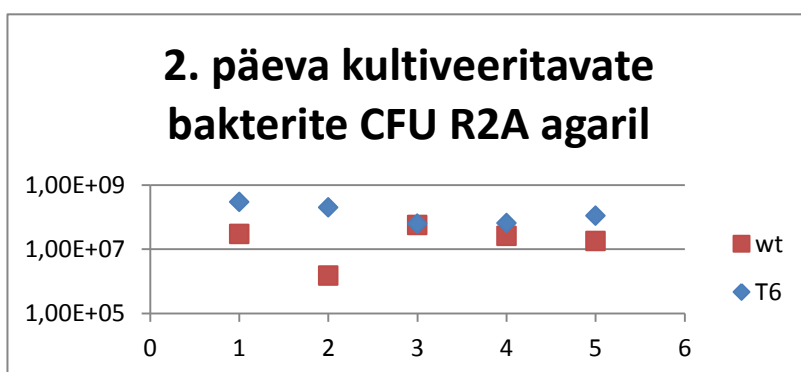
Joonis 3. Kõikide kartulite mäda hulk (g), 2, 5 ja 8. päeval.



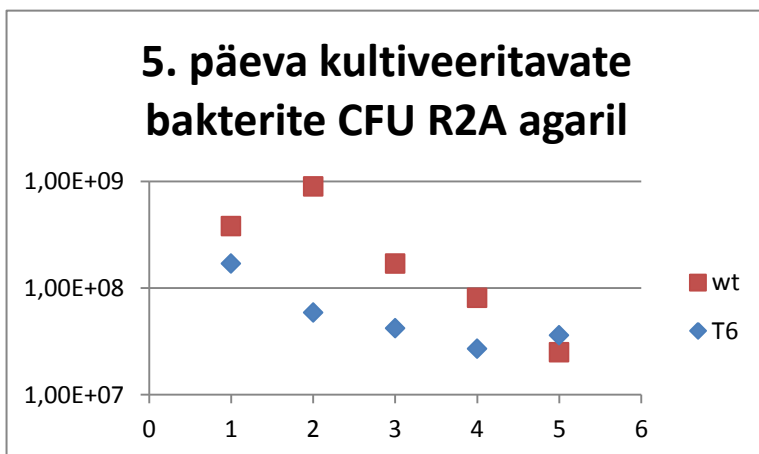
**Joonis 4. Keskmine mäda hulk kartulis 2, 5 ja 8. päeval pärast nakatamist. Joonisel on välja toodud nii wt kui ka T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulite mäda kaalu keskmiste standardhälved.**

### 2.3.2. Kultiveeritavate bakterite hulk kartulis

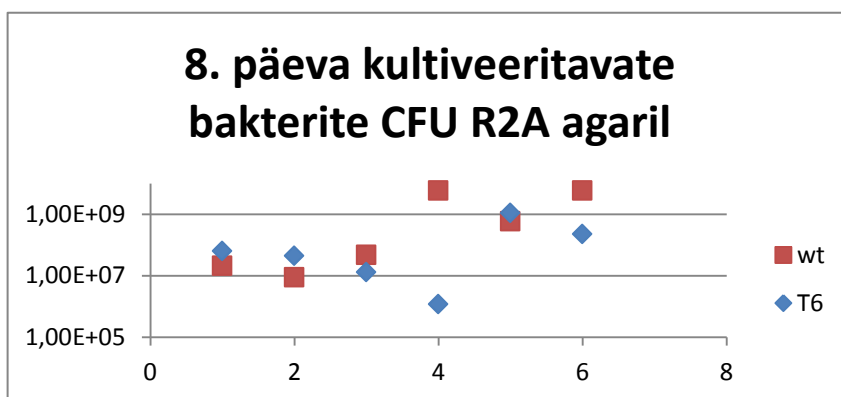
Selleks, et uurida mikroobide populatsiooni *Pa*-ga nakatatud kartulimugulates, vaadeldi töös ka üldist kultiveeritavate bakterite arvu igas kartulis eraldi. Selleks külvati mädast tehtud lahjendused R2A tassile. Tassi kultiveeriti 30 °C juures ning kolooniad loeti üle 48 tunni pärast ning kontrolliti veel kolooniate juurdekasvu nädala jooksul. Saadud tulemuste põhjal arvutati CFU/g mädanenud koe kohta. Joonisel 5, 6, ja 7 on välja toodud R2A agari peal kasvavad kultiveeritavate bakterite hulk eraldi igas kartulis. Nagu joonistel 5-7 näha, kõigub bakterite arvukus vahemikus  $10^5$  –  $10^9$  suuresti, kuid olulist erinevust ka tüve wt ja T6SS *knockout* vahel pole märgata.



**Joonis 5. Esimesel ajapunktil saadud kultiveeritavate bakterite arvukused wt ja T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulitel R2A agaril.**



Joonis 6. Teisel ajapunktis saadud kultiveeritavate bakterite arvukused wt ja T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulitel R2A agaril.

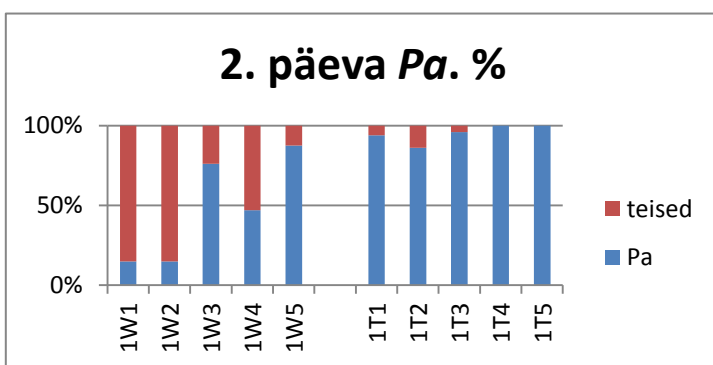


Joonis 7. Kolmandal ajapunktis saadud kultiveeritavate bakterite arvukused wt ja T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulitel R2A agaril.

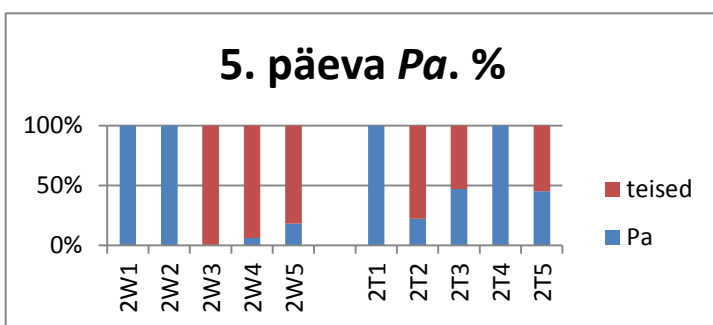
### 2.3.3. *P. atrosepticumi* hulk kultiveeritavate bakterite hulgas

Järgmisena vaadeldi selles töös *Pa*-i osa kultiveeritavate bakterite hulgas kõikides ajapunktides. *Pa* arvukuse määramise jaoks külvati kõige lahjema lahjendusega R2A tassilt 50 esimest bakterikolooniat erinevatele ekstratsellulaarsete ensüümide kontrollagaritele, et määrata fenotüüpide järgi bakterikolooniate klassid. Selleks kasutati polügalakturoonhappe (PGA), karboksümetüülselluloosi (CMC) ja piima agari tasse. Fenotüübi järgi leiti tassidelt *Pa* ning viidi kontrolliks sekveneerimisele. *Pa* osakaal arvutati välja nende 50 esimese koloonia kohta. Need tulemused on toodud joonistel 8, 9 ja 10. Jooniseid vaadates saab teha järeldused, et 2. päeval pärast nakatamist oli *Pa* hulk veel suhteliselt hästi säilinud, kuid

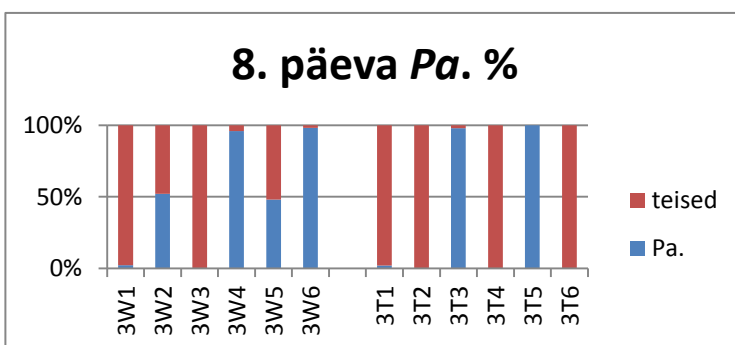
edasistel ajapunktidel olid juba teised bakterid *Pa*-st üle kasvanud. Järelduse, et *Pa* hulk T6SS *knockout*-ga nakatatud kartulil säilis paremini, saab teha ainult esimese ajapunkti joonist 8 vaadeldes. Teistes ajapunktides on *Pa*% igas kartulis erinev ning mingeid kindlaid järeldusi teha ei saanud.



**Joonis 8.** Esimesel ajapunktil saadud Pa% kõikidest kultiveeritavatest bakteritest wt ja T6SS *knockout*-iga nakatamisel.



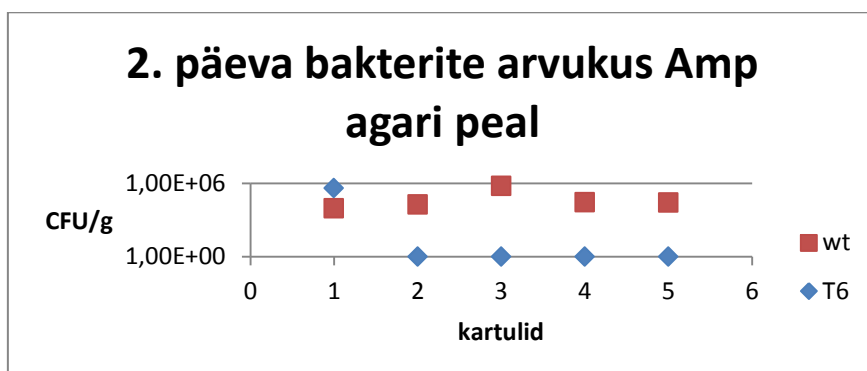
**Joonis 9.** Teisel ajapunktil saadud Pa% kõikidest kultiveeritavatest bakteritest wt ja T6SS *knockout*-iga nakatamisel.



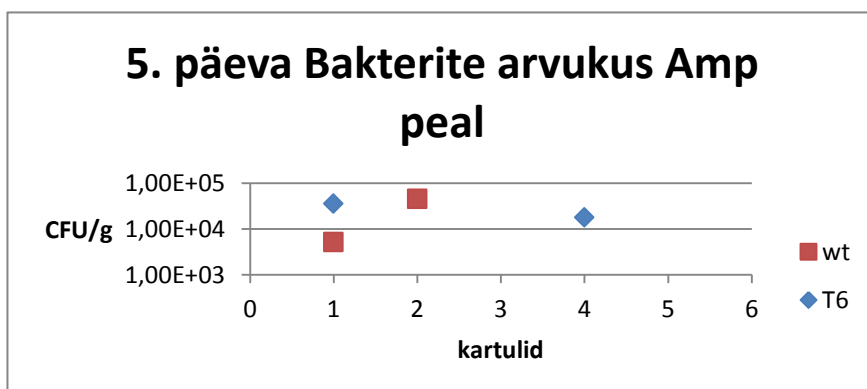
**Joonis 10.** Kolmandal ajapunktil saadud Pa% kõikidest kultiveeritavatest bakteritest wt ja T6SS *knockout*-iga nakatamisel.

### 2.3.4. Kultiveeritavate bakterite hulk Amp ja PolyB agari peal.

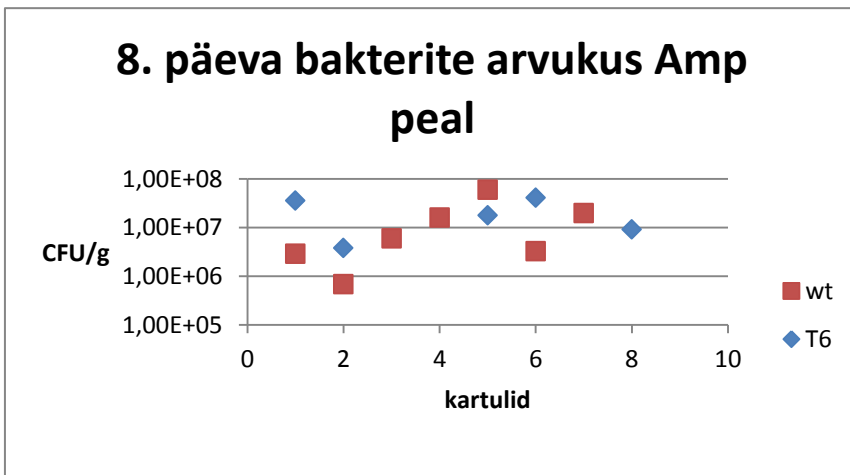
Kultiveeritavate bakterite arvukusi vaadati ka Amp ning PolyB agari peal. Amp tassi peale külvati sellepärast, et Amp (150 µg/ml) tassi peal suudavad kasvada pseudomonaadid ning nad on teatud Amp kontsentratsioonil resistentsed selle suhtes PolyB (5 µg/ml) tass võeti kasutusele kuna nii pseudomonaadid, kui ka enterobakterid on PolyB tundlikud ning seega sai sellelt tassilt vaadelda erinevate batsillide arvukust. Selline järeldus, et Amp tassi peal kasvavad pseudomonaadid ning et PolyB tassi peal kasvavad batsillid on suur üldistus, tassidel võib leiduda ka muid baktereid. Amp tassidel üleskasvanud bakterite arvukused on välja toodud joonistel 11, 12 ja 13 ning PolyB tassidel üleskasvanud bakterite arvukused on välja toodud joonistel 14, 15 ja 16. Ainuke erinevus, mis vaatlemisel tuli, oli esimesel ajapunktil Amp tassi peal (joonis 11). Seda joonist vaadates on näha, et wt-ga nakatatud kartulites on pseudomonaade rohkem, kui T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulites. Teistel ajapunktidel oli märgatav erinevus ära kadunud.



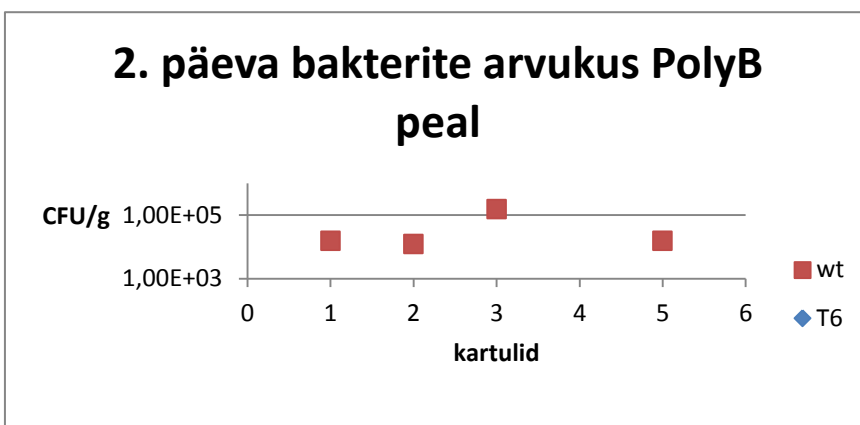
Joonis 11. Esimesel ajapunktil saadud kultiveeritavate bakterite arvukus mäda kaalu kohta Amp tassi peal. Iga märk tähistab erinevat nakatatud kartulit.



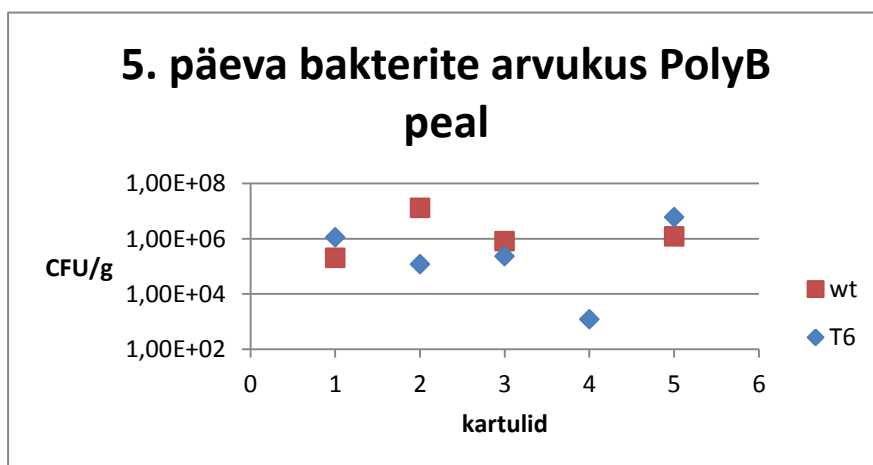
Joonis 12. Teisel ajapunktil saadud kultiveeritavate bakterite arvukus mäda kaalu kohta Amp tassi peal. Iga märk tähistab erinevat nakatatud kartulit.



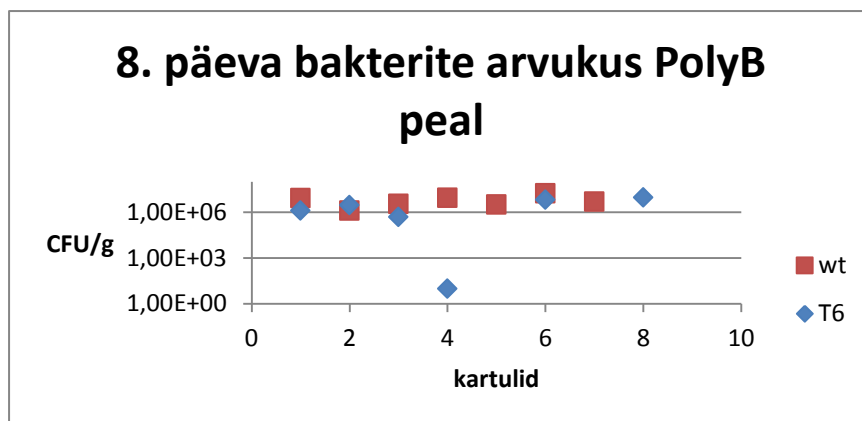
**Joonis 13.** Kolmandal ajapunktil saadud kultiveeritavate bakterite arvukus mäda kaalu kohta Amp tassi peal. Iga märk tähistab erinevat nakatatud kartulit.



**Joonis 14.** Esimesel ajapunktil saadud kultiveeritavate bakterite arvukus mäda kaalu kohta PolyB tassi peal. Iga märk tähistab erinevat nakatatud kartulit.



**Joonis 15.** Teisel ajapunktil saadud kultiveeritavate bakterite arvukus mäda kaalu kohta PolyB tassi peal. Iga märk tähistab erinevat nakatatud kartulit.



Joonis 16. Kolmandal ajapunktil saadud kultiveeritavate bakterite arvukus mäda kaalu kohta PolyB tassi peal. Iga märk tähistab erinevat nakatatud kartulit.

### 2.3.5. Kartulimugulas olevad kultiveeritavad bakterid

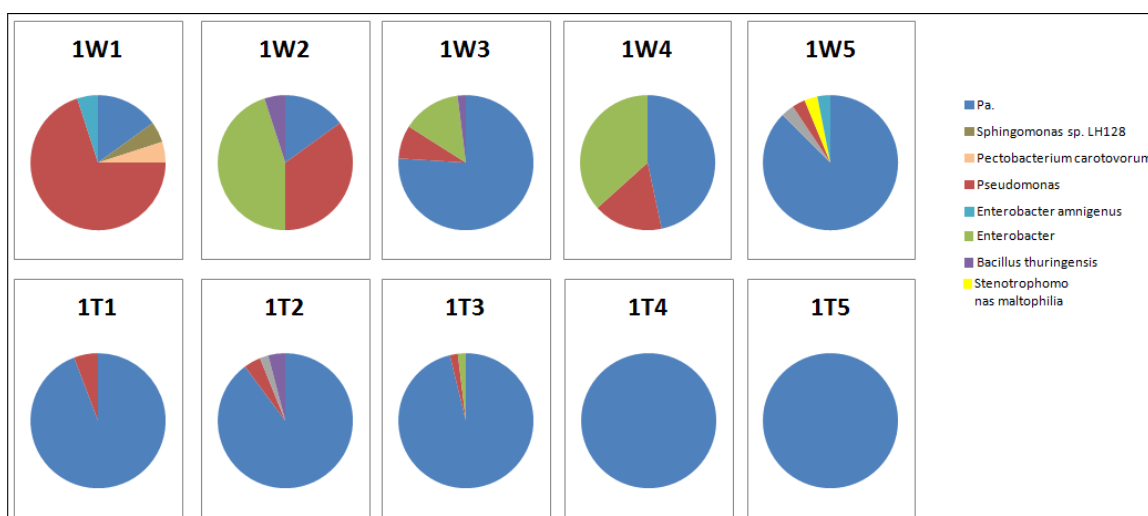
Kartulimugulas olevate kultiveeritavate bakterite tüved määrati ära 16S rRNA DNA sekveneerimis tulemuste põhjal BLASTN programmiga NCBI GenBank andmebaasis olevate nukleotiidsete järjestustega ja programmi RDP Release 11 (The Ribosomal Database Project). Joonisel 17, 18 ja 19 on välja toodud kõikide ajapunktide nakatatud kartulite põhilised mikroobipopulatsioonid. Kõik bakteritüved, mis saadi kätte kahe erineva tüvega nakatatud kartulitest on välja toodud fülogeneesipuul joonisel 20. Need 55 tüve on säilitatud mikroobikollektsioonides. Kokku õnnestus kultiveerida baktereid 4-st hõimkonnast: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* ja *Bacteroidetes*.

Nagu joonisel 17 on näha, teisel päeval pärast nakatamist domineeris nakatatud kartulites eelkõige *Pa*. Järgmiseid ajapunkte vaadates (joonis. 18 ja 19) on näha, et teised bakterid on *Pa*-st üle kasvanud ning kartulis omakorda domineerima hakanud. Kõige rohkem esines teises ja kolmandas ajapunktis kartulites *Gammaproteobacteria* klassist baktereid, kuid esines ka *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* klassidest ning hõimkondadest *Firmicutes*, *Actinobacteria* ja *Bacteroidetes*. Kõikide proovide tulemusi vaadeldes ei saa kindlaks teha ühte kindlat bakteriliiki, mis kartulites domineerima hakkas, see varieerus igas kartulis. Kuid põhilised bakterid, mida leidis enamustes proovides kõige rohkem olid: *Enterobacter* sp. 638, *Pseudomonas* spp. ja *Rahnella aquatilis*. Kirjanduse andmetel varem baktereid kartuli mädas pole uuritud (va mädaniku tekitajad), kuid kasvava kartuli endofüütide hulgas on näidatud suurt proteobakterite hulka (Manter jt., 2010).

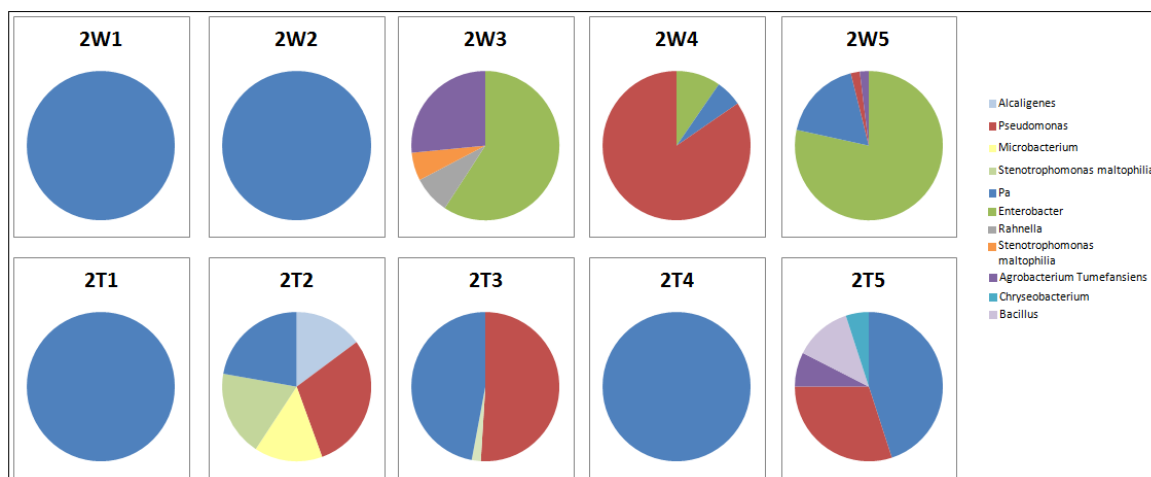
Pärast erinevate bakterite kindlakstegemist 16S rRNA DNA mass-sekveneerimisega (andmeid selles töös pole näidatud) selgus, et mõnes proovis leidis ka palju klostriide. Kuna

klostriidid on ranged anaeroobid, siis on mõisteta, aeroobsetes tingimustes neid kultiveerida ei õnnestunud. Kuna mäda proovid olid säilitatud -80 °C kapis, isoleeriti need tüved nüüd anaeroobsetes tingimustes ning määrati ära nende liigid. Kätte saadi 2 tüve, millest üks oli *Clostridium algidixylanolyticum*, mis oli teisel ajapunktil võetud T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulis ning *Clostridium puniceum*, mida leidis kolmandal ajapunktil wt-iga nakatatud kartulis. Palju leidis klostriide veel ühes kolmanda ajapunkti wt tüvega nakatatud kartulis, kuid sealt ei õnnestunud ühtegi bakterit isoleerida.

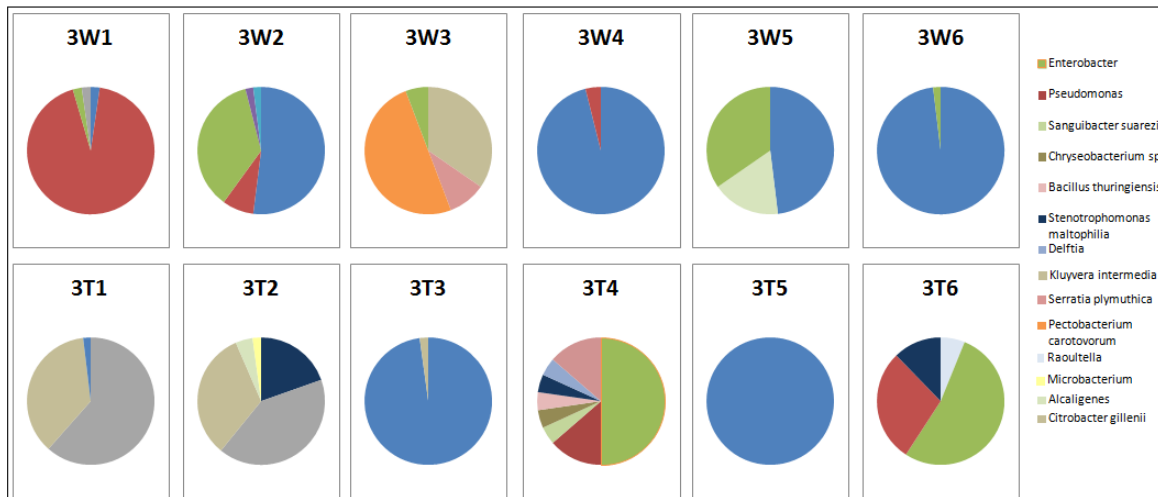
Peamised erinevused wt ja T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulitel ilmnisid eelkõige teisel ajapunktil, hiljem läksid kõikumised liiga suureks ning ei saanud mingeid kindlaid järeldusi teha. Selleks, et T6SS mehhanismist ning kartulis olevatest endofüütsetest bakteritest paremini aru saada, peaks järgnevates katsetes proove võtma varajasematel ajapunktidel, kui selles katses võeti ning tegema erinevaid konkurentsikatseid nende kahe tüve ja erinevate bakterite vahel.



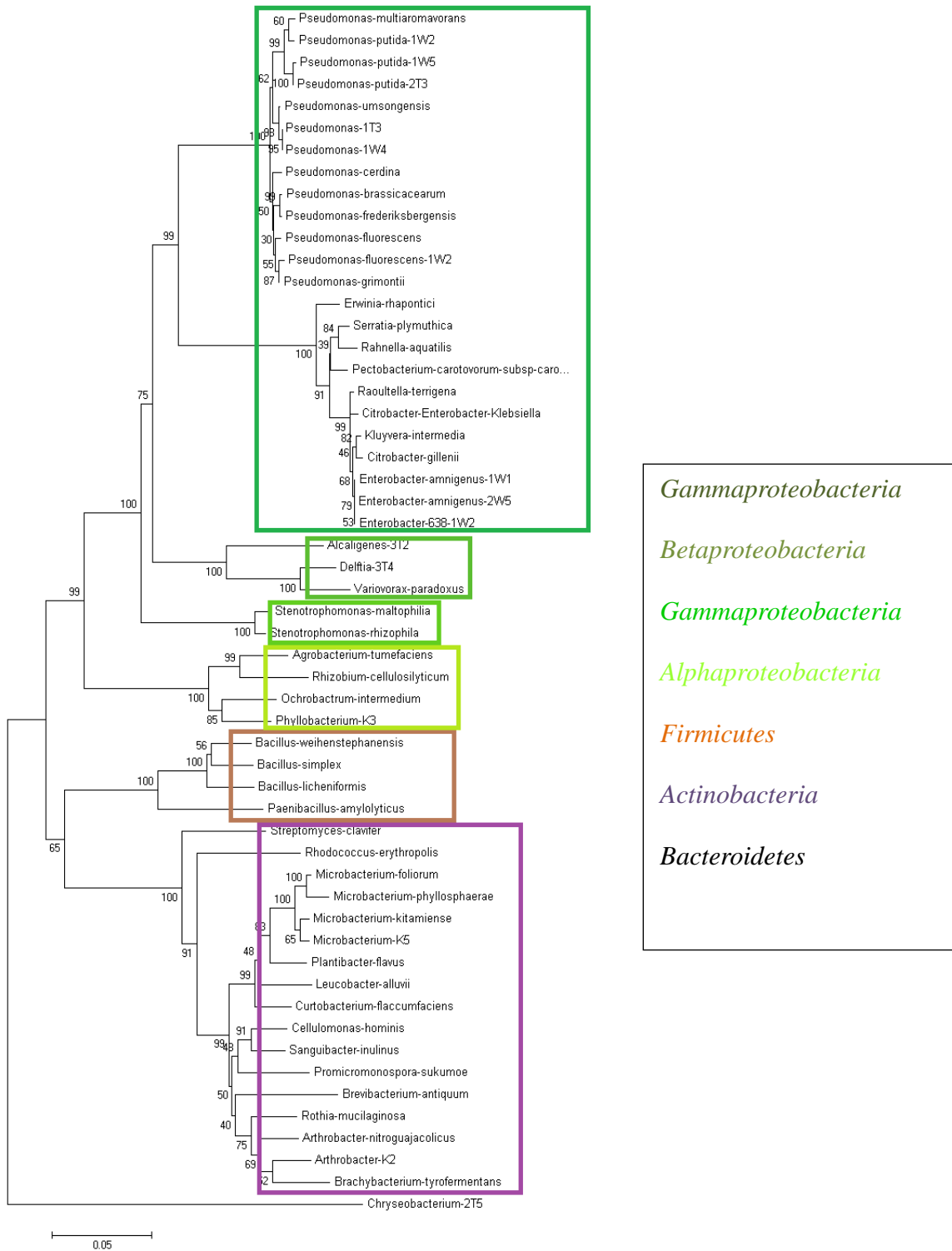
Joonis 17. Esimesel ajapunktil vaadeldud kartulite põhiline mikroobikooslus igas kartulis eraldi.



Joonis 18 . Teisel ajapunktil vaadeldud kartulite põhiline mikroobikooslus igas kartulis eraldi.



Joonis 19 . Kolmandal ajapunktil vaadeldud kartulite põhiline mikroobikooslus igas kartulis eraldi.



Joonis 20. Fylogenesipuu

## KOKKUVÕTE

*P. atrosepticum* on Gram negatiivne taimepatogeen, mis tekitab kartulites ja ka teistes taimedes märgmädanikku. Tema patogeensus seisneb selles, et ta suudab toota taime rakuseina lagundavaid ensüüme. On näidatud, et pealt steriilitud kartulites, on sees suur bakterite kogukond. Seega ei tohiks *Pa*-ga kartuli mädanemine ainult tema endaga seotud olla. Selle töö eesmärgiks oligi vaadata kartuli nakatamise kulgu nii wt, kui ka T6SS *knockout*-iga ning uurida kartulis olevaid endofüütseid baktereid. Selle töö peamisteks tulemusteks olid:

- T6SS *knockout* nakatab kartulit umbes sama hästi, kui wt;
- kartuli nakatamisel *Pa*-ga, kahaneb *Pa* mõlema tüve hulk nakatatud kartulis aja jooksul;
- T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulites oli teisel päeval *Pa* veidike rohkem säilinud, kui wt-iga nakatatud kartulis;
- teises ajapunktis esines wt-ga nakatatud kartulites rohkem Amp tassi peal kasvavaid baktereid, kui T6SS *knockout*-iga nakatatud kartulites;
- kokku isoleeriti 55 bakteritüve 4-st hõimkonnast.
- viimastel ajapunktidel esines kartulites eelkõige bakterid klassist *Gammaproteobacteria*.

# Cultivable bacteria in potato tuber soft rot

Kristel Toppi

## SUMMARY

*Pectobacterium atrosepticum* is a Gram-negative, facultative anaerobic bacteria, which was first isolated from carrot. *Pa* causes soft rot disease in wide variety of plants including potato. The virulence of *Pa* is based on coordinated production of high levels of exoenzymes, which are cellulases, pectinases, proteases.

When studying bacteria in infected potato tubers, it was found that despite surface-sterilization with hypochlorite acid prior to inoculation, the resident bacterial community of potato tubers can survive in considerable numbers. It is suggested that the maceration of potato tubers is achieved by a diverse population of bacteria.

Gram-negative bacteria have evolved 6 protein secretion systems, that enable them to cope with hard environmental conditions and facilitate colonization of eukaryotic hosts. Type 6 secretion system is the most interesting of them, because we don't know exactly how it works and we are suggesting that it is a versatile tool with roles in virulence, symbiosis, interbacterial interactions and antipathogenesis. The aim of this study was to analyse *Pa* virulence on potato tuber and visualize the endophytic microorganisms in potato tuber.

Results from this study, shows that:

- T6SS *knockout* is infecting potato basically at the same level as wild type *Pa*;
- when infecting potato with *Pa*, the amount in potato decreases in time;
- on the second day after inoculation, its amount was more extant in T6SS *knockout* potatoes than in wt potatoes;
- on the second day after inoculation, there was more Amp resistant bacteria in wt infected potatoes, than in T6SS *knockout* infected potatoes;
- 55 different bacterial strains from 4 phyla was isolated;
- on the fifth and eighth day after infection the most abundant class of bacteria in potato tuber was *Gammaproteobacteria*.

## TÄNUAVALDUSED

Tänaksin oma juhendajat Viia Kõivu ning meeldivat laborimeeskonda.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Agrios, G. N. (1997). "In Plant Pathology. 4th edition." New York: Academic press.

Andersson, R. A., A. R. Eriksson, R. Heikinheimo, A. Mäe, M. Pirhonen, V. Kõiv, H. Hyytiäinen, A. Tuikkala & E. T. Palva (2000). "Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of expR(Ecc)." Mol Plant Microbe Interact **13**(4): 384-393.

Berg, G., A. Krechel, M. Ditz, R. A. Sikora, A. Ulrich & J. Hallmann (2005). "Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi." FEMS Microbiol Ecol **51**(2): 215-229.

Bönemann, G., A. Pietrosiuk & A. Mogk (2010). "Tubules and donuts: a type VI secretion story." Mol Microbiol **76**(4): 815-821.

Burr, T. J., Schroth, M.N. & Suslow, T. (1978). "Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*." Phytopathology **68**: 1377-1383.

Cascales, E. (2008). "The type VI secretion toolkit." EMBO Rep **9**(8): 735-741.

Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement & E. A. Barka (2005). "Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects." Appl Environ Microbiol **71**(9): 4951-4959.

Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol **4**(11): 811-825.

Cui, Y., A. Chatterjee, Y. Liu, C. K. Dumenyo & A. K. Chatterjee (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**(17): 5108-5115.

Delepelaire, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 149-161.

Diallo, S., A. Crepin, C. Barbey, N. Orange, J. F. Burini & X. Latour (2011). "Mechanisms and recent advances in biological control mediated through the potato rhizosphere." FEMS Microbiol Ecol **75**(3): 351-364.

FAO (2008). "International Year of the Potato (2008), New Light on a Hidden Treasure." Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Filloux, A. (2004). "The underlying mechanisms of type II protein secretion." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 163-179.

Filloux, A. (2013). "The rise of the Type VI secretion system." F1000Prime Rep **5**: 52.

Frommel, M. I., Nowak, J. & Lazarovits, G. (1993). " Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: *plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere.*" Plant Soil **150**: 51-60.

Gardan, L., C. Gouy, R. Christen & R. Samson (2003). "Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **53**(Pt 2): 381-391.

Gerlach, R. G. & M. Hensel (2007). "Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens." Int J Med Microbiol **297**(6): 401-415.

Heinaru, E. V., E. (2011). "Praktilisi Tõid Mikrobioloogias."

Jacobsen, B. J., N. K. Zidack & B. J. Larson (2004). "The role of bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases." Phytopathology **94**(11): 1272-1275.

Janda, J. M. & S. L. Abbott (2007). "16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls." J Clin Microbiol **45**(9): 2761-2764.

Kloepper, J. W., Schroth, M.N. & Miller, T.D. (1980). "Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield." Phytopathology **70**: 1078-1082.

Kloepper, J. W. S., M.N. (1981). "Relationship on in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora." Phytopathology **71**: 1020-1024.

Krechel, A., A. Faupel, J. Hallmann, A. Ulrich & G. Berg (2002). "Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood." Can J Microbiol **48**(9): 772-786.

Kõiv, V., L. Andresen, M. Broberg, J. Frolova, P. Somervuo, P. Auvinen, M. Pirhonen, T. Tenson & A. Mäe (2013). "Lack of RsmA-mediated control results in constant hypervirulence, cell elongation, and hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*." PLoS One **8**(1): e54248.

Kõiv, V. & A. Mäe (2001). "Quorum sensing controls the synthesis of virulence factors by modulating rsmA gene expression in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*." Mol Genet Genomics **265**(2): 287-292.

Leiman, P. G., M. Basler, U. A. Ramagopal, J. B. Bonanno, J. M. Sauder, S. Pukatzki, S. K. Burley, S. C. Almo & J. J. Mekalanos (2009). "Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(11): 4154-4159.

Liu, Y., Y. Cui, A. Mukherjee & A. K. Chatterjee (1998). "Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites." Mol Microbiol **29**(1): 219-234.

Manter, D.K., J.A. Delgado, D.G. Holm, R.A Strong (2010). "Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots." Microb Ecol. **60**(1): 157-66

Marits, R., V. Kõiv, E. Laasik & A. Mäe (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** ( Pt 8): 1959-1966.

Mougous, J. D., M. E. Cuff, S. Raunser, A. Shen, M. Zhou, C. A. Gifford, A. L. Goodman, G. Joachimiak, C. L. Ordonez, S. Lory, T. Walz, A. Joachimiak & J. J. Mekalanos (2006). "A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus." Science **312**(5779): 1526-1530.

Pilatz, S., K. Breitbach, N. Hein, B. Fehlhaber, J. Schulze, B. Brenneke, L. Eberl & I. Steinmetz (2006). "Identification of *Burkholderia pseudomallei* genes required for the intracellular life cycle and in vivo virulence." Infect Immun **74**(6): 3576-3586.

Pirhonen, M., D. Flego, R. Heikinheimo & E. T. Palva (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.

Potvin, E., D. E. Lehoux, I. Kukavica-Ibrulj, K. L. Richard, F. Sanschagrin, G. W. Lau & R. C. Levesque (2003). "In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets." Environ Microbiol **5**(12): 1294-1308.

Priou, S. J., B. (1996). "Mieux Comprendre la Pomme de Terre (Rousselle, P., Robert, Y. & Crosnier J.C., eds)." INRA Editions, Paris.

Pukatzki, S., A. T. Ma, A. T. Revel, D. Sturtevant & J. J. Mekalanos (2007). "Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15508-15513.

Pukatzki, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg & J. J. Mekalanos (2006). "Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(5): 1528-1533.

Rasche F, V. H., Zachow C, Berg G, van Elsas JD & Sessitsch A (2006). "Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection." Journal of Applied Ecology **43**(3): 555-566.

Reasoner, D. J. (2004). "Heterotrophic plate count methodology in the United States." Int J Food Microbiol **92**(3): 307-315.

Reasoner, D. J. & E. E. Geldreich (1985). "A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water." Appl Environ Microbiol **49**(1): 1-7.

Records, A. R. (2011). "The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery." Mol Plant Microbe Interact **24**(7): 751-757.

Reinhold-Hurek, B. & T. Hurek (2011). "Living inside plants: bacterial endophytes." Curr Opin Plant Biol **14**(4): 435-443.

Schell, M. A., R. L. Ulrich, W. J. Ribot, E. E. Brueggemann, H. B. Hines, D. Chen, L. Lipscomb, H. S. Kim, J. Mrazek, W. C. Nierman & D. Deshazer (2007). "Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*." Mol Microbiol **64**(6): 1466-1485.

Shalom, G., J. G. Shaw & M. S. Thomas (2007). "In vivo expression technology identifies a type VI secretion system locus in *Burkholderia pseudomallei* that is induced upon invasion of macrophages." Microbiology **153**(Pt 8): 2689-2699.

Sharga, B. M. & G. D. Lyon (1998). "*Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria." Can J Microbiol **44**(8): 777-783.

Suarez, G., J. C. Sierra, T. E. Erova, J. Sha, A. J. Horneman & A. K. Chopra (2010). "A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin." J Bacteriol **192**(1): 155-168.

Van Peer, R. S., B. (1989). "Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures." Can. J. Microbiol. **35**: 456-463.

Wang, X., Q. Wang, J. Xiao, Q. Liu, H. Wu, L. Xu & Y. Zhang (2009). "*Edwardsiella tarda* T6SS component evpP is regulated by *esrB* and iron, and plays essential roles in the invasion of fish." Fish Shellfish Immunol **27**(3): 469-477.

Voth, D. E., L. J. Broderdorf & J. G. Graham (2012). "Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines." Future Microbiol **7**(2): 241-257.

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

<http://iai.asm.org/content/68/9/4839/F1.expansion.html> [1]

<http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

## LIHTLITSENTS

Mina, Kristel Toppi (21.01.1992),

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

### **Kultiveeritavad bakterid kartulimugula mädanikus**

mille juhendaja on Viia Kõiv

- 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, 26.05.2014

