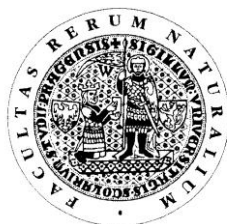


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Ondřej Komžák

PRODUKCE SEKUNDÁRNÍCH METABOLITŮ
U AKTINOMYCET PŮSOBÍCÍCH A POTLAČUJÍCÍCH
OBECNOU STRUPOVITOST BRAMBOR

Secondary metabolite production in actinomycetes causing and
suppressing common scab of potatoes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Kopecký

Garant: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením projektu NAZV (MZe) "Využití diverzity půdních mikroorganismů k vytvoření pěstebních podmínek vhodných k prevenci obecné strupovitosti konzumních brambor." (reg. č. QH92151, 2009-2011) a výzkumného záměru VÚRV, v.v.i. (MZE0002700604).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11. května 2011.

Obsah

PROHLÁŠENÍ	2
PODĚKOVÁNÍ.....	5
SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	6
ABSTRAKT	8
ABSTRACT	9
KLÍČOVÁ SLOVA	10
KEY WORDS	10
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
1.1 ROD <i>STREPTOMYCES</i>	11
1.2 SEKUNDÁRNÍ METABOLITY AKTINOMYCET.....	12
1.2.1 ANTIBAKTERIÁLNÍ LÁTKY	12
1.3 OBECNÁ STRUPOVITOST.....	14
1.4 OSTROV PATOGENITY.....	17
1.5 THAXTOMIN A	20
2 MATERIÁL.....	23
2.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA	23
2.2 CHEMIKÁLIE A ENZYMY	24
2.3 ROZTOKY	25
2.4 KOMERČNÍ SOUPRAVY A STANDARDY MOLEKULOVÉ VÁHY	25
2.5 PRIMERY PRO PCR	25
2.6 SOFTWARE	26
2.7 PŘÍSTROJE	26
3 METODY	27
3.1 IZOLACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ.....	27
3.2 KULTIVACE.....	27
3.3 IZOLACE CHROMOZOMÁLNÍ DNA	27
3.4 ELEKTROFORETICKÉ STANOVENÍ CHDNA	28
3.5 PCR AMPLIFIKACE GENU PRO 16S rRNA	28
3.6 PŘEČIŠTĚNÍ PCR PRODUKTU	29
3.7 IZOLACE DNA FRAGMENTU Z GELU.....	30
3.8 SEKVENACE PCR PRODUKTU.....	30

3.9	KULTIVAČNÍ POKUSY POTLAČENÍ <i>STREPTOMYCES SCABIEI</i>	30
3.10	PCR S PRIMERY TXTA1	31
3.11	PCR S PRIMERY STX	31
3.12	ELEKTROFORÉZA PCR PRODUKTŮ (STX A TXTA1)	32
3.13	OPTIMALIZACE ESI-MS.....	32
4	VÝSLEDKY	34
4.1	IZOLACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ Z RHIZOSFÉRY BRAMBOR	34
4.2	VYHODNOCENÍ SEKVENCE GENU PRO 16S rRNA	34
4.2.1	ELEKTROFORÉZA CHDNA A PCR PRODUKTU	34
4.2.2	TAXONOMICKÁ IDENTIFIKACE BAKTERIÍ	36
4.3	TESTY POTLAČENÍ <i>STREPTOMYCES SCABIEI</i>	39
4.4	STANOVENÍ GENU PRO SYNTÉZU THAXTOMINU A	40
4.5	ESI-MS CHROMATOGRAM	44
4.6	FRAGMENTACE A NALEZENÍ PRODUKTOVÉHO IONTU	44
5	DISKUZE	45
6	ZÁVĚR	47
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří se přímo i nepřímo podíleli na vzniku mé diplomové práce. V první řadě svému školiteli Janu Kopeckému za čas, ochotu a cenné rady, které mi během mého studia věnoval. Dále bych rád poděkoval Markétě Marečkové, Jitce Novotné a Petrovi Kozlíkovi za konzultace a odbornou pomoc. Také bych rád poděkoval ostatním studentům a zaměstnancům laboratoře – Ivetě Slaninové, Zuzaně Samkové a Ondřejovi Danielovi - za vytvoření příjemného pracovního prostředí a jejich pomoc při řešení různých nenadálých situací. V neposlední řadě děkuji svým rodičům, bratrovi a všem příbuzným za materiální a psychickou podporu během studia. Děkuji.

Seznam symbolů a zkratk

Symboly:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
S	Svedbergova konstanta, sedimentační koeficient

Zkratky:

BSA	Hovězí sérový albumin (B ovine S erum A lbumin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (D eoxyribo N ucleic A cid)
dNTP mix	2' - deoxynukleosid - 5' - trifosfátová směs
EDTA	Kyselina etylendiaminotetraoctová
ESI-MS	Hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem
chDNA	Chromozomální DNA
PAI	Ostrov patogenity (P athogenicity I sland)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (P olymerase C hain R eaction)
RDP	Ribosomal database project
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
UV	Ultrafialové záření

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na hledání bakteriálních původců a antagonistů ovlivňujících výskyt obecné strupovitosti, projevující se u některých zemědělsky využívaných plodin, jejímž hlavním původcem je *Streptomyces scabiei* a která způsobuje značné ekonomické ztráty.

Z rhizosféry brambor byly izolovány bakteriální kmeny, především streptomycety, protože patří mezi nejvýznamnější producenty sekundárních metabolitů a původci tohoto onemocnění patří také do tohoto rodu. Metodou PCR byl u získaných kmenů amplifikován gen pro 16S rRNA a jeho sekvenací byla stanovena jejich příbuznost. Jednoduchým kultivačním testem byly poté nalezeny kmeny, které účinně potlačují *S. scabiei*. Dále byly metodou PCR hledány specifické geny pro biosyntézu fyto toxinu thaxtominu A, který je společným virulenčním faktorem všech doposud popsaných původců onemocnění a způsobuje projevy tohoto onemocnění na povrchu napadených plodin. Geny pro syntézu thaxtominu jsou součástí ostrovu patogenity. Standard fyto toxinu thaxtominu A byl použit pro optimalizaci jeho stanovení hmotnostní spektroskopii pro pozdější analýzu pokusů prováděných *in vivo* a *in vitro*.

Výsledky fylogenetické analýzy izolovaných kmenů, u nichž byla prokázána přítomnost jednoho z genů nutných pro biosyntézu thaxtominu A, podpořily hypotézu horizontálního genového přenosu ostrovu patogenity na původně nepatogenní kmeny. Byly nalezeny potenciální půdní antagonistické kmeny schopné potlačovat při souběžné kultivaci hlavního původce onemocnění *S. scabiei* a kmeny nesoucí jeden z genů nutných pro syntézu thaxtominu blízce příbuzné známým patogenním bakteriím. Další práce na tomto projektu bude zaměřena na detekci produkce thaxtominu A u potenciálních patogenních kmenů.

Abstract

This diploma thesis focused on screening for bacterial pathogens and antagonists suppressing common scab mainly caused by *Streptomyces scabiei*. Common scab affects some agricultural crops causing significant economical losses.

Bacterial strains, mostly streptomycetes, were isolated from potato rhizosphere because they belong to most important producers of secondary metabolites and the causative agents of the disease are also members of this genus. The isolated bacteria were characterised by PCR amplification and sequencing of 16S rRNA gene to reveal their phylogenetic relationships. The ability of isolated strains to suppress growth of *Streptomyces scabiei* was tested by a simple co-cultivation experiment. The strains were tested by PCR for presence of specific genes for biosynthesis of thaxtomin A, a common virulence factor found in all described pathogens causing symptoms of this disease on the surface of affected tubers. Genes for synthesis of thaxtomin belong to pathogenicity island. Standard of phytotoxin thaxtomin A was used to optimize its analysis by mass spectroscopy for further *in vivo* and *in vitro* experiments.

Phylogenetic analysis of strains harboring one of the genes necessary for thaxtomin A biosynthesis supported the hypothesis of sharing the pathogenicity island by horizontal gene transfer with non-pathogenic species. Strains of soil antagonists able to suppress the growth of the main causative agent of common scab *S. scabiei* were isolated as well as strains carrying one of genes necessary for thaxtomin synthesis closely related to the known pathogenic species. Further work on this project will focus on detection of thaxtomin A production by potential new pathogens.

Klíčová slova

Streptomyces scabiei

Thaxtomin A

Obecná strupovitost

Ostrov patogenity

Horizontální genový přenos

Key words

Streptomyces scabiei

Thaxtomin A

Common scab

Pathogenicity island

Horizontal gene transfer

1 Literární přehled

1.1 Rod *Streptomyces*

Rod *Streptomyces* patří do čeledi *Streptomycetaceae*, která je druhově nejpočetnější mezi aerobními aktinomycetami – dělí se do několika desítek skupin s téměř pěti sty druhy a velmi rychle se taxonomicky vyvíjí [1]. Všichni zástupci mají v buněčné stěně diaminopimelovou kyselinu, ale nikoliv arabinózu, galaktózu nebo xylózu.

Bakterie rodu *Streptomyces* tvoří větvené mycelium, které se jen zřídka rozpadá a tvoří samostatné kolonie vzhledu kožovitých či máselnatých kolonií majících zpočátku hladký povrch, ale později dochází k vývoji vzdušného mycelia, které se může jevit jako zrnité, práškové nebo sametové [1]. Také produkují širokou škálu pigmentů odpovědných za zbarvení mycelia nebo barevné difuzní pigmenty. Bakterie rodu *Streptomyces* jsou chemoorganotrofní s oxidativním typem metabolismu a jako hlavní zdroj uhlíku a energie mohou využívat širokou škálu organických látek. Streptomycety jsou aerobní, grampozitivní a neacidorezistentní bakterie, široce rozšířené a hojně v půdě i ve vodním prostředí. Většinou jsou saprofytické, pouze několik druhů je patogenních pro člověka, zvířata nebo rostliny.

Taxonomické zařazení [1]:

Říše	<i>Bacteria</i>
Kmen	<i>Actinobacteria</i>
Třída	<i>Actinobacteria</i>
Řád	<i>Actinomycetales</i>
Podřád	<i>Streptomycineae</i>
Čeleď	<i>Streptomycetaceae</i>
Rod	<i>Streptomyces</i>

1.2 Sekundární metabolity aktinomycet

Od objevení aktinomycinu a následně streptomycinu, prvního účinného léku proti tuberkulóze, ve 40. letech 20. století, se staly aktinomycety známými producenty antibiotik a dalších sekundárních metabolitů s biologickou aktivitou [2]. Aktinomycety jsou producenti široké škály léčiv využívaných nejen v humánní medicíně. Jejich produkty jsou využívány jako antibakteriální léky (př. tetracyklin nebo erytromycin), antifungální látky (př. nystatin), při léčbě rakoviny (př. adriamycin), antihelmintika (př. avermektin), imunosupresivní látky (př. rapamycin) nebo jako přírodní herbicidy (př. bialaphos). Všeobecně je přijímán názor, že aktinomycety produkují až dvě třetiny z celkového množství antibiotik a bakterie rodu *Streptomyces* 70 – 80 % mezi aktinomycetami, a tím jsou největší doposud objevení producenti antibiotik na světě.

1.2.1 Antibakteriální látky

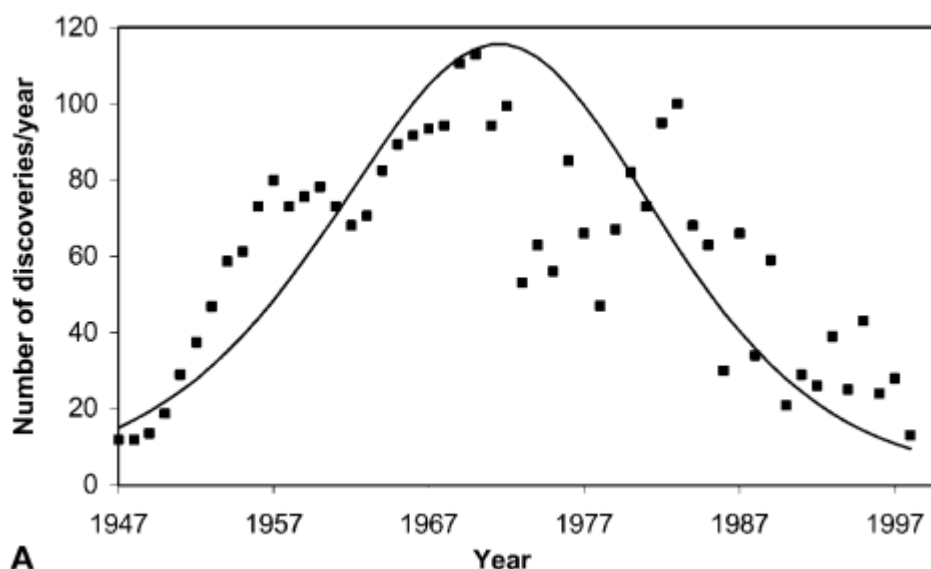
Cílem použití antibakteriálních látek v medicíně je potlačit původce onemocnění a přitom co nejméně poškodit hostitelský organizmus [3]. Antibakteriální látky dělíme na antibiotika a chemoterapeutika. Jako antibiotika označujeme látky, jež jsou produktem metabolismu mikroorganismů. Uměle připravené antibakteriální látky se nazývají chemoterapeutika. Jejich účinky můžeme rozdělit na bakteriostatické a baktericidní. Baktericidní účinek (např. peniciliny, cefalosporiny) způsobuje usmrcení původce onemocnění a bakteriostatický účinek (např. tetracykliny, sulfonamidy) pouze zastavuje jeho další množení.

Navzdory velkému počtu chemicky různorodých antibiotik je způsobů, jakým účinkují, jen několik a tím je dán poměrně snadný vznik rezistence [4]:

- **Inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny** v důsledku vazby antibiotika na enzym podílející se na její syntéze. Zastavením tvorby buněčné stěny ztrácí buňka schopnost se dělit.
- **Porušení buněčné cytoplazmatické membrány** způsobuje ztrátu selektivní permeability a integrity buněk, a tím jejich zánik.
- **Inhibice syntézy bílkovin** vzniká působením na různých místech ribozomu, čímž je znemožněna proteosyntéza.

- **Interference s bakteriální DNA** může být způsobena vazbou antibiotika na bakteriální DNA nebo inhibicí gyrázy.
- **Inhibice syntézy kyseliny tetrahydrolistové**, která je nutná pro syntézu stavebních jednotek DNA a RNA.

Téměř dvacet let rostl počet nově objevených antimikrobiálních látek exponenciálně, až zhruba do sedmdesátých let, kdy pomalu začal klesat (Obr. 1.1) [5]. Podle teoretického modelu sestaveného Watve *et al.* [5] je rod *Streptomyces* schopen produkovat až 100 000 různých antimikrobiálních látek, avšak je nutné vyvíjet nové produkční a testovací metody, pomocí kterých bude možné nové látky rozeznat a detekovat.

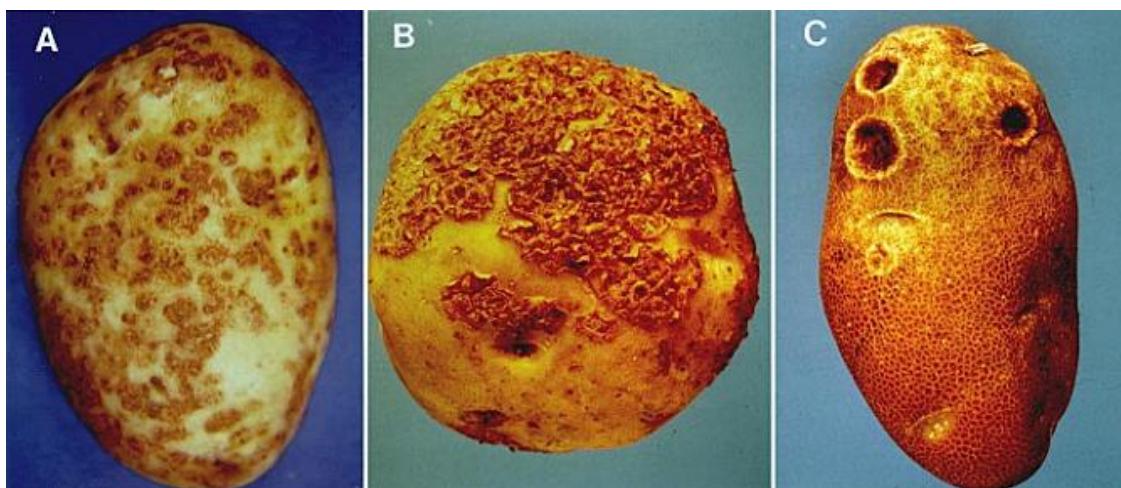


Obr. 1.1 – Počty nově objevovaných antibiotik za rok v letech 1947-1997 [5].

Objevování nových antibiotik je komplikované také různou četností jejich výskytu. Například streptomycin produkuje 1% půdních aktinomycet, ale daptomycin byl objeven až po testování bezmála 10^7 aktinomycet [6].

1.3 Obecná strupovitost

Obecná strupovitost brambor je celosvětově jedno z nejdůležitějších půdou přenášených onemocnění brambor a je velmi těžké ho kontrolovat [7]. Toto onemocnění je způsobeno gram-pozitivními půdními bakteriemi rodu *Streptomyces* a je charakterizováno povrchními nebo až několik milimetrů hlubokými hnědými lézemi, které snižují kvalitu a ekonomickou hodnotu plodin na trhu (Obr. 1.2). Výskyt a závažnost tohoto onemocnění jsou různé v závislosti na místě, kde jsou plodiny pěstované a projevy jsou také variabilní v různých letech, což je důsledkem změn počasí a genetické variability pěstovaných odrůd brambor [8]. Toto onemocnění se vyskytuje i u jiných kořenových a hlízových zemědělsky využívaných plodin, jako například u ředkve, řepy, mrkve nebo sladké brambory, u kterých také způsobuje značné ekonomické ztráty [9].

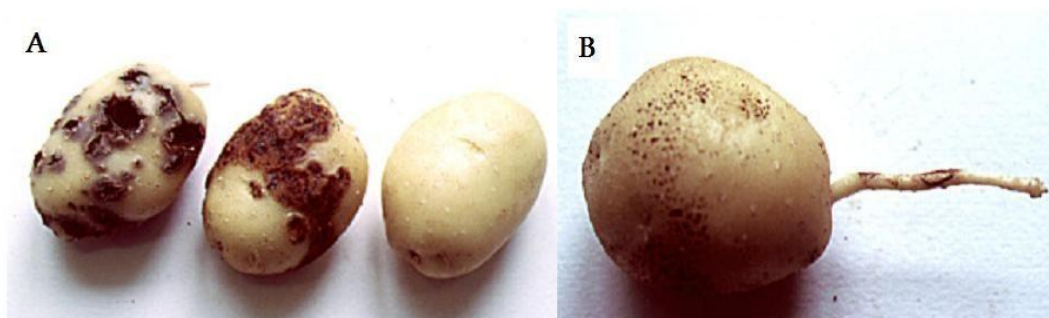


Obr. 1.2 - *Streptomyces scabiei* může způsobovat různé projevy onemocnění na povrchu napadených plodin. (A) Povrchové léze, které jsou občas označovány také jako hnědočervená strupovitost (russet scab). (B) Vystouplé léze. (C) Hluboké léze, které také mohou mít zvrásněné okolí [10].

Přestože je rod *Streptomyces* velmi rozmanitý, pouze malá část kmenů je původcem tohoto onemocnění. Patogenní kmeny se dělí do několika druhů, rozlišovaných na základě příbuznosti jejich genu pro 16S rRNA a na základě různých biochemických vlastností. Nejlépe popsany zástupce těchto patogenních kmenů je *Streptomyces scabiei*, který je rozšířen celosvětově [8]. Další patogenní kmeny, které jsou morfologicky podobné, ale geneticky zřetelně odlišné jsou např. *S. europaeiscabiei* a *S. stelliscabiei* [11]. V Egyptě byla rozeznána morfologicky blízká skupina

patogenních kmenů podobných nebo identických *S. bottropensis* [12], v Severní Americe, Japonsku a Korei byl popsán *S. acidisabies* [13-15] a v Evropě byl definován *S. reticuliscabiei* [11]. Toto jsou jen někteří zástupci původců obecné strupovitosti ve světě, existují i mnozí další. Některým patogenním organismům chybí jeden nebo více genů charakteristických pro patogenitu, ale u všech patogenních kmenů, způsobujících obecnou strupovitost, byly nalezeny geny pro syntézu thaxtominu [8].

Různé patogenní kmeny mohou způsobovat různé projevy strupovitosti, které můžeme rozdělit na obecnou strupovitost (common scab), síťovanou strupovitost (netted scab) a hnědočervenou strupovitost (russet scab) [11]. Obecná strupovitost je charakterizována vyvýšeným hrubým (korkovatým) povrchem nebo hlubšími lézemi, což je pravděpodobně způsobeno různým množstvím produkovaného thaxtominu. Hnědočervená a síťovaná strupovitost mají podobné projevy, které jsou charakteristické povrchovým zvrásněním napadené plodiny (Obr. 1.3) [10]. Jediný rozdíl mezi hnědočervenou a síťovanou strupovitostí je v optimálních podmínkách, které jsou potřebné pro propuknutí nemoci, a různých patogenních zástupcích, kteří tato onemocnění způsobují [11]. Také existují patogenní zástupci rodu *Streptomyces*, kteří způsobují hnědočervenou a síťovanou strupovitost a neprodukují thaxtomin, ale pravděpodobně jiný fytotoxin [16].



Obr. 1.3 – (A) Obecná strupovitost způsobená *Streptomyces turgidiscabiei* (vlevo), *Streptomyces scabiei* (uprostřed) a nenapadená hlíza. (B) Hnědočervená strupovitost a nekrotická léze na výhonku [17].

V současné době nejsou vyvinuté žádné efektivní metody k potlačení obecné strupovitosti. Projevy a míra tohoto onemocnění závisí na mnoha fyzikálních a chemických faktorech, které ještě nejsou zcela objasněny. Mezi dostupné možnosti, jak

regulovat výskyt onemocnění, patří například regulace pH pod hodnotu 5.2 pomocí hnojiv síranu amonného nebo fosforečnanu amonného [18]. Nicméně ovlivňování pH půd potlačí pouze některé původce, například *S. acidiscabies* způsobuje onemocnění i v půdách o pH 3.8 [19]. Tato metoda je také málo efektivní v půdách s vysokou pufrační kapacitou [18]. Další faktor, který ovlivňuje výskyt onemocnění, je kombinace sníženého pH a kationové výměnné kapacity u Ca, Mg a K, která musí být ≤ 12 cmolc/kg [20]. Také přidáváním síranu manganatého do půdy bylo zjištěno snížení intenzity onemocnění [21]. Jiný způsob, jak částečně omezit obecnou strupovitost, je zalévání v době před sázením a v období intenzivního růstu hlíz, jelikož onemocnění se projevuje spíše v sušších půdách a napadá expandující hlízy [22-23]. V současné době začíná být všeobecně přijímána myšlenka, že je třeba hledat řešení pomocí genetické rezistence. Toto řešení by bylo ekologické, levné a stabilní [24].

1.4 Ostrov patogenity

Od konce 80. let minulého století se začal používat v odborné literatuře termín ostrov patogenity (PAI – pathogenicity island), který ale neměl přesnou definici. Tato definice byla sepsána až Hacker *et al.* [25]. Ostrov patogenity může být definován následujícími kritérii:

- obsahuje jeden nebo více virulentních genů
- je přítomný u patogenních kmenů, ale chybí nebo se jen minimálně objevuje u nepatogenních kmenů v rámci jednoho druhu
- rozdílný poměr G+C bází oproti hostitelské DNA
- obsazení větší části chromozomu (mnohdy > 30kb)
- představuje spojené a jednoznačné genetické jednotky
- místo pro spojení s tRNA a/nebo s inserční sekvencí na okrajích
- přítomnost „transportních“ genů (inserční sekvence, integrázy, transposasy, replikační počátky plazmidů)
- nestabilita

Ostrovy patogenity jsou rozdílné mezi gram-pozitivními a gram-negativními bakteriemi [25]. Gram-pozitivní ostrovy patogenity nesplňují všechny výše uvedené podmínky (nesou transportní geny nebo místo pro spojení s tRNA), nicméně kódují virulentní faktory a jsou specifické pro patogenní kmeny jednoho druhu bakterií nebo pro jisté druhy bakterií v jednom rodě.

Bodové mutace, genové přeskupení a horizontální genový přenos jsou řídicí síly evoluce bakterií [26]. Jestliže bodové mutace způsobují „pomalou“ evoluci, tak získávání větších genových celků vede k rychlému vývoji nových kmenů tzv. „skokovou mutací“ [25]. Plazmidy, bakteriofágy a ostrovy patogenity jsou zapojeny do vývoje „skokovou evolucí“. Jestliže jsou ostrovy patogenity přenášeny v plazmidu nebo bakteriofágu, tak jsou označovány jako prekurzory ostrovu patogenity (Pre-PAI) [27].

Přenos genetické informace mezi bakteriemi je možný několika způsoby [28]:

- **Bakteriální konjugace** – přenos úseku DNA mezi dvěma buňkami vytvořením cytoplazmatického můstku. Tuto možnost mají jen buňky obsahující specifický plazmid (tzv. F-plazmid), takovéto buňky se mohou spojit i s buňkami, které nemají tento specifický plazmid. Tento způsob má význam pouze v případě, je-li F-plazmid integrován do chromozomu. V tom případě mohou buňky přenášet různé geny z donorové bakterie do recipientní.
- **Transformace** – bakterie zachycuje DNA z odumřelých nebo rozbitých bakterií z vnějšího okolí. Takto získaná DNA je transportována přes buněčnou membránu do vnitřního prostoru buňky, kde bývá homologní rekombinací začleněna do genomu recipientní buňky. Značná nevýhoda této metody spočívá ve vystavení DNA působení extracelulárního prostředí, kde je možnost jejího poškození.
- **Transdukce** – přenos DNA pomocí bakteriofága, kdy může být DNA virem přenesena přímo do hostitelského chromozomu nebo integrována mechanismem homologní rekombinace nebo místně specifické rekombinace.

Ostrov patogenity odpovědný za rozvoj obecné strupovitosti byl popsán u *Streptomyces turgidiscabies*, *S. scabiei* a *S. acidiscabies* a následně byl dokázán horizontální genový přenos konjugací z *S. turgidiscabies* na původně nepatogenní kmeny *S. diastatochromogenes* a *S. coelicolor*. Ostrov patogenity byl začleněn místně specificky na místo genu domněle integrované membránové lipidové kinázy a byl fenotypově potvrzen u *S. diastatochromogenes*, nikoliv však u *S. coelicolor*. Velikost tohoto ostrovu patogenity byla určena mezi 325 – 660kb [29].

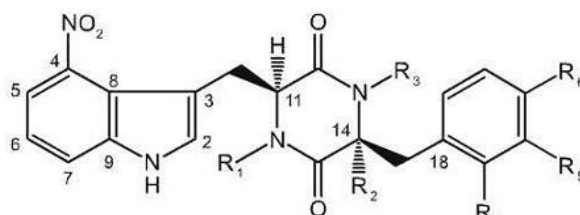
Ostrov patogenity u výše zmíněných patogenních kmenů obsahuje geny pro syntézu thaxtominu, *nec1* (z angl. „necrosis gene“; gen pro syntézu proteinu, který způsobuje nekrózu a je zároveň nezávislým faktorem virulence), tomatinasy a mnoho dalších genů. *S. turgidiscabies* navíc obsahuje *fas* operon, který pochází původně z *Rhodococcus fascians* a způsobuje srůstovou malformaci rostlin [29]. Všechny kmeny obsahující gen pro syntézu thaxtominu vykazovaly patogenitu na bramborách nebo ředkvičkách, nicméně některým z nich chyběl gen pro syntézu *nec1* nebo tomatinasy nebo oba [30]. V článku od Gonzales *et al.* [31] bylo dokázáno, že až jedné polovině

patogenních kmenů chybí gen pro *nec1*. Z tohoto zjištění vyplývá, že geny pro syntézu tomatinasy a *nec1* nejsou nezbytné pro patogenitu [31].

Geny ostrovu patogenity u *S. scabiei* můžeme rozdělit na dvě části – toxikogenní (obsah G+C bází je 68%) a kolonizační (obsah G+C bází je 68,5%) region. Bylo zjištěno, že do toxikogenního regionu patří všechny geny potřebné pro syntézu thaxtominu [30]. Mezi tyto geny patří geny *txtAB* [32], *txtC* [33], *nos* (z angl. nitric oxide synthase) [34] a *txtR* [35], které kódují neribozomální peptidovou syntézu (způsobuje cyklizaci dipeptidu), cytochrom P450 monooxygenázu (hydroxyluje cyklický dipeptid), NO syntázu (nitrace tryptofanové části thaxtominu je nezbytná pro toxicitu) a regulační protein schopný vázat celobiózu [30]. Schematické zobrazení organizace genů v toxikogenním regionu a porovnání mezi *S. scabiei* a *S. turgidiscabies* lze nalézt v Joshi *et al.* [35]. Druhý region, tzv. kolonizační, obsahuje více genů, mezi které patří geny pro *nec1* a tomatinasu A (*tomA*), které nejsou nezbytné, ale hrají důležitou roli při projevu onemocnění [30]. *Nec1* a tomatinasa pravděpodobně snižují obranyschopnost rostlin [36-37]. V kolonizačním regionu lze také nalézt geny pro tvorbu proteinů s extracelulární esterázovou aktivitou, pomocí kterých dochází k rozkladu suberinu, který slouží jako fyzická bariéra proti patogenům [38]. Úplný výčet genů z obou regionů lze nalézt v článku Lerat *et al.* [30].

1.5 Thaxtomin A

Streptomycety produkují velké množství sekundárních metabolitů, které jsou využívány v medicíně i zemědělství, nicméně je zde i část kmenů, produkujících sekundární metabolity, které mohou způsobovat různá onemocnění. Mezi tyto kmeny patří i hlavní původce obecné strupovitosti *Streptomyces scabiei*, který produkuje fytotoxin thaxtomin (Obr. 1.4) [39]. Tento fytotoxin je nezbytný pro rozvoj strupovitosti. Thaxtomin A inhibuje tvorbu celulózy, nicméně mechanismus této reakce zatím není přesně znám. Po vystavení směsi buněk z topolu (*Populus trichocarpa* a *Populus deltoides*) účinkům thaxtominu A došlo k aktivaci signální cesty vedoucí k programované smrti buněk, což je způsobeno ovlivněním vstupu Ca^{2+} do buněk [40] nebo buňky na svou obranu snížily množství celulózy v buněčné stěně a zvýšily množství pektinu, čímž se přizpůsobí přítomnosti fytotoxinu thaxtominu A. Buňky, které se dokázaly přizpůsobit, zároveň vykazovaly i vyšší odolnost vůči dichlobenilu a isoxabenu, kteří způsobují také inhibici syntézy celulózy. Nicméně buňky, které se dokázaly přizpůsobit, dorůstaly menších rozměrů [41].



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	Me	OH	Me	H	OH	H
2	Me	OH	Me	OH	H	H
3	Me	H	H	H	H	H
4	Me	OH	Me	H	H	H
5	Me	H	Me	H	H	H
6	Me	OH	H	H	H	H
7	Me	OH	Me	H	H	OH
8	Me	OH	Me	H	OH	OH
9	Me	OH	H	H	OH	H
10	H	OH	Me	H	OH	H
11	H	H	H	H	H	H

Obr. 1.4 – Strukturní vzorce thaxtominu. Thaxtomin A (1) a o-thaxtomin A (2) [42].

Thaxtominy, poprvé popsané v roce 1989 [43], jsou cyklické dipeptidy (2,5-diketopiperazin) vznikající spojením tryptofanu a fenylalaninu. Jednotlivé typy thaxtominu se liší pouze přítomností N-metylových a hydroxylových skupin, případně jejich nahrazením jinou skupinou (obr. 1.5) [44]. Biosyntéza thaxtominu je blíže popsána v kapitole 4. Jedním z genů je kódována NO syntáza, která způsobuje nitraci thaxtominu a zároveň se zdá, že je odpovědná i za produkci oxidu dusnatého, který je vylučován patogenním organismem do okolí a může podporovat účinky thaxtominu v půdě [39].

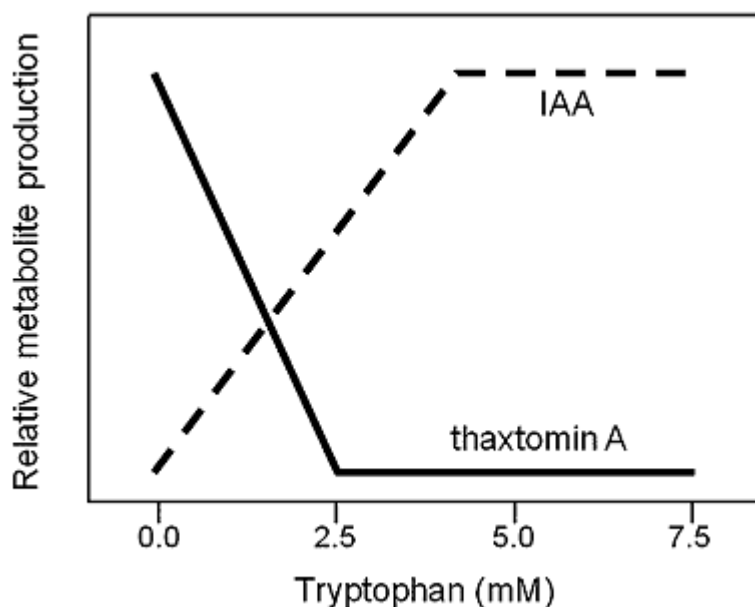
Syntéza molekul odpovědných za virulenci, jako například thaxtominu, je u bakteriálních patogenů pevně regulována, aby bylo zajištěno, že se produkce shoduje s hostitelskou dostupností [39]. Regulace syntézy thaxtominu není zatím úplně objasněna, ale zdá se, že jeho producenti tím reagují na okolní změny [45]. Testy *in vitro* ukazují, že streptomycey nebudou produkovat thaxtomin v běžných médiích, jako například v Luria broth (LB) médiu [46], ale naopak dobře produkují v ovesném médiu [47]. Maximální produkce thaxtominu je dosaženo až po několika dnech kultivace, což naznačuje regulace v metabolismu patogenů [46].

Zdá se, že syntézu thaxtominu mohou spouštět některé sloučeniny z buněčné stěny rostlin. Mezi ně patří xylany a celobiosa. Základ xylanů tvoří 1,4- β -xylosa o různé délce s postranními řetězci, nejčastěji s α -L-arabinofuranosylem, a jsou hlavní stavební jednotkou ovesných otrub [45]. Celobiosa (1- β -D-glukopyranosyl-4-D-glukosa) je nejmenší disacharidová součást celulosy [48]. Další látkou spouštějící syntézu thaxtominu je pravděpodobně suberin, který tvoří fyzickou bariéru rostlin před napadením patogenními organismy. Suberin je polyester složený z mastných kyselin a fenolu [38]. Transkripci genů nutných k produkci thaxtominu spouští TxtR protein, který je členem AraC/XylS rodiny transkripčních regulátorů [35]. Celobiosa je ligand pro protein TxtR, který po jejím navázání spouští transkripci dalších genů zapojených do tvorby thaxtominu [39]. Dalším ligandem je celotriosa, která vyvolává dokonce silnější odezvu než celobiosa. Přestože je celobiosa i celotriosa součástí celulosy, tak celulosa samotná nespouští syntézu thaxtominu a ani není zdrojem celobiosy a celotriosy v půdě, ale ty jsou uvolňovány rostoucí rostlinnou tkání [48]. Kromě výše

uvedených pravděpodobně spouští biosyntézu thaxtominu i jiné krátké glukosové polymery s vazbou β (1 \rightarrow 4) [39].

Streptomyces scabiei produkuje také melanin, což je barvivo, které produkují i některé další bakterie, houby, rostliny a živočichové. Melanin je syntetizován z tyrozinu enzymem tyrozinázou [49]. U *Streptomyces scabiei* je produkce melaninu a thaxtominu nějakým způsobem propojena [30]. V článku od Beausejour *et al.* [50] byly popsány pokusy, kdy byl u *S. scabiei* inaktivován gen pro tvorbu melaninu a u většiny testovaných vzorků došlo i ke snížení tvorby thaxtominu. Všechny mutované kmeny vykazovaly oproti nemutovaným kmenům vyšší citlivost vůči různým druhům stresu, což naznačuje, že produkce melaninu a thaxtominu může být odpovědí na okolní stres [30].

Další látkou, kterou produkují streptomycety, je fytohormon patřící mezi auxiny indol-3-octová kyselina (IAA), odvozená rovněž od tryptofanu [51]. Syntéza extracelulární IAA u *S. scabiei* je regulována dostupností tryptofanu a vykazuje opačný profil produkce než thaxtomin A (Obr. 1.5) [30]. Využití auxinů ke snížení toxicity je blíže popsáno v článku od Tegg *et al.* [52].



Obr. 1.5 – Efekt zvyšující se koncentrace tryptofanu na produkci IAA (indol-3-octová kyselina) a thaxtominu A u *S. scabiei* kultivovaném na minimálním médiu. Vzdávající koncentrace tryptofanu úplně inhibuje tvorbu thaxtominu A [30].

2 Materiál

2.1 Kultivační média

Kultivační média byla před použitím sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 min. Média a chemikálie byly nakoupeny od výrobců BD (Franklin lakes, New Jersey), Oxoid (Basingstoke, Spojené království), Penta (Praha, Česká republika), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Kulich (Hradec Králové, Česká republika).

BG médium:

Bacto yeast extract (BD)	3 g
Malt extract (Oxoid)	10 g
Glukóza (Penta)	4 g
CaCO ₃ (Lach-Ner)	2 g

Destilovanou vodou byl objem doplněn na 1000 ml a pH bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,2.

LB médium:

Bacto Trypton (BD)	10 g
Bacto yeast extract (BD)	5 g
NaCl (Lach-Ner)	5 g

Destilovanou vodou byl objem doplněn na 1000 ml a pH bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,5.

Bramborové médium:

Toto živné médium bylo připraveno smícháním 10 g na kousky nakrájených čerstvých brambor a 500 ml destilované vody. Tato směs byla vařena 15 min. Hodnota pH nebyla upravena.

Ovesné médium:

Toto živné médium bylo připraveno smícháním 20 g ovesných vloček a 1000 ml destilované vody. Tato směs byla vařena 20 min a po vychladnutí filtrována přes 4 vrstvy gázy. Hodnota pH nebyla upravena.

Pevné (agarové) půdy:

Pro přípravu pevných půd bylo smícháno 1000 ml připravené směsi vybraného média s 15 g agaru (Kulich). Sterilizovaná agarová média byla rozlita na Petriho misky, a za laboratorní teploty ve sterilním prostředí byla ponechána ztuhnout.

2.2 Chemikálie a enzymy

Použité chemikálie a enzymy jsou shrnuty v Tab. 2.1. Chemikálie byly nakoupeny od výrobců Invitrogen (Carlsbad, California), NEB (Ipswich, Massachusetts), Top-Bio (Praha, Česká republika), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri), Duchefa (Haarlem, Nizozemí), Serva (Heidelberg, Německo), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California) a Fermentas (Vilnius, Litva).

Tab. 2.1 – Seznam použitých chemikálií a enzymů

Komerční název chemikálie	Výrobce	Čistota
Purified BSA 100x (10mg/ml)	NEB	p.a.
10x LA PCR buffer complete	Top-Bio	p.a.
PCR dNTP mix	Top-Bio	p.a.
Agarosa for routine use	Sigma-Aldrich	
Glycerol 100%	Duchefa	p.a.
Kys. etylendiaminotetraoctová	Sigma	p.a.
LA DNA polymerase mix	Top-Bio	p.a.
PCR vkládací pufr Yellow load	Top-Bio	p.a.
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen	p.a.
Tris (hydroxymetyl) aminometan	Serva	p.a.
10x Taq buffer without MgCl ₂	Top-Bio	p.a.
10x Taq buffer with MgCl ₂	Top-Bio	p.a.
MgCl ₂	Top-Bio	p.a.
DMSO	Sigma-Aldrich	p.a.
DreamTaq DNA Polymerase	Fermentas	p.a.
Thaxtomin A	Santa Cruz Biotechnology	≥96%
Acetonitrile	Sigma-Aldrich	HPLC Grade

2.3 Roztoky

Použité roztoky jsou shrnuty v Tab. 2.2 a byly analytické čistoty.

Tab. 2.2 – Složení použitých pufrů a roztoků

Název roztoku	Chemikálie	Výsledná koncentrace	pH
Tris-acetát-EDTA pufr (TAE)	Tris	40 mM	8
	EDTA	1 mM	(kys. octovou)
TE ⁻¹ pufr	Tris	10 mM	8
	EDTA	0,1 mM	(HCl)

2.4 Komerční soupravy a standardy molekulové váhy

Pro přečištění PCR produktu – QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Germantown, Maryland)

Pro izolaci chDNA – Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin)

Pro izolaci DNA z gelu – Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

1 kB plus DNA ladder (Invitrogen)

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20 000 bp (Fermentas)

2.5 Primery pro PCR

Použité primery pH [53] a 27f [54] byly dodány firmou Eurogentec. Sekvence primerů použitých k amplifikaci genu pro 16S rRNA je uvedena v Tab. 2.3. . Primery nasedají v pozicích odpovídajících číslování podle genu pro 16S rRNA u *Escherichia coli*.

Tab. 2.3 – Sekvence použitých primerů

Název primeru	Sekvence (5'→3')	Pozice
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1522-41
27f	AGAGTTTGATCMTGGCKCAG	8-27

Primery použité k amplifikaci genu pro syntézu thaxtominu A byly dodány firmou Eurogentec a jejich sekvence je uvedena v Tab. 2.4.

Tab. 2.4 – Sekvence použitých primerů

Název primeru	Sekvence (5'→3')	Reference
TXTA1F	TCGTGCTCAACTCCGTGAT	
TXTA1R	GCCGTCGTGAAGAACTCCG	
STXa	GTGGACCGTGGAGCATCT	[31]
STXb	CAGTTCGGCGTAACTCAGC	[31]

2.6 Software

Alignment sekvencí a fylogram byly vytvořeny pomocí programů Muscle 3.6 [56] a Phylip package 3.67 [57], při použití modelu nukleotidové substituce podle Kimura [58].

2.7 Přístroje

Mini Bead Beater (BioSpec Products, Bartlesville, Oklahoma)

Termocykler C1000 Thermal Cycler (Biorad, Berkley, California)

Dokumentační systém InGenius a PC software (Syngene, Cambridge, Spojené království)

Hmotnostní spektrometr Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS System (Agilent Technologies, Santa Clara, California)

Dále byly použity přístroje běžně dostupné v laboratoři.

3 Metody

3.1 Izolace bakteriálních kmenů

Izolace jednotlivých kmenů byla prováděna z brambor odebraných z pokusného pole u Vyklantic na Vysočině (souřadnice: N49 33.700 E15 03.283) metodou otisku na různá živná agarová média uvedená v kapitole 6.1.

Pro tento pokus byly vybrány pouze napadené brambory a jejich části napadené strupovitostí byly otištěny na živná média. Takto inokulované misky byly inkubovány v termostatu při 28 °C po dobu 7 dnů. Následně byly metodou roztěru shluky kolonií naředěny natolik, aby bylo možné izolovat jednotlivé bakteriální kolonie. Tyto kolonie byly kultivovány na BG agaru při 28 °C po dobu 7 dnů a následně byly použity pro další pokusy.

3.2 Kultivace

Bakteriální kmeny byly kultivovány na miskách s BG agarem v inkubátoru 7-10 dní při teplotě 28 °C. Po odebrání vzorku pro testování byly narostlé kmeny na uzavřených Petriho miskách krátkodobě (řádově týdny) uchovávány v lednici. Pro dlouhodobé skladování byly vzorky konzervovány v mrazícím boxu následovně: malé množství bakterií bylo setřeno z misky a sterilně přeneseno do 1,5 ml mikrozkušavky, která byla z $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ naplněna glycerolem a poté byly mikrozkušavky uloženy v mrazícím boxu při -80 °C.

3.3 Izolace chromozomální DNA

Do 1,5 ml mikrozkušavky s víčkem bylo naváženo po 0,25 g skleněných kuliček o průměru 0,5 a 0,1 mm, které byly následně v autoklávu sterilizovány při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po sterilizaci vychladnutí na laboratorní teplotu bylo přidáno 600 μ l 50 mM sterilní EDTA, pH 8 (sterilizace byla provedena stejným postupem jako u skleněných kuliček). Do roztoku EDTA bylo přidáno asi 20 μ l bakteriálních buněk odebraných z narostlých kolonií. Odběr bakteriálních buněk a přidavek EDTA byl prováděn v laminárním boxu sterilizovaném 25 min UV zářením. Vzorek byl poté homogenizován pomocí homogenizátoru Mini Bead Beater při 2500 rpm po dobu 60

sec, centrifugován při 13 500x g a supernatant převeden do nové 1,5 ml mikrozkušavky. Dále bylo postupováno podle návodu přiloženého u komerční soupravy Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega) od bodu č. 8 z kapitoly: Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria, kromě posledního kroku, kdy bylo místo komerčního roztoku DNA rehydration solution použít TE⁻¹ pufr.

Takto izolovaná chromozomální DNA byla uchovávána v TE⁻¹ pufru v mrazícím boxu při teplotě -20 °C a používána do PCR reakcí.

3.4 Elektroforetické stanovení chDNA

Pro kontrolu kvality a výtěžku chromozomální DNA byla provedena elektroforetická kontrola na agarózovém gelu. Pro přípravu gelu bylo odváženo 0,8 g agarózy a ta byla smíchána s 80 ml TAE pufru (1% roztok agarózy). Tato směs byla následně na 1-2 min přivedena k varu v mikrovlnné troubě, aby došlo k rozpuštění agarózy. Po vychladnutí agarózového roztoku na asi 50 °C bylo přidáno 5 µl barviva SYBR green. Takto upravený roztok byl nalit do formy pro elektroforézu a byl ponechán chladnout na laboratorní teplotu, čímž došlo k jeho ztuhnutí.

Vzorky byly pro elektroforézu připraveny na mikrotitrační destičce. V jamce bylo smícháno 2 µl pufru Yellow load a 5 µl izolované chromozomální DNA.

Po ztuhnutí gelu byla elektroforetická vana naplněna TAE puftrem a do jamek v gelu byly automatickou pipetou nadávkovány vzorky a 5 µl DNA ladderu do jamek na okrajích gelu. Elektroforéza byla provedena při konstantním napětí 100 V po dobu zhruba 20 min. Po ukončení byl gel se vzorky vyfotografován v procházejícím UV světle ($\lambda = 302 \text{ nm}$).

3.5 PCR amplifikace genu pro 16S rRNA

Tento pokus byl proveden ve dvou krocích. V prvním kroku byly smíchány 3 µl BSA (koncentrace zásobního roztoku byla 10 mg/ml) se vzorkem chDNA a doplněny TE⁻¹ puftrem na výsledný objem 10 µl a byla provedena denaturace vzorku v termocykleru (95,0 °C, 10 min). Množství chDNA použité pro reakci bylo 50-100 ng a bylo odhadnuto z elektroforeogramů získaných po izolaci chDNA.

Ve druhém kroku byl přidán reakční mix pro PCR na výsledný objem 50 μ l, složení je uvedeno v Tab. 3.1. Termocykler byl nastaven dle hodnot uvedených v Tab 3.2.

Tab. 3.1 – Reakční mix použitý pro amplifikaci genu pro 16S rRNA

Chemikálie (vstupní koncentrace)	Objem (μl)
10x LA PCR buffer complete	5
Primery 27f (10 μ M)	2
Primery pH (10 μ M)	2
dNTPs (10 mM)	1
100 x BSA (10 mg/ml)	3
LA DNA polymerase mix (5 U/ μ l)	1
Dest. H ₂ O	26

Tab. 3.2 - Reakční podmínky termocykleru pro amplifikaci genu pro 16S rRNA

95,0 °C, 180 sec	1x
95,0 °C, 45 sec	34x
57,0 °C, 45 sec	
68,0 °C, 60 sec	
68,0 °C, 300 sec	1x
4,0 °C	

Na závěr byla pro kontrolu provedena elektroforéza v agarózovém gelu. Postup se shoduje s postupem uvedeným v kapitole 3.4, kromě množství nanášeného vzorku, které bylo pouze 2 μ l a 2 μ l Yellow load pufru.

3.6 Přečištění PCR produktu

Pro přečištění PCR produktu, získaného pokusem uvedeným v předchozí kapitole, byla použita komerční souprava QIAquick® PCR Purification Kit. Při přečištění bylo postupováno dle instrukcí výrobce.

Centrifugace byly provedeny při 16 000x g za laboratorní teploty v kolonkách přiložených u komerční soupravy nebo v 1,5 ml mikrozkuvkách.

Na závěr byla pro kontrolu provedena elektroforéza v agarózovém gelu. Postup se shoduje s postupem uvedeným v kapitole 3.4, kromě množství nanášeného vzorku, které bylo pouze 2 μ l a 2 μ l Yellow load pufru.

3.7 Izolace DNA fragmentu z gelu

U některých vzorků byly nalezeny při elektroforetickém stanovení dva fragmenty. Nespecifický fragment by rušil sekvenaci, proto musel být fragment o správné velikosti izolován. Izolace specifického fragmentu byla provedena elektroforeticky s následným vyříznutím z gelu a přečištěním. Elektroforéza byla provedena stejným postupem, jaký je uveden v kapitole 3.4, s tím rozdílem, že jako vzorek byl nanesen celý objem PCR produktu (50 μ l) a odpovídajícím poměrem byl přidán i Yellow load pufr (5 μ l). Pod UV osvětlením ($\lambda = 302$ nm) byl z gelu vyříznut fragment o správné velikosti a k jeho izolaci a přečištění byla použita komerční souprava Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Na závěr byla pro kontrolu provedena elektroforéza v agarózovém gelu. Postup se shoduje s postupem uvedeným v kapitole 7.4, kromě množství nanášeného vzorku, které bylo pouze 2 μ l a 2 μ l Yellow load pufru.

3.8 Sekvence PCR produktu

Sekvence výsledného produktu byla prováděna firmou Macrogen se sídlem v Soulu, Korea.

Vzorky získané postupy uvedenými v kapitolách 3.1 – 3.7 byly firmě dodávány o požadované čistotě a koncentracích 20-100 μ g/ml. Sekvence byla prováděna ve směru 5' \rightarrow 3' pomocí standardních primerů firmy Macrogen, komerčně nazvaných 27f.

3.9 Kultivační pokusy potlačení *Streptomyces scabiei*

Pro tyto pokusy byly vyzkoušeny dva různé postupy, které se lišily dobou, kdy byl naočkován testovaný kmen *S. scabiei*. V prvním případě byly naočovány testované bakterie a *S. scabiei* ve stejnou dobu. Ve druhém případě byl naočkován *S. scabiei* s pětidenním zpožděním. Druhý postup dával průkaznější výsledky a v dalších měřeních byl používán pouze tento postup.

Testování bakteriálních kmenů probíhalo na Petriho miskách s kultivačním BG médiem. Na misce byl vždy naočkován testovaný kmen a k němu byl po pěti dnech naočkován *S. scabiei*. Testovaný kmen a *S. scabiei* byly naočovány zhruba 1 cm daleko od sebe do kolmého tvaru (tvar písmene T). Očkování bylo prováděno v boxu

sterilizovaném UV zářením po dobu 25 min. Testované kmeny byly společně kultivovány v inkubátoru při 28 °C po dobu 7-10 dní.

3.10 PCR s primery TXTA1

V těchto pokusech byly testovány vzorky, které byly získány provedením pokusů popsaných v kapitolách 3.1 - 3.7. Složení reakční směsi použité pro tento pokus je shrnuto v Tab. 3.3 a reakční podmínky jsou uvedeny v Tab. 3.4.

Tab. 3.3 – Složení reakční směsi pro stanovení genu syntézy thaxtominu A za použití primerů TXTA1.

Chemikálie (vstupní koncentrace)	Objem (μl)
10x Taq buffer without MgCl ₂	1,50
MgCl ₂ (25mM)	0,60
Primery TXTA1R (10 μM)	0,75
Primery TXTA1F (10 μM)	0,75
dNTPs (10 mM)	0,30
DMSO	0,75
DreamTaq DNA polymerase (5 U/μl)	0,40
Vzorek DNA	50-100 ng
Dest. H ₂ O	Doplnit na objem 15 μl

Tab. 3.4 – Reakční podmínky termocyklieru pro amplifikaci genu syntézy thaxtominu A za použití primerů TXTA1.

95,0 °C, 180 sec	1x
95,0 °C, 30 sec	35x
55,4 °C, 35 sec	
72,0 °C, 45 sec	
72,0 °C, 600 sec	1x
10,0 °C	

3.11 PCR s primery STX

Stejně jako v předchozím pokusu byly použity vzorky, získané postupem popsaným v kapitolách 3.1 - 3.7. Složení reakční směsi použité pro tento pokus je shrnuto v Tab. 3.5 a reakční podmínky v Tab. 3.6.

Tab. 3.5 - Složení reakční směsi pro stanovení genu syntézy thaxtominu A za použití primerů STX.

Chemikálie (zásobní koncentrace)	Objem (μl)
10x Taq buffer without MgCl ₂	1,50
MgCl ₂ (25mM)	0,90
Primery STXa (10 μM)	0,50
Primery STXb (10 μM)	0,50
dNTPs (10 mM)	0,30
DMSO	0,75
DreamTaq DNA polymerase (5 U/μl)	0,50
Vzorek DNA	50-100 ng
Dest. H ₂ O	Doplnit na objem 15 μl

Tab. 3.6 – Reakční podmínky termocyklu pro stanovení genu syntézy thaxtominu A za použití primerů STX.

95,0 °C, 320 sec	1x
95,0 °C, 30 sec	35x
60,0 °C, 45 sec	
72,0 °C, 60 sec	
72,0 °C, 600 sec	1x
10,0 °C	

3.12 Elektroforéza PCR produktů (STX a TXTA1)

Tímto postupem byla elektroforeticky stanovena přítomnost hledaného genu u pokusů uvedených v kapitolách 3.10 - 3.11. Pro tento pokus byl připraven 2% agarózový gel smícháním 1,6 g agarózy a 80 ml TAE pufru. Vzorky byly pro elektroforézu připraveny na mikrotitrační destičce. V jamce bylo smícháno 2 μl pufru Yellow load a 2 μl PCR produktu. Takto připravené vzorky byly naneseny na gel spolu s DNA ladderem (5 μl), který byl nanesen do krajních jamek. Elektroforéza byla provedena za konstantního napětí 100 V po dobu zhruba 25 - 30 minut v závislosti na rychlosti prostupu vzorku do gelu. Po ukončení pokusu byl gel se vzorky vyfotografován pod UV osvětlením ($\lambda = 302$ nm).

3.13 Optimalizace ESI-MS

Zásobní roztok thaxtominu A (C₂₂H₂₂N₄O₆; M_r = 438,17) o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním 1 mg analytu v 1 ml acetonitrilu (C₂H₃N; M_r = 41,05) v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Zásobní roztok byl pomocí externí pumpy

kontinuálně přiváděn do hmotnostního spektrometru. K ionizaci vzorku byl použit elektrosprej (ESI). Cílem těchto pokusů bylo nalézt prekurzorový a produktový ion daného analytu pro budoucí měření v MRM módu (multiple reaction monitoring), což je mód, který sleduje specifický přechod mezi prekurzorovým iontem a produktovým iontem. Pro daný analyt lépe vyhovovalo měření v negativním módu.

4 Výsledky

4.1 Izolace bakteriálních kmenů z rhizosféry brambor

Vzhledem k tomu, že streptomycety způsobují strupovitost na povrchu napadených rostlin, byly izolovány kmeny přímo z bramborové slupky. Izolované kmeny byly později použity k testování patogenity a hledání antagonistů *S. scabiei*. Kultivační média pro tento pokus byla vybírána s ohledem na bakterie, které byly hledány. Hledání bylo zaměřeno na aktinomycety, především pak na streptomycety. Bakterie tohoto rodu nás zajímaly ze dvou důvodů. Prvním z nich je, že popsání původci strupovitosti patří do tohoto rodu a za druhé jsou streptomycety největšími producenty antibioticky aktivních látek a některé kmeny tudíž mohou svou aktivitou potlačit onemocnění.

Pokusy uvedenými v kapitolách 3.1 – 3.7 bylo úspěšně izolováno 38 bakteriálních kmenů, které byly využity pro další pokusy. Dalších 98 kmenů, izolovaných z půdy, bylo dodáno již kultivovaných na miskách Ing. Václavem Kryštůfkem, CSc. z Ústavu půdní biologie, Biologické centrum AV ČR, v.v.i.

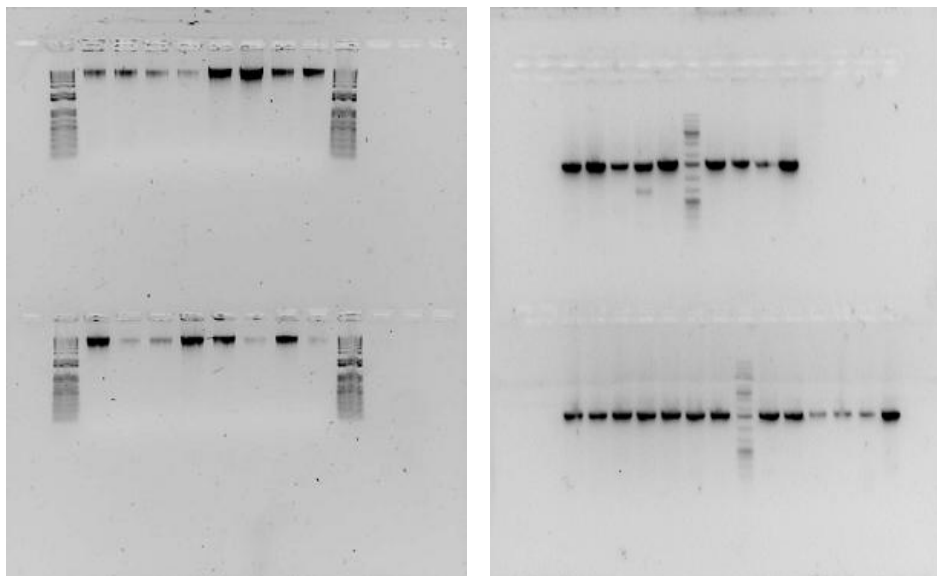
4.2 Vyhodnocení sekvence genu pro 16S rRNA

Vyhodnocením sekvencí genu pro 16S rRNA byla určena fylogenetická příbuznost a taxonomické zařazení bakteriálních kmenů izolovaných z půdy a rhizosféry brambor. Na základě fylogenetické příbuznosti a pokusů popsanych v dalších kapitolách bylo možné určit, jak blízce jsou si příbuzné kmeny způsobující strupovitost a kmeny potlačující *Streptomyces scabiei*.

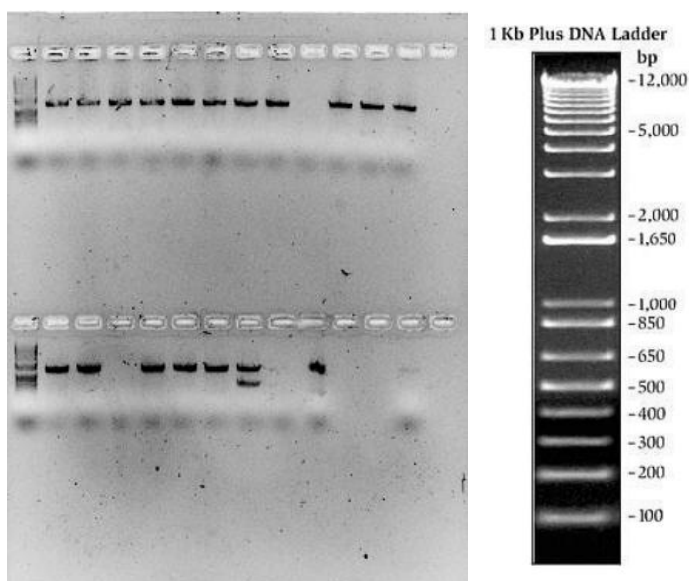
4.2.1 Elektroforéza chDNA a PCR produktu

Ověření přítomnosti DNA a přibližné určení jejího množství bylo provedeno pro chDNA, PCR produkt genu pro 16S rRNA a pro přečištěný PCR produkt. Nejsilnější band u standardu (ladder) odpovídá velikosti DNA fragmentu 1650 bází a množství 40 ng při nanesení 5 μ l roztoku DNA ladder. U některých vzorků byl na elektroforeogramu patrný druhý fragment o velikosti do několika set bází, který po přečištění PCR produktu zmizel nebo byl fragment o správné velikosti izolován

vyříznutím z gelu (kap. 3.7.). Na obr. 4.1 a 4.2 jsou uvedeny ukázkové elektroforeogramy. U některých vzorků bylo třeba amplifikaci genu pro 16S rRNA opakovat, pravděpodobně kvůli znečištění agarem nebo jinou chemikálií ze živného média.



Obr. 4.1 – Elektroforeogram izolace chDNA (vlevo) a PCR produktu (vpravo).



Obr. 4.2 – Elektroforeogram po přečištění PCR produktu (vlevo), krátký difusní fragment je dimer primerů. Standard použitého ladderu (vpravo).

4.2.2 Taxonomická identifikace bakterií

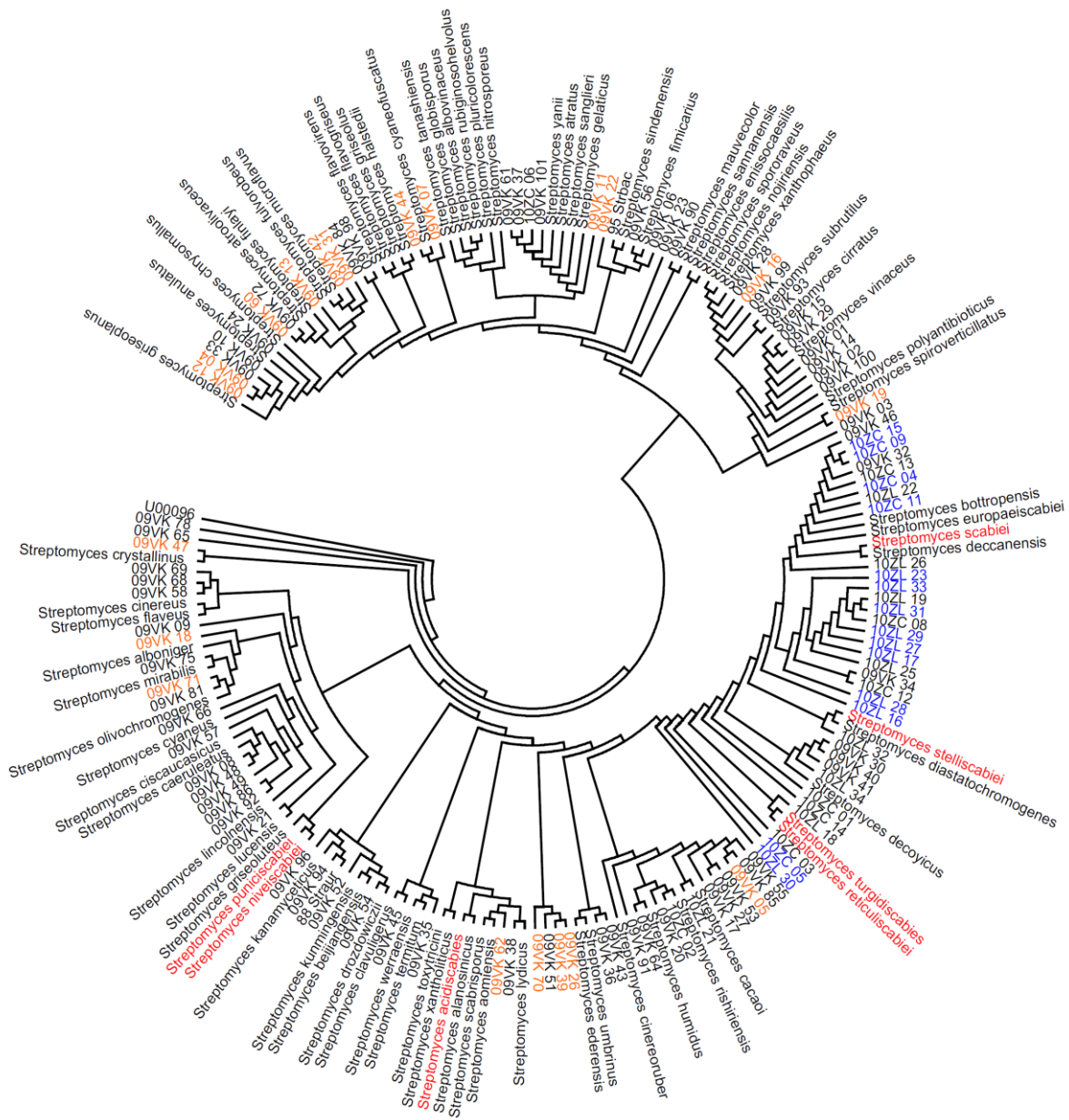
Fylogenetická příbuznost a taxonomické zařazení zkoumaných kmenů bylo stanoveno vyhodnocením získaných sekvencí genu pro 16S rRNA.

Taxonomické zařazení bylo provedeno s využitím nástroje na serveru Ribosomal database project (RDP) [59] a je uvedeno v Tab. 4.1. Kromě tří kmenů byly všechny izolované bakterie zástupci třídy *Actinobacteria*. Výjimku tvoří pouze dva zástupci třídy *Alphaproteobacteria* (vzorek č. 09VK82 a 09VK88) a jeden zástupce třídy *Bacilli* (vzorek č. 09VK87).

Fylogenetický strom příbuznosti je zobrazen na Obr. 4.3 a byly do něj přidány typové kmeny streptomycet pro lepší představu o příbuznosti námi testovaných kmenů. Sekvence typových kmenů byly získány z databáze RDP. Do fylogenetického stromu nejsou zařazeny všechny vzorky, jelikož některé vykazovaly špatný růst na miskách nebo byla získaná sekvence příliš krátká pro jejich zařazení. Ve fylogramu jsou červenou barvou označení popsání původci strupovitosti, hnědou barvou antagonisté *Streptomyces scabiei* a modrou barvou kmeny, u kterých byl nalezen gen pro syntézu thaxtominu (kap. 4.4).

Tab. 4.1 – Rodové zařazení testovaných kmenů

Číslo vzorku	Rod	Číslo vzorku	Rod	Číslo vzorku	Rod
09VK 01	Streptomyces sp.	09VK 42	Streptomyces sp.	09VK 90	Streptomyces sp.
09VK 02	Streptomyces sp.	09VK 43	Streptomyces sp.	09VK 91	Streptomyces sp.
09VK 03	Streptomyces sp.	09VK 44	Streptomyces sp.	09VK 92	Streptomyces sp.
09VK 04	Streptomyces sp.	09VK 45	Streptomyces sp.	09VK 93	Streptomyces sp.
09VK 05	Streptomyces sp.	09VK 46	Streptomyces sp.	09VK 94	Streptomyces sp.
09VK 06	Streptomyces sp.	09VK 47	Streptomyces sp.	09VK 96	Streptomyces sp.
09VK 07	Streptomyces sp.	09VK 48	Streptomyces sp.	09VK 98	Streptomyces sp.
09VK 08	Streptomyces sp.	09VK 49	Streptomyces sp.	09VK 99	Streptomyces sp.
09VK 09	Streptomyces sp.	09VK 50	Microbacterium sp.	09VK 100	Streptomyces sp.
09VK 10	Streptomyces sp.	09VK 51	Streptomyces sp.	09VK 101	Streptomyces sp.
09VK 11	Streptomyces sp.	09VK 52	Streptomyces sp.	10ZC 01	Streptomyces sp.
09VK 12	Streptomyces sp.	09VK 53	Streptomyces sp.	10ZC 02	Streptomyces sp.
09VK 13	Streptomyces sp.	09VK 54	Streptomyces sp.	10ZC 03	Streptomyces sp.
09VK 14	Streptomyces sp.	09VK 55	Streptomyces sp.	10ZC 04	Streptomyces sp.
09VK 15	Streptomyces sp.	09VK 56	Streptomyces sp.	10ZC 05	Streptomyces sp.
09VK 16	Streptomyces sp.	09VK 57	Streptomyces sp.	10ZC 06	Streptomyces sp.
09VK 17	Streptomyces sp.	09VK 58	Streptomyces sp.	10ZC 08	Streptomyces sp.
09VK 18	Streptomyces sp.	09VK 60	Streptomyces sp.	10ZC 09	Streptomyces sp.
09VK 19	Streptomyces sp.	09VK 61	Streptomyces sp.	10ZC 11	Streptomyces sp.
09VK 20	Streptomyces sp.	09VK 62	Streptomyces sp.	10ZC 12	Streptomyces sp.
09VK 21	Streptomyces sp.	09VK 63	Frigoribacterium sp.	10ZC 13	Streptomyces sp.
09VK 22	Streptomyces sp.	09VK 64	Streptomyces sp.	10ZC 14	Streptomyces sp.
09VK 23	Streptomyces sp.	09VK 65	Streptomyces sp.	10ZC 15	Streptomyces sp.
09VK 24	Streptomyces sp.	09VK 66	Streptomyces sp.	10ZL 16	Streptomyces sp.
09VK 25	Arthrobacter sp.	09VK 67	Kribbella sp.	10ZL 17	Streptomyces sp.
09VK 26	Streptomyces sp.	09VK 68	Streptomyces sp.	10ZL 18	Streptomyces sp.
09VK 27	Streptomyces sp.	09VK 69	Streptomyces sp.	10ZL 19	Streptomyces sp.
09VK 28	Streptomyces sp.	09VK 70	Streptomyces sp.	10ZL 21	Streptomyces sp.
09VK 29	Streptomyces sp.	09VK 71	Streptomyces sp.	10ZL 22	Streptomyces sp.
09VK 30	Streptomyces sp.	09VK 72	Streptomyces sp.	10ZL 23	Streptomyces sp.
09VK 31	Streptomyces sp.	09VK 75	Streptomyces sp.	10ZL 25	Streptomyces sp.
09VK 32	Streptomyces sp.	09VK 76	Micromonospora sp.	10ZL 26	Streptomyces sp.
09VK 33	Streptomyces sp.	09VK 78	Streptomyces sp.	10ZL 27	Streptomyces sp.
09VK 34	Streptomyces sp.	09VK 81	Streptomyces sp.	10ZL 28	Streptomyces sp.
09VK 35	Streptomyces sp.	09VK 82	Methylobacterium sp.	10ZL 29	Streptomyces sp.
09VK 36	Streptomyces sp.	09VK 84	Streptomyces sp.	10ZL 30	Streptomyces sp.
09VK 37	Streptomyces sp.	09VK 85	Streptomyces sp.	10ZL 31	Streptomyces sp.
09VK 38	Streptomyces sp.	09VK 86	Streptomyces sp.	10ZL 32	Streptomyces sp.
09VK 39	Streptomyces sp.	09VK 87	Bacillus sp.	10ZL 33	Streptomyces sp.
09VK 40	Streptomyces sp.	09VK 88	Methylobacterium sp.	10ZL 34	Streptomyces sp.
09VK 41	Streptomyces sp.	09VK 89	Arthrobacter sp.	10ZL 35	Nonomuraea sp.

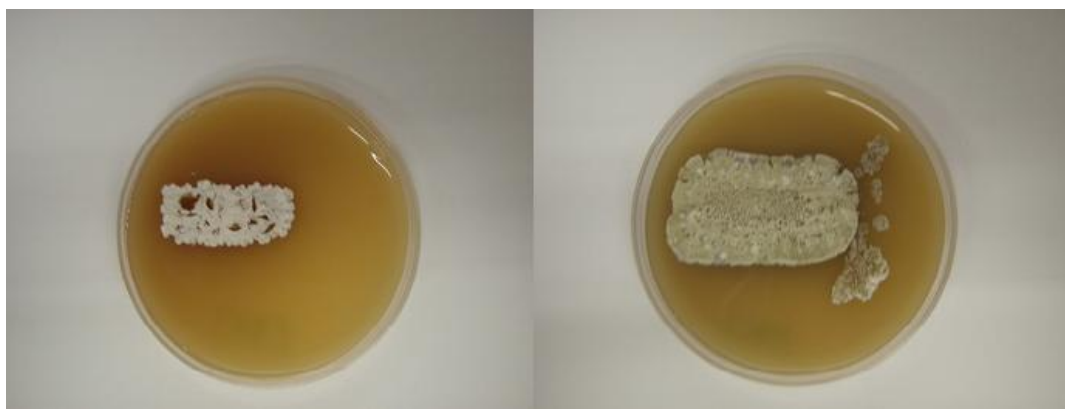


Obr. 4.3 – Fylogram testovaných kmenů a typových kmenů přidanych z RDP. Typové kmeny nesou celý název a námi testované kmeny mají číselné označení. Dále jsou vyznačeny kmeny vykazující pozitivní PCR test na přítomnost genu pro syntézu thaxtominu A (modrá), antagonisté *Streptomyces scabiei* (hnědá) a popsání původci strupovitosti (červená).

4.3 Testy potlačení *Streptomyces scabiei*

Tímto jednoduchým *in vitro* kultivačním pokusem bylo zjištěno, které z izolovaných bakteriálních kmenů způsobují potlačení *Streptomyces scabiei*. Pro tyto pokusy bylo použito BG agarové médium, na kterém testované kmeny i *S. scabiei* vykazují dobrý růst.

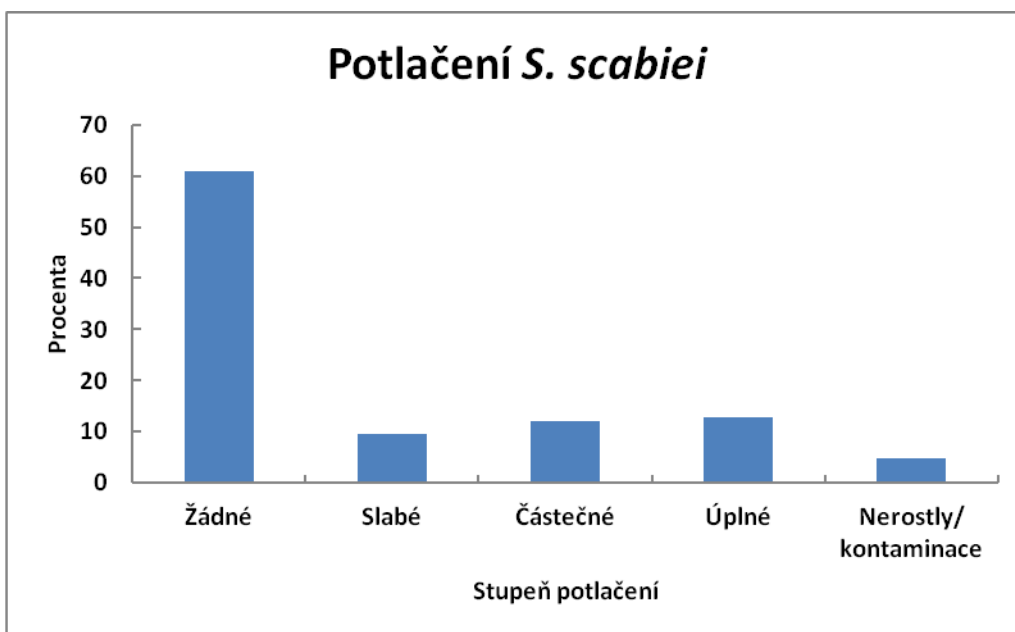
Testy byly provedeny na celkem 125 kmenech bakterií. Na Obr. 4.4 a 4.5 jsou znázorněny ukázky různého potlačení *S. scabiei* testovanými kmeny. Procentuální zastoupení a úspěšnost antagonistů je znázorněno na Obr. 4.6 a je rozděleno podle intenzit účinku zobrazených na Obr. 4.4 a 4.5. Bakteriální kmeny, které potlačují *S. scabiei*, jsou potenciální producenti sekundárních metabolitů.



Obr. 4.4 – Různá intenzita potlačení *S. scabiei*: úplné (vlevo) a částečné (vpravo) potlačení.



Obr. 4.5 - Různá intenzita potlačení *S. scabiei*: slabé potlačení.

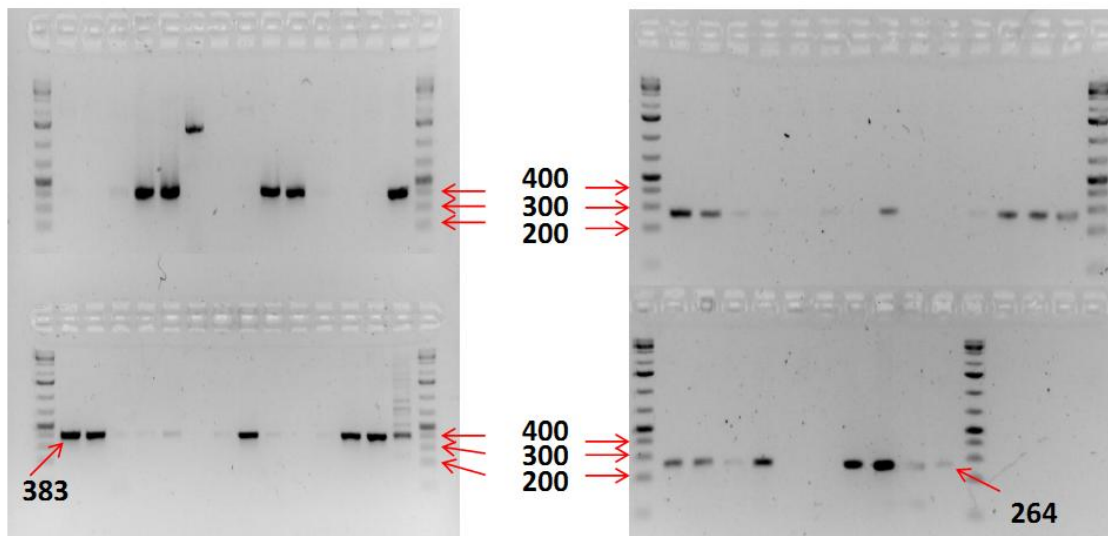


Obr. 4.6 – Procentuální zastoupení kmenů testovaných na potlačení *S. scabiei*.

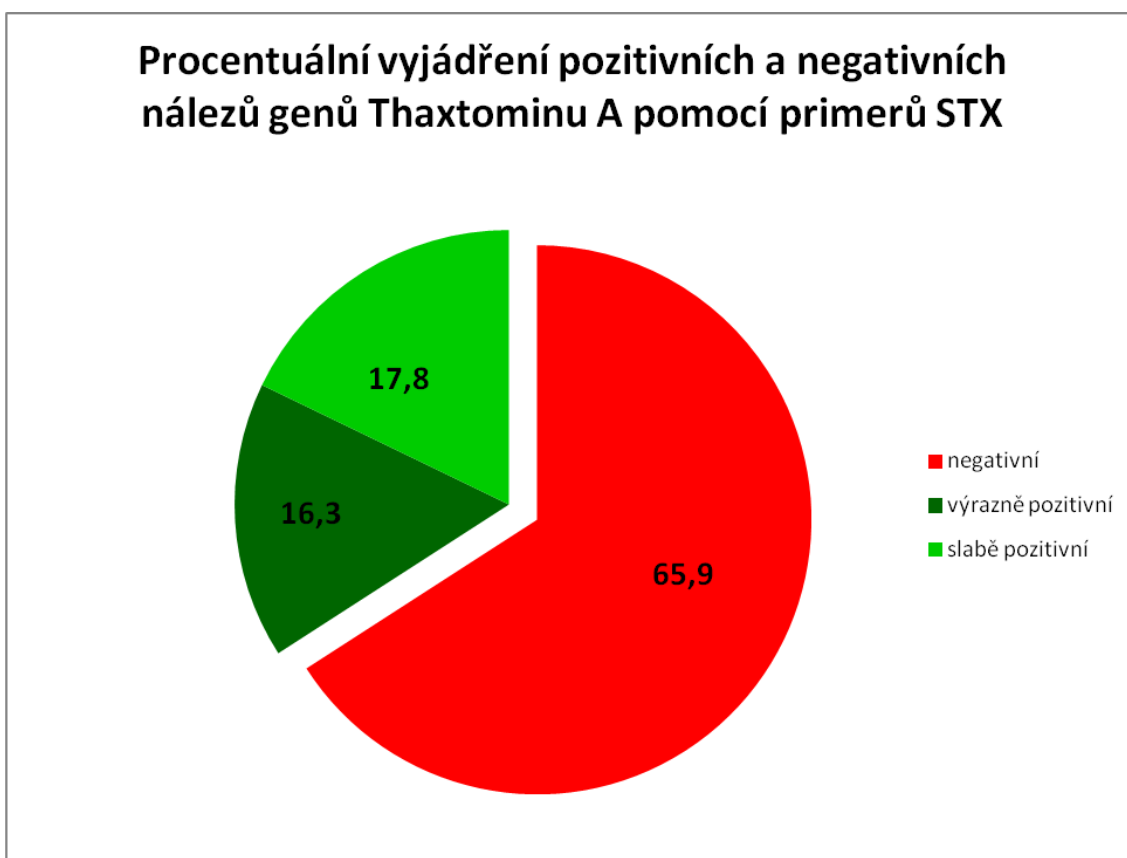
4.4 Stanovení genu pro syntézu thaxtominu A

Produkce thaxtominu A je společný rys všech bakterií způsobujících strupovitost. Identifikací jednoho z genů, nezbytných pro jeho tvorbu, můžeme poměrně rychle určit potenciální patogenní organismus a kombinací s metodou fylogenetického zařazení určit i vzájemnou příbuznost.

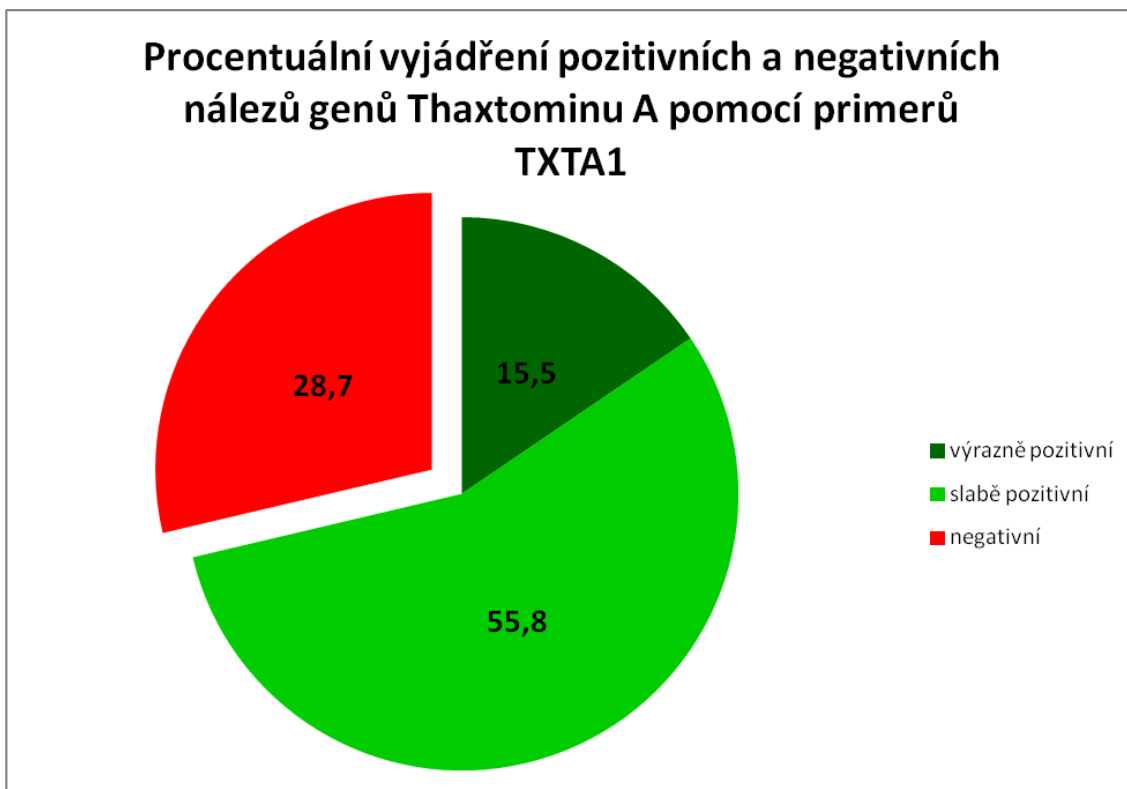
Elektroforeticky byla zjišťována přítomnost genů pro syntézu thaxtominu po PCR amplifikaci. Pro tento pokus byly použity různé primery (STX a TXTA1) a na elektroforeogramech je vidět rozdílná velikost fragmentů (Obr. 4.7). Na elektroforeogramech byly rozlišovány výrazně a slabě pozitivní výsledky PCR v závislosti na jejich intenzitě (Obr. 4.7). Procentuálně bylo vyhodnoceno množství kmenů pozitivních na přítomnost těchto genů (Obr. 4.8 a 4.9) a porovnáno, jestli byly výsledky shodné při použití různých primerů (Tab. 4.2).



Obr. 4.7 – Elektroforeogramy PCR produktů za použití STX primerů (vlevo) a TXTA1 (vpravo).



Obr. 4.8 – Procentuální vyjádření přítomnosti biosyntetických genů *txtA* a *txtB* nezbytných pro syntézu thaxtominu detekovaných pomocí STX primerů.



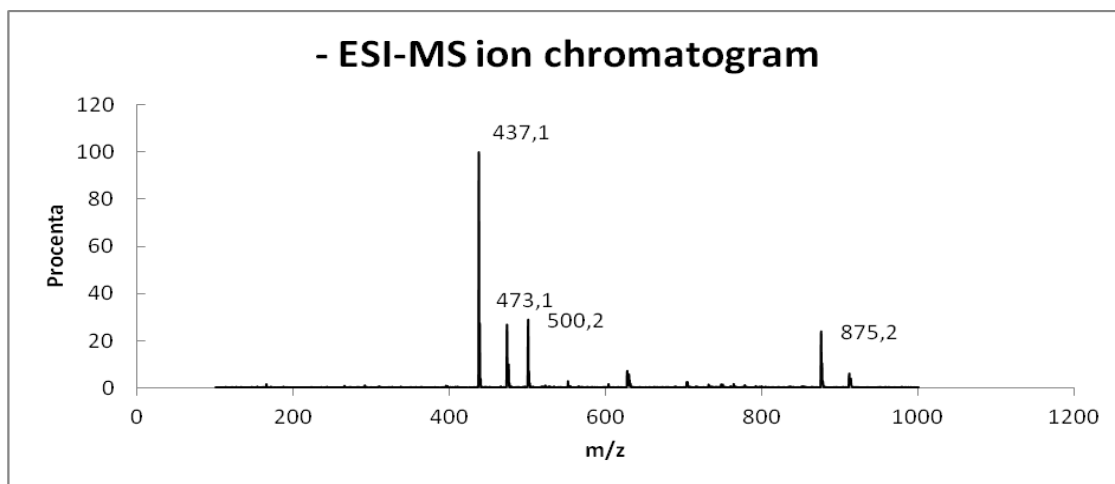
Obr. 4.9 – Procentuální vyjádření přítomnosti genu *txtA* nezbytného pro syntézu thaxtominu detekovaného pomocí TXTA1 primerů.

Tab. 4.2 – Výsledky PCR amplifikace za použití primerů STX a TXTA1. Barevně jsou označené vzorky, které měly shodné výsledky: negativní (N; červená), výrazně pozitivní (VP; zelená), slabě pozitivní (SP; světle zelená), kombinace slabě pozitivního a výrazně pozitivního výsledku (modrá).

vzorek č.	txtA1	STX	vzorek č.	txtA1	STX	vzorek č.	txtA1	STX
10ZC04	VP	VP	10ZC02	N	N	09VK53	N	SP
10ZC05	VP	VP	10ZC08	N	N	09VK55	N	SP
10ZC09	VP	VP	10ZL25	N	N	09VK56	N	VP
10ZC11	VP	VP	10ZL35	N	N	09VK60	SP	N
10ZC15	VP	VP	09VK06	SP	VP	09VK61	N	SP
10ZL16	VP	VP	09VK67	SP	VP	09VK62	SP	N
10ZL17	VP	VP	09VK69	VP	SP	09VK63	SP	N
10ZL23	VP	VP	09VK89	SP	VP	09VK64	SP	N
10ZL27	VP	VP	10ZL32	SP	VP	09VK65	SP	N
10ZL28	VP	VP	09VK01	SP	N	09VK66	SP	N
10ZL29	VP	VP	09VK02	SP	N	09VK71	N	SP
10ZL30	VP	VP	09VK03	SP	N	09VK72	SP	N
10ZL31	VP	VP	09VK04	SP	N	09VK73	X	X
10ZL33	VP	VP	09VK05	SP	N	09VK74	X	X
09VK21	SP	SP	09VK07	SP	N	09VK76	SP	N
09VK25	SP	SP	09VK08	SP	N	09VK77	SP	N
09VK30	SP	SP	09VK09	SP	N	09VK78	SP	N
09VK75	SP	SP	09VK10	VP	N	09VK79	SP	N
09VK80	SP	SP	09VK11	SP	N	09VK83	X	X
09VK82	SP	SP	09VK13	VP	N	09VK85	SP	N
09VK94	SP	SP	09VK14	SP	N	09VK86	SP	N
10ZC01	SP	SP	09VK16	SP	N	09VK87	SP	N
10ZC03	SP	SP	09VK18	SP	N	09VK88	SP	N
10ZL18	SP	SP	09VK20	SP	N	09VK90	N	SP
10ZL19	SP	SP	09VK22	VP	N	09VK91	SP	N
10ZL26	SP	SP	09VK23	VP	N	09VK92	SP	N
09VK12	N	N	09VK24	VP	N	09VK93	SP	N
09VK15	N	N	09VK26	SP	N	09VK95	X	X
09VK17	N	N	09VK27	N	SP	09VK96	SP	N
09VK19	N	N	09VK28	SP	N	09VK97	X	X
09VK31	N	N	09VK29	SP	N	09VK98	SP	N
09VK32	N	N	09VK33	SP	N	09VK100	SP	N
09VK35	N	N	09VK34	N	SP	09VK101	SP	N
09VK36	N	N	09VK37	X	X	10ZC06	SP	N
09VK42	N	N	09VK38	SP	N	10ZC07	SP	N
09VK45	N	N	09VK39	SP	N	10ZC10	X	X
09VK46	N	N	09VK40	SP	N	10ZC12	SP	N
09VK54	N	N	09VK41	SP	N	10ZC13	SP	N
09VK57	N	N	09VK43	SP	N	10ZC14	SP	N
09VK58	N	N	09VK44	N	SP	10ZL20	N	VP
09VK59	N	N	09VK47	SP	N	10ZL21	SP	N
09VK68	N	N	09VK48	SP	N	10ZL22	N	SP
09VK70	N	N	09VK49	SP	N	10ZL24	N	SP
09VK81	N	N	09VK50	SP	N	10ZL34	N	VP
09VK84	N	N	09VK51	SP	N			
09VK99	N	N	09VK52	SP	N			

4.5 ESI-MS chromatogram

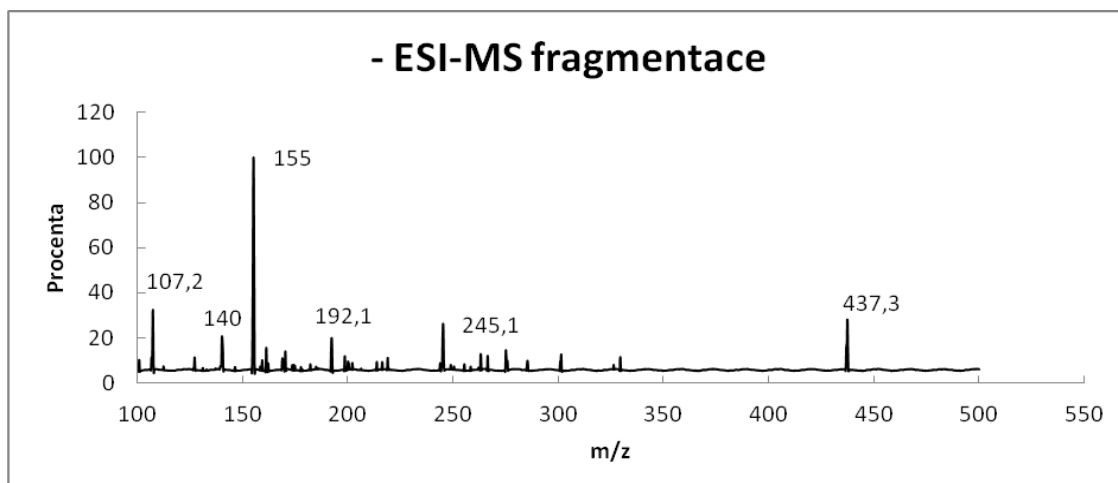
Při tomto měření bylo nastaveno napětí na fragmentoru 135 V a měření bylo provedeno v negativním módu. Nejvýraznější intenzita byla naměřena pro thaxtomin A. Výsledný chromatogram je uveden na Obr. 4.10.



Obr. 4.10 – Iontový chromatogram ESI-MS v negativním módu.

4.6 Fragmentace a nalezení produktového iontu

Fragmentován byl ion thaxtominu A ($m/z = 437,1$). Při tomto měření bylo nastaveno napětí na fragmentoru 135 V, kolizní energie 25 V a měření bylo provedeno v negativním módu. Výsledný chromatogram je uveden na Obr. 4.11.



Obr. 4.11 – Iontový chromatogram fragmentace ESI-MS v negativním módu.

5 Diskuze

Izolací bakteriálních kmenů z rhizosféry brambor bylo získáno dostačující množství kmenů, přestože docházelo ke kontaminaci rychleji rostoucími kmeny, které v některých případech úplně potlačily růst pomaleji se rozvíjejících aktinomycet. Během kultivačních pokusů bylo ověřeno, že aktinomycety dobře rostou na BG médiu a v ovesném médiu, které je také používáno k aktivaci produkce thaxtominu [47]. Kultivační pokusy ověřující potlačení růstu *S. scabiei* mohly být zatíženy vysokou koncentrací vápníku v BG médiu, který často tvoří koordinační sloučeniny, čímž může inaktivovat sekundární metabolity produkované některými streptomycetami. Tato skutečnost mohla negativně ovlivnit projev antagonismu u některých bakteriálních kmenů.

Z fylogenetického stromu vyplývá, že patogenní bakterie rodu *Streptomyces* nemusí být blízce příbuzné, a tímto zjištěním byla podpořena hypotéza horizontálního genového přenosu ostrovu patogenity na původně nepatogenní kmeny [29]. Pomocí identifikace bakterií metodou sekvenace genu pro 16S rRNA byly nalezeny kmeny blízce příbuzné patogenním kmenům *S. europaeiscabiei*, *S. acidiscabies* a *S. scabiei*, jejichž výskyt byl popsán i ve Francii a ve Spojených státech amerických [8, 11]. Toto zjištění podporuje tvrzení o celosvětovém rozšíření tohoto onemocnění [8].

Na fylogramu je možné také nalézt oblasti blízce příbuzných bakterií, které potlačují *S. scabiei* a je zde i jistá pravděpodobnost, že by byly schopné potlačovat také blízce příbuzný kmen *S. europaeiscabiei*, který je také patogenní. I někteří antagonisté jsou překvapivě blízce příbuzní patogenním organismům, což naznačuje, že některé kmeny způsobující strupovitost by mohly zároveň potlačovat jiné původce. Antagonisté *S. scabiei* jsou zároveň potenciálními producenty dalších sekundárních metabolitů.

Metodou PCR za použití primerů STX a TXTA1 je možné nalézt geny pro syntézu thaxtominu a identifikovat poměrně rychle producenty tohoto sekundárního metabolitu, jehož produkce je společná většině patogenů [31, 55]. Kmeny bakterií obsahující gen pro syntézu thaxtominu byly v porovnání s typovými kmeny druhů rodu *Streptomyces* příbuzné několika popsaným původcům strupovitosti, mezi které patří *S. scabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. turgidiscabies* a *S. reticuliscabiei*. K vyhodnocení

přítomnosti genů pro syntézu thaxtominu u testovaných bakteriálních kmenů byly použity pouze shodné výsledky obou primerů, protože tyto výsledky v některých případech vykazovaly mírnou odlišnost. U streptomycet dochází velmi často ke změnám genetické informace a patří k nejrychleji se rozvíjejícím taxonům [1]. To může vést i k mutacím v ostrovu patogenity a způsobit různé výsledky u používaných primerů [60].

Jelikož je thaxtomin A nejčastěji se vyskytujícím typem thaxtominu [42], byla provedena optimalizace jeho stanovení na hmotnostním spektrometru. Izolace a následné měření thaxtominu A by mohlo usnadnit detekci půd, ve kterých se vyskytují patogenní organismy produkující tento fytoxin. Také by bylo možné snadno detekovat patogenní kmeny testované *in vitro* na přítomnost thaxtominu A.

6 Závěr

Mezi izolovanými kmeny řádu *Actinomycetales* byli objeveni jak původci obecné strupovitosti brambor, tak i antagonisté potlačující hlavního původce tohoto onemocnění *Streptomyces scabiei*.

U izolovaných kmenů byla provedena sekvenace genu pro 16S rRNA a na jejím základě byly testované kmeny taxonomicky zařazeny a byl vytvořen jejich fylogenetický strom.

Využitím metody PCR k detekci genů nutných pro syntézu thaxtominu byly nalezeny potenciálně patogenní kmeny a zařazeny do fylogenetického stromu.

Na základě přímého vstříku analytu (thaxtomin A) do hmotnostního spektrometru byly nalezeny vhodné charakteristické ionty pro budoucí měření v MRM módu a optimální hodnoty nastavení fragmentoru a kolizní energie.

Seznam použité literatury

1. Sedláček, I., *Taxonomie prokaryot*. 1.vydání ed. 2007, Brno: Masarykova univerzita. 270.
2. Challis, G.L. and D.A. Hopwood, *Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**: p. 14555-14561.
3. Lüllmann, H., K. Mohr, and M. Wehling, *Farmakologie a toxikologie*. 2004: Grada publishing a.s.
4. Lincová, D. and H. Farghali, *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2005: Galén.
5. Watve, M.G., et al., *How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces?* Archives of Microbiology, 2001. **176**(5): p. 386-390.
6. Baltz, R.H., *Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes*. Current Opinion in Pharmacology, 2008. **8**(5): p. 557-563.
7. Hiltunen, L.H., et al., *Elimination of common scab sensitive progeny from a potato breeding population using thaxtomin A as a selective agent*. Plant Pathology, 2011. **60**(3): p. 426-435.
8. Wanner, L.A., *A survey of genetic variation in Streptomyces isolates causing potato common scab in the United States*. Phytopathology, 2006. **96**(12): p. 1363-1371.
9. Hill, J. and G. Lazarovits, *A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada*. Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie, 2005. **27**(1): p. 46-52.
10. Loria, R., et al., *Plant pathogenicity in the genus Streptomyces*. Plant Disease, 1997. **81**(8): p. 836-846.
11. Bouček-Mechiche, K., et al., *DNA relatedness among strains of Streptomyces pathogenic to potato in France: description of three new species, S-europaeiscabiei sp nov, and S-stelliscabiei sp. nov associated with common scab, and S-reticuliscabiei sp nov associated with netted scab*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000. **50**: p. 91-99.
12. Bukhalid, R.A., et al., *Horizontal transfer of the plant virulence gene, nec1, and flanking sequences among genetically distinct Streptomyces strains in the diastatochromogenes cluster*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(2): p. 738-744.
13. Lambert, D.H. and R. Loria, *STREPTOMYCES-ACIDISCABIES SP-NOV*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1989. **39**(4): p. 393-396.
14. Park, D.H., et al., *Characterization of streptomycetes causing potato common scab in Korea*. Plant Disease, 2003. **87**(11): p. 1290-1296.
15. Toth, L., et al., *Isolation and identification of pathogenic strains of Streptomyces acidiscabies from netted scab lesions of potato tubers in Hokkaido (Japan)*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2001. **48**(3-4): p. 575-85.

16. Natsume, M., et al., *Phytotoxin produced by Streptomyces cheloniumii causing potato russet scab*, in *New Discoveries in Agrochemicals*, J.M. Clark and H. Ohkawa, Editors. 2005. p. 239-245.
17. Kreuze, J.F., et al., *Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the nec1 gene from Streptomyces spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland*. *Phytopathology*, 1999. **89**(6): p. 462-469.
18. Lazarovits, G., et al., *Edaphic soil levels of mineral nutrients, pH, organic matter, and cationic exchange capacity in the geocaulosphere associated with potato common scab*. *Phytopathology*, 2007. **97**(9): p. 1071-1082.
19. Lambert, D.H., M.L. Powelson, and W.R. Stevenson, *Nutritional interactions influencing diseases of potato*. *American Journal of Potato Research*, 2005. **82**(4): p. 309-319.
20. Lacey, M.J. and C.R. Wilson, *Relationship of common scab incidence of potatoes grown in Tasmanian ferrosol soils with pH, exchangeable cations and other chemical properties of those soils*. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 2001. **149**(11-12): p. 679-683.
21. McGregor, A.J. and G.C.S. Wilson, *INFLUENCE OF MANGANESE ON DEVELOPMENT OF POTATO SCAB*. *Plant and Soil*, 1966. **25**(1): p. 3-&.
22. Lapwood, D.H., L.W. Wellings, and J.H. Hawkins, *IRRIGATION AS A PRACTICAL MEANS TO CONTROL POTATO COMMON SCAB (STREPTOMYCES-SCABIES)*. *Plant Pathology*, 1971. **20**(4): p. 157-&.
23. Lewis, B.G., *EFFECTS OF WATER POTENTIAL ON INFECTION OF POTATO TUBERS BY STREPTOMYCES-SCABIES IN SOIL*. *Annals of Applied Biology*, 1970. **66**(1): p. 83-&.
24. Mishra, K.K. and J.S. Srivastava, *Screening potato cultivars for common scab of potato in a naturally infested field*. *Potato Research*, 2001. **44**(1): p. 19-24.
25. Hacker, J., et al., *Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution*. *Molecular Microbiology*, 1997. **23**(6): p. 1089-1097.
26. Arber, W., *EVOLUTION OF PROKARYOTIC GENOMES*. *Gene*, 1993. **135**(1-2): p. 49-56.
27. Lee, C.A., *Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens*. *Infectious Agents and Disease-Reviews Issues and Commentary*, 1996. **5**(1): p. 1-7.
28. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell, 4th edition*. 2002, New York: Garland Science.
29. Kers, J.A., et al., *A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on Streptomyces species*. *Molecular Microbiology*, 2005. **55**(4): p. 1025-1033.
30. Lerat, S., A.M. Simao-Beauvoir, and C. Beaulieu, *Genetic and physiological determinants of Streptomyces scabies pathogenicity*. *Molecular Plant Pathology*, 2009. **10**(5): p. 579-585.
31. Flores-Gonzalez, R., I. Velasco, and F. Montes, *Detection and characterization of Streptomyces causing potato common scab in Western Europe*. *Plant Pathology*, 2008. **57**(1): p. 162-169.

32. Healy, F.G., et al., *The txtAB genes of the plant pathogen Streptomyces acidiscabies encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity*. Molecular Microbiology, 2000. **38**(4): p. 794-804.
33. Healy, F.G., et al., *Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin a biosynthesis by Streptomyces acidiscabies*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(7): p. 2019-2029.
34. Kers, J.A., et al., *Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 79-82.
35. Joshi, M.V., et al., *The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in Streptomyces scabies*. Molecular Microbiology, 2007. **66**(3): p. 633-642.
36. Seipke, R.F. and R. Loria, *Streptomyces scabies 87-22 Possesses a Functional Tomatinase*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(23): p. 7684-7692.
37. Joshi, M., et al., *Streptomyces turgidiscabies secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007. **20**(6): p. 599-608.
38. Beausejour, J., et al., *Production of thaxtomin A by Streptomyces scabies strains in plant extract containing media*. Canadian Journal of Microbiology, 1999. **45**(9): p. 764-768.
39. Loria, R., et al., *Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus Streptomyces*. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2008. **94**(1): p. 3-10.
40. Errakhi, R., et al., *An early Ca(2+) influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in Arabidopsis thaliana cells*. Journal of Experimental Botany, 2008. **59**(15): p. 4259-4270.
41. Brochu, V., et al., *Habituation to thaxtomin A in hybrid poplar cell suspensions provides enhanced and durable resistance to inhibitors of cellulose synthesis*. Bmc Plant Biology, 2010. **10**.
42. King, R.R., et al., *More chemistry of the thaxtomin phytotoxins*. Phytochemistry, 2003. **64**(6): p. 1091-1096.
43. King, R.R., et al., *ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PHYTOTOXINS ASSOCIATED WITH STREPTOMYCES SCABIES*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1989(13): p. 849-850.
44. King, R.R. and L.A. Calhoun, *The thaxtomin phytotoxins: Sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity*. Phytochemistry, 2009. **70**(7): p. 833-841.
45. Wach, M.J., et al., *Effect of carbohydrates on the production of thaxtomin A by Streptomyces acidiscabies*. Archives of Microbiology, 2007. **188**(1): p. 81-88.
46. Loria, R., et al., *DIFFERENTIAL PRODUCTION OF THAXTOMINS BY PATHOGENIC STREPTOMYCES SPECIES IN-VITRO*. Phytopathology, 1995. **85**(5): p. 537-541.
47. Hiltunen, L.H., et al., *Influence of thaxtomins in different combinations and concentrations on growth of micropropagated potato shoot cultures*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(9): p. 3372-3379.

48. Johnson, E.G., et al., *Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing Streptomyces species*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2007. **71**(1-3): p. 18-25.
49. Sanchezferrer, A., et al., *TYROSINASE - A COMPREHENSIVE REVIEW OF ITS MECHANISM*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1995. **1247**(1): p. 1-11.
50. Beausejour, J. and C. Beaulieu, *Characterization of Streptomyces scabies mutants deficient in melanin biosynthesis*. Canadian Journal of Microbiology, 2004. **50**(9): p. 705-709.
51. Manulis, S., et al., *BIOSYNTHESIS OF INDOLE-3-ACETIC-ACID VIA THE INDOLE-3-ACETAMIDE PATHWAY IN STREPTOMYCES SPP*. Microbiology-Uk, 1994. **140**: p. 1045-1050.
52. Tegg, R.S., et al., *Auxin-induced resistance to common scab disease of potato linked to inhibition of thaxtomin A toxicity*. Plant Disease, 2008. **92**(9): p. 1321-1328.
53. Bruce, K.D., et al., *AMPLIFICATION OF DNA FROM NATIVE POPULATIONS OF SOIL BACTERIA BY USING THE POLYMERASE CHAIN-REACTION*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(10): p. 3413-3416.
54. Cermak, L., et al., *Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment*. Applied Soil Ecology, 2008. **40**(2): p. 348-358.
55. Wanner, L.A., *Field isolates of Streptomyces differ in pathogenicity and virulence on radish*. Plant Disease, 2004. **88**(8): p. 785-796.
56. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(5): p. 1792-1797.
57. Felsenstein, J., *PHYLIP—phylogeny inference package (version 3.2)*. Cladistics, 1989: p. 164-166.
58. Kimura, M., *A SIMPLE METHOD FOR ESTIMATING EVOLUTIONARY RATES OF BASE SUBSTITUTIONS THROUGH COMPARATIVE STUDIES OF NUCLEOTIDE-SEQUENCES*. Journal of Molecular Evolution, 1980. **16**(2): p. 111-120.
59. Wang, Q., et al., *Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(16): p. 5261-5267.
60. Huguet-Tapia, J.C., et al., *Streptomyces turgidiscabies Car8 contains a modular pathogenicity island that shares virulence genes with other actinobacterial plant pathogens*. Plasmid, 2011. **65**(2): p. 118-124.