

EGYETEMI DOKTORI (PH. D.) ÉRTEKEZÉS

A C faktor termelő *Streptomyces griseus* 45H törzs spóraképzésének, patogenitásának és taxonómiai besorolásának vizsgálata

Készítette: Kiss Zsuzsanna

Témavezető: Dr. Biró Sándor

Doktori Iskola vezető: Prof. Dr. Fésűs László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN

2010

TARTALOM

1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1. Streptomycesek életciklusa.....	8
2.1.1. Streptomycesek életciklusa szilárd táptalajon	8
2.1.2. Streptomycesek életciklusa folyékony táptalajon.....	9
2.2. A morfológiai differenciálódás szabályozása	11
2.2.1. Differenciálódási mutánsok	11
2.2.2. Extracelluláris autoregulátorok	11
2.3. Az A-faktor által szabályozott regulációs kaszkád	13
2.4. A C faktorról kapcsolatos korábbi kutatások	16
2.4.1. A C faktort termelő törzs izolálása és a fehérje azonosítása	16
2.4.2. A C faktor jellemzői és feltételezett hatásmechanizmusa.....	18
2.5. A növénypatogén S. scabiesben azonosított patogenitási faktorok	21
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	23
3.1. A kísérletek során használt baktérium törzsek és burgonya fajták.....	23
3.1.1. Streptomyces törzsek	23
3.1.2. Escherichia coli törzsek	23
3.1.3. Burgonya (Solanum tuberosum L., Solanaceae) fajták	24
3.2. A kísérletek során használt táptalajok.....	25
3.2.1. Streptomyces törzsek tenyésztéséhez használt folyékony táptalajok	25
3.2.2. Streptomyces törzsek tenyésztéséhez használt szilárd táptalaj.....	26
3.2.3. Streptomyces törzsek protopasztálásához használt táptalaj.....	27
3.2.4. Escherichia coli törzsek tenyésztéséhez használt táptalajok	27
3.2.5. Burgonya in vitro mikrogumók tenyésztéséhez használt táptalaj.....	28
3.3. Molekuláris biológiai módszerek.....	29
3.3.1. Escherichia coli törzsek transzformálása plazmid DNS-sel	29
3.3.2. Plazmid DNS izolálása Escherichia coliból.....	29
3.3.3. Streptomyces törzsek transzformálása plazmid DNS-sel.....	31
3.3.4. Kromoszómális DNS izolálása Streptomyces törzsekből	32
3.3.5. C faktor gén megszakításához felhasznált plazmidok	33
3.3.6. Southern hibridizáció	33
3.3.7. 16S rRNS génszekvencia analízis.....	36

3.3.8. Észteráz enzimaktivitás mérése.....	37
3.3.9. Burgonya mikrogumó patogenitási teszt.....	37
3.3.10. További molekuláris biológiai módszerek	38
4. EREDMÉNYEK	39
4.1. A C faktort termelő törzs taxonómiai átsorolása.....	39
4.2. A C faktort nem termelő mutáns létrehozása és fenotípusos vizsgálata.....	43
4.3. C faktor fehérjével homológ fehérjék keresése adatbázisokban	53
4.4. A <i>nec1</i> nekrosis faktor gén jelenlétének vizsgálata a C faktort termelő törzsben.....	53
4.5. Az extracelluláris észteráz enzimaktivitás vizsgálata a C faktort termelő törzsben.....	57
4.6. A C faktort termelő törzs vizsgálata növényi kórokozóként	59
5. MEGBESZÉLÉS	62
6. ÖSSZEFOGLALÁS / SUMMARY	69
7. IRODALOMJEGYZÉK	73
7.1. Hivatkozások	73
7.2. A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények	82
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	83
9. FÜGGELÉK.....	84

1. BEVEZETÉS

Az elsősorban talajban élő, Gram-pozitív *Streptomyces*ek bonyolult morfológiai differenciálódásuk és a nagyszámú, gyógyászatban és iparban is alkalmazott szekunder metabolit termelése miatt kerültek a kutatók érdeklődésének középpontjába. A komplex életciklus szabályozása regulációs kaszkádokon keresztül valósul meg, ami egyfajta „túlbiztosítást” jelent, hiszen a légmicélium- és spóráképzés túlélésükhöz elengedhetetlen. A sejtek közötti kommunikációban és az életciklus génszintű szabályozásában kulcsszerepet játszanak különböző extracelluláris autoregulátorok, mint például a *Streptomyces griseus* 45H törzs által termelt C faktor.

A *S. griseus* 45H törzset az ipari streptomycin termelő *S. griseus* 52-1 törzshöz kapcsolódó mutagenézis program keretében izolálták, azonban ez az eredet megkérdőjelezhető, mivel a törzsek számos lényeges tulajdonságukban különböznek és a C faktor gén sem található meg a *S. griseus* 52-1 törzsben. A *S. griseus* 45H törzs izolálásakor egy flavofungint termelő *S. flavofungini* törzsszel is dolgoztak ugyanabban a laboratóriumban, így már korábban is felvetődött, hogy a *S. griseus* 45H törzs valójában a *S. flavofungini* törzsből származó véletlen laboratóriumi kontamináció.

A *S. griseus* 45H törzsnek szilárd és folyékony táptalajon is spóráképzéssel végződő teljes életciklusa van és a C faktor képes helyreállítani a légmicélium- és spóráképzést olyan differenciálódásukban elakadt törzsekben, melyekben nem található meg a fehérje génje. Nem tisztázott azonban, hogy a C faktor az életciklus mely lépéseit szabályozza a *S. griseus* 45H törzsben.

A C faktor gén homológja megtalálható a *Streptomyces*ek között ritkának számító növényi kórokozóban, a *Streptomyces scabies*ben, mely a burgonya és más gumós növények közönséges varasodásának kialakulásáért felelős. A patogenitás összefüggésben van az ún. patogenitási sziget (PAI) jelenlétével, melyen a patogenitásért felelős gének (pl. thaxtomin bioszintézis génjei, Nec1 nekrozis faktor génje) egymás mellett helyezkednek el. További fontos patogenitási faktor a növényi sejttel degradációjában szerepet játszó hőstabil extracelluláris észteráz, melynek cink az aktivátora és génje előtt egy fehérje-kötőhely található, mely nagymértékben azonos az AdpA konszenzus kötő-hellyel. A C faktor szerepet játszik többek között az A-faktor regulonba tartozó extracelluláris enzimek szabályozásában, melyek többsége cink kofaktorral működik, s génjük előtt AdpA kötőhely van, melyhez az A-faktor regulon szabályozásában kulcsszerepet játszó AdpA fehérje kötődik.

A fentiek alapján munkám során az alábbi célokat tűztem ki:

1. A *S. griseus* 45H törzs eredetének és taxonómiai besorolásának tisztázása a *S. griseus* 45H, *S. griseus* 52-1 és *S. flavofungini* törzsek 16S riboszómális RNS génszekvenciájának összehasonlításával és Southern hibridizáció segítségével.
2. A *S. griseus* 45H törzs egy C faktort nem termelő mutánsának létrehozása, melynek fenotípusából következtetni tudunk a fehérje differenciálódásban betöltött szerepére.
3. Adatbázisokban a C faktorra homológ gének illetve fehérjék keresése, melyek funkciójából esetleg következtethetünk a C faktor hatásmechanizmusára és arra, hogy mely regulációs kaszkádokban játszhat szerepet.
4. A patogén *S. scabies* törzsekre jellemző PAI jelenlétének vizsgálata a *S. griseus* 45H törzsben és további ismert kórokozó és nem kórokozó törzsekben a *nec1* nekrosis faktor gén detektálásával.
5. Ugyancsak a patogén *S. scabies* törzsekre jellemző hőstabil extracelluláris észteráz enzimaktivitás vizsgálata a *S. griseus* 45H törzsben, összehasonlítva ismert kórokozó és nem kórokozó törzsek észteráz aktivitásával és a C faktor esetleges szabályozó szerepének vizsgálata.
6. A virulencia faktorok vizsgálatát követően a *S. griseus* 45H törzs fertőzőképességének tesztelése burgonya *in vitro* gumókon (mikrogumókon), összehasonlítva ismert kórokozó és nem kórokozó törzsek fertőzőképességével.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A *Streptomyces*ek Gram-pozitív, micéliális növekedésű, természetes élőhelyüket tekintve a talajban előforduló baktériumok. A *Streptomyces*ek alkotják az *Actinomycetes* osztály *Actinomycetales* rendjének egyik legjelentősebb és legtöbbet tanulmányozott genuszát, mivel elméleti és gyakorlati szempontból is fontos mikroorganizmusok. Elméleti jelentőségüket az adja, hogy bár egyszerű, prokarióta szervezetek, de komplex növekedési és differenciálódási folyamataik, illetve extracelluláris szabályozó mechanizmusaik révén kiváló modelljei a sejtdifferenciálódás tanulmányozásának. Gyakorlati jelentőségük abban rejlik, hogy differenciálódásukkal párhuzamosan nagyszámú ún. szekunder metabolitot termelnek, melyek funkciójukat tekintve lehetnek többek között antibiotikumok, pigmentek, ipari enzimek, citosztatikumok, növények növekedését befolyásoló anyagok (Omura, 1992; Bérdy, 2005; Hopwood, 2007). A legismertebb és legrészletesebben tanulmányozott *Streptomyces* fajok az ipari streptomycin termelésre használt *S. griseus*, illetve a differenciálódási modellként ismert *S. coelicolor*. Mindkét faj genomjának szekvenálása megtörtént, azonban ez *Streptomyces*ek esetében bizonyos törzsek genomjának szekvenálását jelenti: a *S. coelicolor* A3(2) törzs genomjának szekvenálása 2002-ben (Bentley és mtsai, 2002), míg a *S. griseus* IFO 13350 törzs genomjának szekvenálása 2008-ban (Ohnishi és mtsai, 2008) fejeződött be. Az utóbbi években több más, gyakorlati szempontból fontos *Streptomyces* törzs genomi szekvenálása is megtörtént, melyek egy része már annotálva is hozzáférhető. Ilyen az avermectint termelő *S. avermitilis* MA-4680 (Ikeda és mtsai, 2003), a *Streptomyces*ek között ritkának számító növény-patogén *S. scabies* 87.22 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/), és néhány, annak reményében szekvenált faj egyes törzsei (*S. albus*, *S. clavuligerus*, *S. ghanaensis*, *S. griseoflavus*, *S. hygrosopicus*, *S. lividans*, *S. noursei*, *S. roseosporus*, *S. viridochromogenes*, *S. roseum*, valamint taxonómiaiilag nem karakterizált *Streptomyces* törzsek [Mg1, SBP78, AA4, ACF1, C]), hogy sikerül antibiotikum termelésben résztvevő, eddig nem azonosított, törzs-specifikus, és/vagy nyugvó géneket azonosítani (<http://genomesonline.org>). A szekvenált genomú *Streptomyces*ek között lehet megemlíteni a korábban *S. erythreus*ként ismert – erythromicin termelő – *Saccharopolyspora erythraea* törzset is (Oliynyk és mtsai, 2007).

A *Streptomyces* kromoszóma több érdekes jellemvonással rendelkezik. Mérete 8-10 Mb, mely szokatlanul nagy a többi baktériuméhoz képest, kétszer akkora például, mint a jól ismert *Escherichia coli* és *Bacillus subtilis* genom mérete. A tipikus bakteriális kromoszóma gyűrűvé záródott, itt azonban lineáris elrendeződést mutat és jellegzetes ismertetőjegye az 55%-nál magasabb G+C tartalom (Champness, 2000). A *Streptomyces*ek komplex életciklusukkal párhuzamosan nagyszámú szekunder metabolitot termelnek. A szekunder metabolit termeléshez kapcsolódó gének általában a kromoszóma terminális régiójában helyezkednek el ún. génklaszterekben rendeződve (Redenbach és mtsai, 1996; Bentley és mtsai, 2002). Az esetek többségében ezek a gének illetve génklaszterek törzsspecifikusak, vagyis csak bizonyos *Streptomyces* törzsekben (esetleg fajokban) fordulnak elő. A terminális régió strukturális változások tekintetében igen instabil, ami kapcsolatban lehet a *Streptomyces*ek evolúciójával (Chen és mtsai, 2002; Chater és Chandra, 2006).

A *Streptomyces*ek által termelt szekunder metabolitok funkciójukat tekintve nagyon sokfélék lehetnek. A szekunder metabolitok között található a több mint 12000 ismert antibiotikum közel 70%-a és a gyógyászatban használt bioaktív anyagok kb. 55%-át is *Streptomyces*ek termelik. Az, hogy mi az antibiotikumok szerepe az őket termelő szervezetek életfolyamatainak szabályozásában, még nem teljesen ismert. Egyes feltételezések szerint természetes élőhelyükön, ahol kapcsolatba kerülhetnek más mikroorganizmusokkal, szerepük lehet a szubsztrátmicélium lízisekor felszabaduló tápanyagok védelmében pl. fonalas gombákkal szemben (Chater és Merrick, 1979). Néhány antibiotikumnak szerepe lehet a termelő törzs fejlődési folyamatainak szabályozásában is. A *S. alboniger* légmicélium- és spóráképzéséhez szükséges a törzs által termelt makrolid típusú panamycin-607 molekula (McCann és Pogell, 1979), mely valószínűleg a kalciumion hifán belüli szállításában játszik szerepet. Szilárd táptalajon növekedve a spórák sejtfala az érés során megvastagszik és pigmentálódik. A pigmentek szintén szekunder metabolitok és valószínűleg kovalensen kötődnek a spórák falához, ezáltal a spórák ellenállóbbak lesznek a különböző degradáló enzimekkel szemben (Bloomfield és Alexander, 1967; Chater és Chandra, 2006). Ritka esetben bizonyos szekunder metabolitok, mint például a 2.5. fejezetben tárgyalt thaxtomin, fertőzések illetve betegségek kialakításában játszanak szerepet.

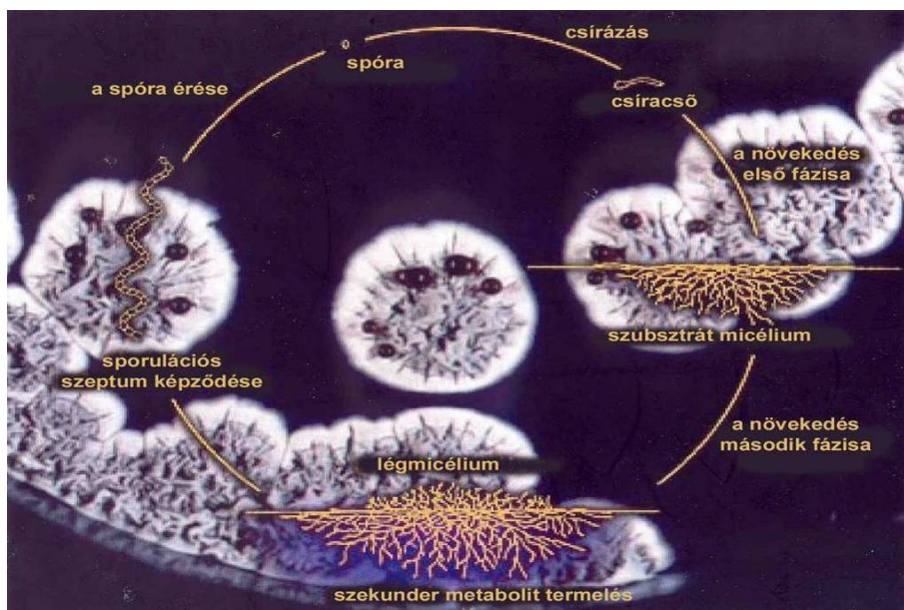
2.1. *Streptomyces*ek életciklusa

2.1.1. *Streptomyces*ek életciklusa szilárd táptalajon

Az életciklus szilárd táptalajon a spóra csírázásával kezdődik és a kialakuló csíracső falának csúcsi része intenzív növekedésnek indul. Ezzel párhuzamosan a kromoszóma sorozatos osztódásokon megy keresztül, azonban elválasztó harántfalak csak ritkán képződnek, így a hifa nem tagolódik egyetlen genomot tartalmazó sejtekre (Chater, 1984). A DNS néhány replikációs ciklusa után a vegetatív hifa oldalirányban több helyen elágazik. A vegetatív hifák együttes tömege a vegetatív micélium a táptalaj irányába kezd intenzíven növekedni, majd azt – kb. 90-120 óra alatt - sűrűn behálózza, létrehozva a szubsztrát micéliumot (Prosser és mtsai, 1988; Chater, 1993).

A tápanyag csökkenésének vagy más fiziológiai stressznek, illetve a sejtsűrűség emelkedésének hatására a szubsztrát micéliumra merőlegesen ún. légmicélium képződik, mely a szubsztrát micélium idősebb részeinek lizálásával felszabaduló szerves anyagokat hasznosítja (Wildermuth, 1970; Miguélez és mtsai, 1999). A kiemelkedő légmicélium csúcsi részén intenzív sejtfalszintézis folyik, az ehhez szükséges tápanyagok az alapi rész felől diffúzió útján jutnak el a csúcsi részbe. A légmicélium növekedésével párhuzamosan - mely teljes hosszát kb. 9-14 óra alatt éri el - a kromoszóma folyamatos osztódásokon megy keresztül (Chater, 2000). Az antibiotikum és más szekunder metabolitok termelése erre az életszakaszra esik.

A hossznövekedés befejeződésével a légmicéliumban harántfalak képződnek, melyek egyetlen genomot tartalmazó sejtekre tagolják a hifát. Ezt nevezzük prespóra állapotnak. A sporulációs harántfalak abban különböznek a vegetatív válaszfalaktól, hogy az előbbieket esetében a két membránréteget egy duplarétegű sejtfal választja el, mely az érett spórák leválását teszi lehetővé (Kwak és Kendrick, 1996). A spórák sejtfala az érés során megvastagszik és pigmentálódik, alakjuk kerekesebb lesz. Érett spórákat kb. 6-7 napos telepek képeznek (1. ábra).



1. ábra *Streptomyces* életciklusa szilárd táptalajon (Thompson CJ nyomán)

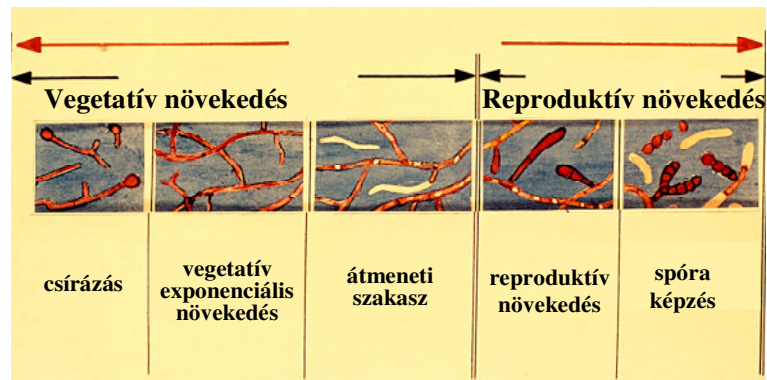
2.1.2. *Streptomyces* életciklusa folyékony táptalajon

Bizonyos *Streptomyces*eknek - így az általunk tanulmányozott *S. griseus* 45H törzsnek (Szabó és mtsai 1960; Szabó és mtsai, 1961) - folyékony táptalajon is spóráképzéssel végződő teljes életciklusa van (2. ábra), mely a vegetatív fázis első szakaszát képező csírázással veszi kezdetét: a vastag falú spórák nedvesedés után, kielégítő tápanyag és oxigén ellátottság mellett csírázni kezdenek. A csírázást követően 7-16 óras kor között a vegetatív ciklust az intenzív növekedés jellemzi; a micélium egészének növekedése az elágazások révén válik közel exponenciálissá. Ebben a szakaszban a DNS mennyisége kb. ötször duplázódik meg. A vegetatív és reprodukív fázis közötti átmeneti stádiumban leáll a DNS-replikáció, ugyanakkor a fonalak lizálására utaló jel nem látható.

A reprodukív fázisban, 30-36 óras kor körül a fonalak két irányban differenciálódnak tovább, aminek eredményeként öregedő vegetatív fonalak és fiatal reprodukív ágak különböztethetők meg. A DNS a reprodukív ágakban osztódásnak indul és a vegetatív fonalak maganyagai is egyszer megduplázódnak. A reprodukív (vagy sporogén) hifák, melyek 36-72 óras kor között növekednek, nem az öreg vegetatív fonalak átalakulásával jönnek létre. Az antibiotikum és más szekunder metabolitok termelése erre az életszakaszra esik.

A spóráképzés és autolízis szakaszában, melyben már nincs DNS- és fehérjeszintézis, a légmicéliumra jellemző sporulációs harántfalak képződésével a sporogén hifák egyetlen genomot tartalmazó sejtekre tagolódnak, amit a spórafal

kiépülése és a spórák lekerekedése követ. Az érett spórák egyesével vagy esetenként spóraláncokat képezve fűződnek le. Az előregedett vegetatív hifa a szakasz végén autolizál (Kendrick és Ensign, 1983).



2. ábra *Streptomyces* életciklusa folyékony tenyészetben (Vitális Sándor, kandidátusi értekezés, 1979)

A szilárd, illetve folyékony táptalajon végbemenő életciklust összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy míg folyékony tápközegekben a morfológiai differenciálódás 3-4 nap alatt és viszonylag szinkronizáltan játszódik le, addig szilárd táptalajon ez a folyamat 6-7 napot vesz igénybe és aszinkronizált, vagyis ugyanazon tenyészetben különböző differenciáltsági állapotban levő hifák egyszerre vannak jelen, ami megnehezíti a differenciálódás szabályozásában szerepet játszó gének életciklushoz kötött expressziós változásainak és tényleges funkcióinak megállapítását.

2.2. A morfológiai differenciálódás szabályozása

2.2.1. Differenciálódási mutánsok

A morfológiai differenciálódás bekapcsolásában és a differenciálódással összefüggő folyamatok szabályozásában szerepet játszó gének azonosításában és annak elemzésében, hogy a gének az életciklus mely fázisában expresszálódnak, a különböző differenciálódási rendellenességeket mutató mutánsok szolgálhatnak kiindulási pontként. *Streptomyces*ek esetében a differenciálódási mutánsoknak két fő csoportját különböztetjük meg. Azokat a mutánsokat, melyek szilárd táptalajon nem képeznek légmicéliumot és a telepek felszíne ennek következtében bőrszerű, fényes felületű, *bald* (kopasz) mutánsoknak nevezzük. A másik nagy csoportot a *white* (fehér) mutánsok jelentik, melyek nem képesek a különböző pigmenteket tartalmazó sejtfallal rendelkező spórákat létrehozni, ezért a telepek felszíne a légmicélium miatt fehér (Chater, 1984).

2.2.2. Extracelluláris autoregulátorok

A bakteriális differenciálódás bonyolult folyamat, melynek szabályozásában a környezeti szignálok érzékelése és az azokra adott válaszok mellett a sejtek közötti kommunikációnak is igen fontos szerepe van. A differenciálódás és a szekunder metabolit termelés szabályozásában valamint a sejtek közötti kommunikációban a változatos szerkezetű ún. pleiotróp hatású autoregulátorok játszanak fontos szerepet. Ilyen extracelluláris szabályozó molekula a γ -butirolakton szerkezetű A-faktor (Khokhlov és mtsai, 1967) valamint az Intézetünkben azonosított C faktor (Szabó és mtsai, 1962), mely az egyetlen ismert fehérjetermészetű autoregulátor. A *S. griseus*ban található A-faktorhoz hasonló szerkezetű és funkciójú autoregulátorokat más *Streptomyces* fajokban is leírtak, amelyek a differenciálódást, antibiotikum termelést, vagy mindkettőt szabályozzák. Érdekes, hogy a különböző törzsekben nemcsak a szabályozó molekulák szerkezete hasonló, de az A-faktor receptor fehérjék is nagyfokú homológiát mutatnak, ugyanakkor biológiai szerepük eltérő lehet. *S. coelicolor*ban az SCB1 (*S. coelicolor* butirolakton 1) az actinorhodin és undecylprodigiosine bioszintézisében tölt be szabályzó szerepet (Takano és mtsai, 2001); *S. virginiae*ben a virginiamicin bioszintézist szabályozza (Nakano és mtsai, 1998); *S. tendae*ben a nikkomicin bioszintézist szabályozza egy γ -butirolakton (Engel és mtsai, 2001); *S. pristinaespiralis*ban egy γ -butirolakton a pristinamicin bioszintézis

szabályozásában vesz részt (Folcher és mtsai, 2001); *S. fradiae*ban a sporulációt és tylosin termelést is egy γ -butirolakton szabályozza (Cundliffe és mtsai, 2001; Stratigopoulos és mtsai, 2002); *S. lavendulae*ban az IM-2 több szekunder metabolit szintézisét szabályozza (Kitani és mtsai, 2008).

A *Streptomyces*ekhez nagyon hasonló élőhely igényű és életciklusú fonalas gombákban is előfordulnak γ -butirolakton gyűrűt tartalmazó molekulák. Ezek közül az *Aspergillus terreus*ban előforduló butyrolacton I funkcióját tanulmányozták részletesebben. Kimutatták, hogy az eukarióta ciklin függő cdk1 és cdk2 kináz specifikus inhibitora (Kanemitsu és mtsai, 1998; Nishio és mtsai, 1996), s hasonlóan a *Streptomyces*ekben előforduló γ -butirolaktonhoz, morfológiai differenciálódást, spóráképzést indukál és fokozza a szekunder metabolitok, többek között a koleszterinszint-csökkentőként alkalmazott lovastatin termelését (Schimmel és mtsai, 1998).

A dolgozatban részletesen az A-faktor illetve a dolgozat tárgyát képező C faktor hatásmechanizmusának ismertetésére térek ki.

2.3. Az A-faktor által szabályozott regulációs kaszkád

A pleiotróp hatású A-faktort 1967-ben fedezték fel egy olyan *S. griseus* törzsben, mely nagyon kevés streptomycint termelt (Khokhlov és mtsai, 1967). Később számos más *S. griseus* törzsben és más *Streptomyces* fajokban is megtalálták (Anisova és mtsai, 1984). Az A-faktor kémiai szerkezetét - egy γ -butirolakton gyűrűt tartalmazó 2-izokaprilolil-(3R)-hidroximetil- γ -butirolakton molekula - 1976-ben azonosították (Kleiner és mtsai, 1976). Az A-faktor hatásának vizsgálatára irányuló kísérletekből kiderült, hogy a streptomycin termelés fokozása mellett (Khokhlov és mtsai, 1967) hatással van a morfológiai differenciálódásra (Khokhlov és mtsai, 1973) és enzimatisz folyamatokra (Voronina és mtsai, 1982; Vasilenko és mtsai, 1983) is. A-faktor termelésére nem képes *S. griseus* mutánsok sem szekunder metabolitok szintézisére, sem pedig légmicélium és spóráképzésre nem képesek. Ha azonban tenyészetükhöz exogén A-faktort adnak 1 nM koncentrációban, morfológiai differenciálódásuk és szekunder metabolit képzésük egyaránt helyreáll, ami az A-faktornak a differenciálódás és antibiotikum szintézisben betöltött közös regulációjára is utal (Horinouchi és Beppu, 1994; Horinouchi, 2002). Ezért nevezzük az A-faktort és a hasonló hatással bíró molekulákat pleiotróp hatású regulátornak.

Az A-faktor termelése életciklusfüggő és hatását már nagyon alacsony, 1-20 nM koncentrációban kifejti. A szubsztrát micéliumban termelődő kisméretű, lipidoldékony molekula a hifafonalak minden részébe eljut diffúzióval és szignálmolekulaként részt vesz a légmicélium- és szekunder metabolit képzés folyamatának összehangolásában. Ezért az A-faktor egyfajta „mikrobiális hormonnak” is tekinthető (Horinouchi és Beppu, 1992; Horinouchi és Beppu, 1994). Amikor sejten belüli koncentrációja eléri a kritikus 1-20 nM-os koncentrációt, bekapcsolja a regulációs kaszkádok működését. Ez a nagyon alacsony koncentráció speciális receptor-fehérje jelenlétét feltételezi. Az A-faktor a citoplazmában elhelyezkedő ArpA receptor-fehérje C-terminális doménjéhez kötődik, N-terminális részén α -helix-turn- α -helix DNS-kötő motívum található. Az ArpA fehérje a vegetatív életciklus korai szakaszától termelődik és A-faktor hiányában homodimer (Onaka és mtsai, 1995) DNS-kötő doménjével a reguláló kaszkád *adpA* génjéhez kötődik represszor típusú regulátorként hatva. Az *adpA* az egyetlen ismert gén, melynek működését az ArpA fehérje szabályozza (Kato és mtsai, 2004). Amint az A-faktor koncentrációja 32-160 nM közötti értékű, az ArpA fehérje már nem képes a

génexpresszió gátlására, mivel a homodimerhez kötődő A-faktor megváltoztatja a fehérje konformációját, minek következtében az ledisszociál az *adpA* gén operátoráról (Horinouchi, 1996; Horinouchi, 1999; Ohnishi és mtsai, 1999) és megindul az *adpA* gén átírása.

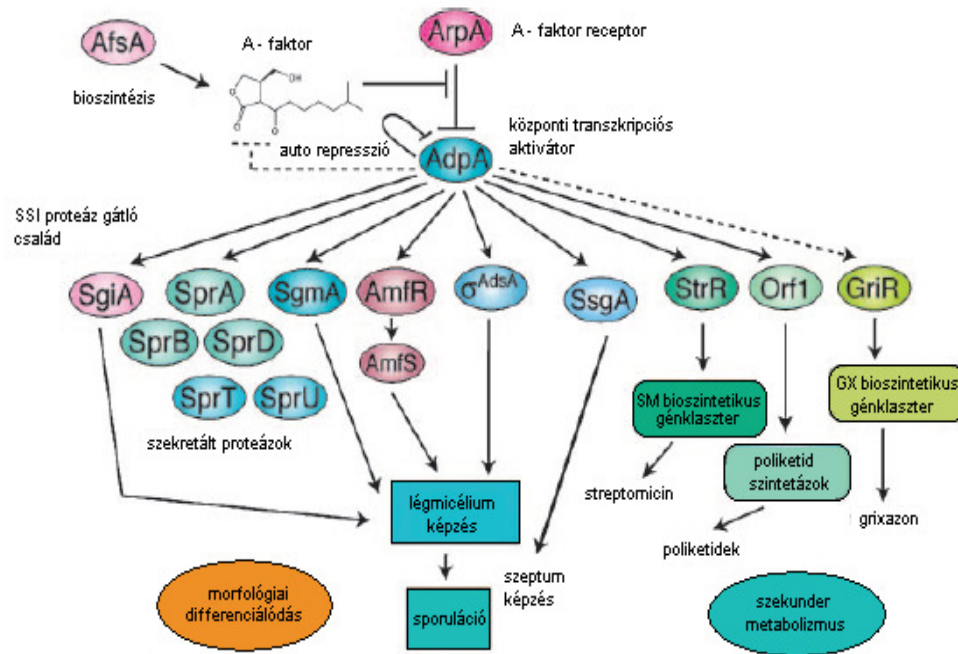
Az *adpA* gén egy központi transzkripció aktivátort (AdpA) kódol, amely számos, a morfológiai differenciálódásban és szekunder metabolizmusban résztvevő gén transzkripcióját aktiválja. Az ismert gének, amelyeket az AdpA aktivál, azaz tagjai az AdpA regulációs kaszkádnak, a következők:

- *strR*, a streptomycin bioszintézis specifikus transzkripció aktivátorának génje (Vujaklija és mtsai, 1993), amely további, a streptomycin bioszintézisben résztvevő géneket aktivál (Ohnishi és mtsai, 1999)
- *adsA* (A-factor dependent sigma factor), extracitoplazmatikus funkciójú szigma faktor (σ^{AdsA}) génje, amely a légmicélium képzésben játszik szerepet (Yamazaki és mtsai, 2000)
- *ssgA*, kis molekulatömegű, savas karakterű fehérje génje, amely a spóra szeptumképzésében játszik szerepet (Yamazaki és mtsai, 2003a), s amelyet eredetileg sporulációs szupresszorként izoláltak *S. griseus*-ból (Kawamoto és mtsai, 1997)
- *amfR*, egy reszponz-regulátor típusú fehérje génje, s a légmicélium képzésben van szerepe (Yamazaki, 2003b)
- *sgmA*, *S. griseus* metallo-endopeptidáz génje, melynek szerepe a légmicélium képzés során a szubsztrátmicélium apoptózisában van (Kato és mtsai, 2002)
- *sprT* és *sprU*, két tripszin típusú proteáz génjei (Kato és mtsai, 2005); az enzimeknek feltehetően a szubsztrátmicélium fehérjéinek emésztésében, s ezáltal a fejlődő légmicélium tápanyaggal való ellátásában lehet szerepük
- *sprA*, *sprB* és *sprD*, három kimotripszin típusú proteáz génjei (Tomono és mtsai, 2005); az enzimeknek, feltehetően ugyancsak a szubsztrátmicélium fehérjéinek emésztésében, s ezáltal a fejlődő légmicélium tápanyaggal való ellátásában lehet szerepük
- *sgiA*, egy *Streptomyces* szubtilizin inhibitor gén, melynek a légmicélium képzésben van szerepe (Hirano és mtsai, 2006).

2009-ben a *S. griseus* IFO13350 törzs és $\Delta adpA$ mutánsának extracelluláris proteomját tanulmányozva további AdpA regulált fehérjéket – lebontó anyagcsere utak enzimeit, részben pedig proteázok, glikozil hidrolázok és észterázok – azonosítottak

(Akanuma és mtsai, 2009). Mindez azt mutatja, hogy az A-faktor hatása az eddig ismertnél lényegesen szélesebb körű és bonyolultabb mechanizmusú.

Az A-faktor regulonba tartozó géneket és az A-faktor által szabályozott folyamatokat a 3. ábra mutatja be.



3. ábra Az A-faktor regulonba tartozó gének és az A-faktor által szabályozott folyamatok *Streptomyces griseus*ban (Horinouchi, 2007)

2.4. A C faktorral kapcsolatos korábbi kutatások

2.4.1. A C faktort termelő törzs izolálása és a fehérje azonosítása

A bakteriális differenciálódással kapcsolatos kutatások Tanszékünkön (korábban Biológiai Intézet, majd Humángenetikai Intézet) az 1960-as években kezdődtek. A vizsgálatok célja az volt, hogy olyan természetes - endogén eredetű - anyagot vagy anyagokat találjanak és tanulmányozzanak, melyek hatással vannak a differenciálódás illetve a szekunder metabolit termelés folyamataira. Az ipari streptomycin termelő *S. griseus* 52-1 jelű törzs spóráinak mustár-nitrogén kezelésével genetikailag stabil, differenciálódási, illetve streptomycint nem termelő mutánsokat kívántak izolálni. 1387 megvizsgált izolátumból 33 nem termelt streptomycint, de csak 2 bizonyult stabilan nem termelőnek a sorozatos átváltások során. Ezek közül az egyiket *S. griseus* 45H-nak nevezték el. A „szülői” 52-1 jelű és a „mutáns” 45H jelű törzset részletesen összehasonlították (4. ábra) és azt tapasztalták, hogy a két törzs számos lényeges tulajdonságában különbözik (Szabó és mtsai 1960; Szabó és mtsai, 1961).

Vizsgált tulajdonság	<i>S. griseus</i> 52-1	<i>S. griseus</i> 45H
Streptomycin termelés	+	-
Polién antibiotikum termelés	-	+
A-faktor termelés	+	-
C faktor temelés	-	+
Spóráképzés folyékony tenyészetben	-	+
Citrát hasznosítás	+	-
Arabinóz hasznosítás	-	+

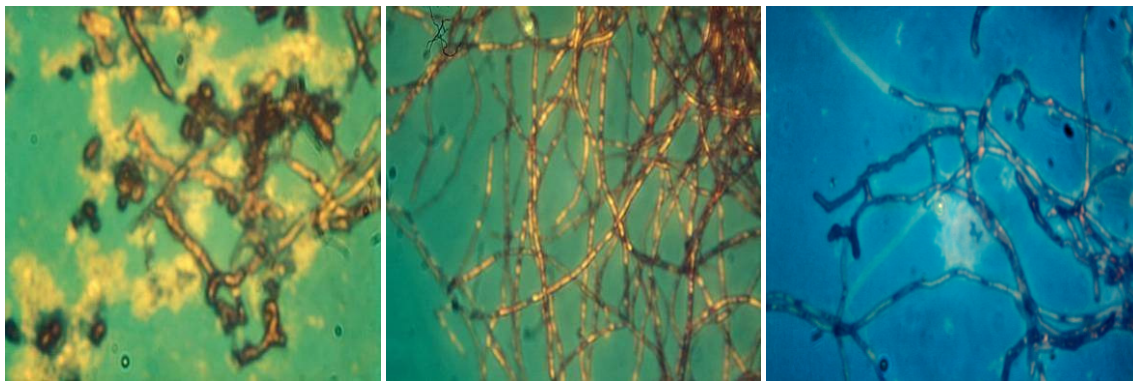
4. ábra A *S. griseus* 52-1 és *S. griseus* 45H törzsek összehasonlítása

A „szülői” törzs differenciálódása folyékony tenyészetben elakad, nem képez spórát, míg a „mutáns” törzsnek mind szilárd, mind folyékony táptalajon spóráképzéssel végződő teljes életciklusa van. Eltérést találtak továbbá a szilárd táptalajon képzett spórák alakjában. A „szülői” törzs spórái cilindrikus, hordó alakúak voltak, míg a „mutáns” spórái oválisak. Érdekes volt, hogy a két törzs különböző szénforrásokat

hasznosított a növekedés során. A „szülői” törzs citráton nőtt, arabinózon nem, míg a „mutáns” törzs arabinózon nőtt és citráton nem. Nehéz volt genetikai magyarázatot találni arra, hogy a mutáns rendelkezik egy olyan tulajdonsággal (arabinóz hasznosítás képessége), mellyel a szülői törzs nem. Emellett különbözött a sejtfal összetételük is (Barabás és Szabó, 1965).

Az eltérések felvetették a két törzs genetikai rokonságának, azaz a „mutáns” eredetének kérdését, amelyet először DNS-DNS filterhibridizációs módszerrel vizsgáltak (Fehér és Szabó, 1978). A kísérlet eredménye tovább erősítette a gyanút, hogy genetikailag nem közeli rokon törzsekről van szó és a cikk szerzői felvetik, hogy a „mutáns” törzs laboratóriumi kontaminációból is származhat. Ez könnyen elképzelhető volt, hiszen a különböző törzsekkel való munkákhoz, bár alapos takarítás és csírátlantás után, de ugyanazt a „steril szobát” használták, a ma használatos lamináris box-ok még ismeretlenek voltak. A C faktor génjének klónozását követően egyértelművé vált, hogy a 45H jelű törzs nem lehet az 52-1 jelű törzs „leszármazottja”, mivel Southern hibridizációval nem sikerült a gént a „szülői”-nek tartott törzsben kimutatni (Birkó és mtsai, 1999). Mustárnitrogén mutagén kezelés során pedig egy törzs géneket veszíthet, de új génekre nem tesz szert. Ugyanez a kísérlet azt is megmutatta, hogy a *S. griseus* 52-1 és *S. griseus* 45H törzsek genomi DNS-ének restrikciós mintázata eltérő, ugyanakkor a *S. griseus* 45H és a *S. flavofungini* törzsek restrikciós mintázata nagymértékben hasonló. Ez utóbbi törzsszel szintén dolgoztak ugyanabban a laboratóriumban, így az is felvetődött, hogy a *S. griseus* 45H jelű törzs taxonómiai besorolását tekintve valójában *S. flavofungini*.

A *S. griseus* 45H törzs fermentlevében sikerült egy olyan anyagot találni, mely befolyásolja a morfológiai differenciálódást és a szekunder metabolit termelést is (Szabó és mtsai, 1962). A *S. griseus* 45H törzs jól spórázik folyékony táptalajon (5a. ábra), 72 órás tenyészetét fáziskontraszt mikroszkópban megvizsgálva az elágazó hifafonalak végén reproduktív típusú C-ágak figyelhetők meg, melyek csúcsi része megvastagszik és spórát képez (Szabó és mtsai, 1961; Vitális és Szabó, 1969). A fermentlében talált anyagot a göbös növekedést okozó hatására utalva nevezték el C faktornak (C mint clump, a göb angol elnevezése). A *S. griseus* 52-1 törzs életciklusa folyékony tenyészetben elakad, sem reproduktív hifákat, sem spórát nem képez (5b. ábra), azonban amikor a *S. griseus* 45H törzs fermentlevét ezen törzs folyékony tenyészetéhez adták, itt is megjelentek ezek a képletek (5c. ábra; Vitális és Szabó, 1969). A C faktor volt az elsőként azonosított pleiotróp hatású autoregulátor.



a)

b)

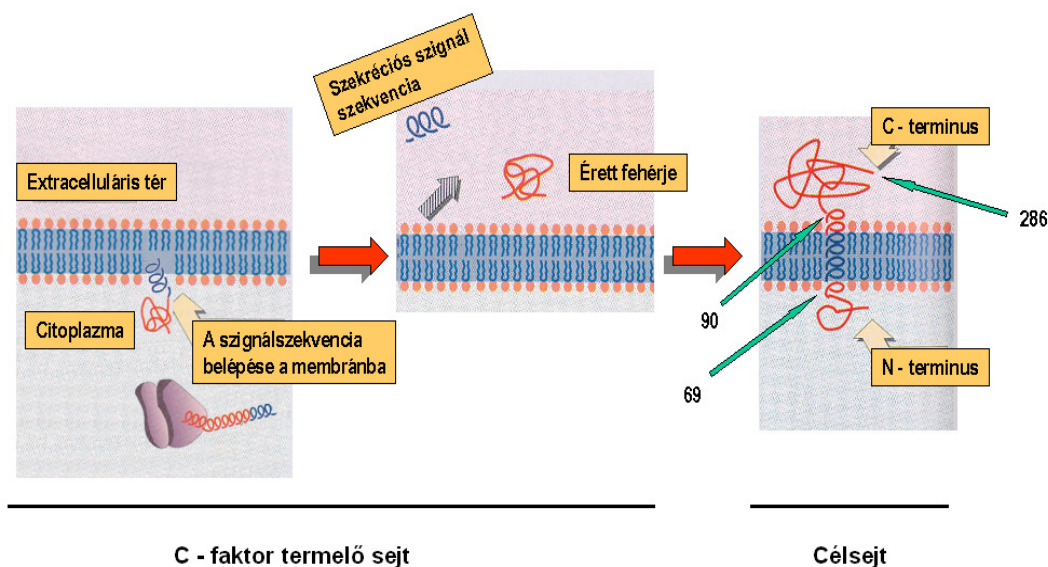
c)

5. ábra A *S. griseus* 45H és *S. griseus* 52-1 törzsek növekedése folyékony táptalajon (fáziskontraszt mikroszkóp; Vitális és Szabó, 1969). **a)** *S. griseus* 45H törzs 72 órás folyékony tenyészet; **b)** *S. griseus* 52-1 törzs 72 órás folyékony tenyészet; **c)** C faktor hatása a *S. griseus* 52-1 törzs 72 órás tenyészetében

2.4.2. A C faktor jellemzői és feltételezett hatásmechanizmusa

A *S. griseus* 45H törzs által termelt C faktor fehérje tisztítása a törzs pufferezett szűrt szójas táptalajon növesztett 66-72 órás folyékony tenyészetének fermentlevéből történt (Bíró és mtsai, 1980). Tisztítását ioncserélő kromatográfiás eljárások és DNS agaróz affinitáskromatográfia kombinációjával sikerült megoldani. Molekulatömege SDS gélelektroforézissel 34500 Daltonnak adódott. ELISA módszerrel több légmicélium képzésre képes *Streptomyces* törzsből kimutatták a C faktor termelését (Szeszák és mtsai, 1990), azonban a *Streptomyces*ekben való széles körű elterjedését a Southern hibridizációs vizsgálatok nem igazolták (Birkó és mtsai, 1999). Ha a tisztított fehérjét a *S. griseus* 52-1 törzs 16 óránál nem idősebb szűrt szójas folyékony tenyészetéhez adták, akkor már $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$ koncentrációban reprodukív elemek képződését indukálta (Birkó és mtsai, 1999). A hifafonalak a *S. griseus* 45H törzshöz hasonlóan elágazóvá váltak, végükön reprodukív ágakkal, melyek megvastagodó csúcsi részéből prespóra fejlődik. Mivel az extracellulárisan adott fehérje rövid idő alatt eltűnik a fermentléből, valószínű, hogy a sejtek felveszik. Mindez specifikus receptor jelenlétét feltételezi akárcsak a korábban említett A-faktor esetében. A C faktor biológiai hatása cink ionnal fokozható, a fehérje cink-affinitás kromatográfiás oszlopon tisztítható, s ezzel a módszerrel sikerült a legjobb specifikus aktivitású preparátumot előállítani (Szeszák és mtsai, 1997).

A tisztított fehérje előállítását követően megtörtént a C faktor fehérje génjének azonosítása, a szekvencia és a szekvenciából levezethető aminosav-sorrend meghatározása, továbbá vizsgálták a génexpressziót különböző *Streptomyces* törzsekben (Birkó és mtsai, 1999; Biró és mtsai, 2000; Birkó és mtsai, 2001). A C faktor gén kódoló régiója egy GTG start kodonnal (1007. nukleotid) indul és egy TGA stop kodonig (1978. nukleotid) terjed; a kódolt fehérje 324 aminosavból áll, melyről egy 38 aminosavból álló szekréciós szignálszekvencia vágódik le. Az érett fehérje 286 aminosavból áll, molekulatömege 31038 Da és valószínűleg rendelkezik egy transzmembrán régióval. A differenciálódás korai stádiumában levő sejtek membránjába úgy épül be, hogy N-terminális vége a sejt belső tere felé, míg C-terminális vége az extracelluláris tér felé mutat (Biró és mtsai, 2000). A C faktor fehérje valószínűleg a Twin-Arginin transzlokációs útvonalon választódik ki a sejtől (6. ábra). A szekréciós szignálszekvenciában lévő két szomszédos arginint tartalmazó motívum az ún. Tat szekréciós úthoz irányítja a fehérjét, mely a fehérjéket a harmadlagos és negyedleges szerkezetük megtartása mellett juttatja át a membránon (Wu és mtsai, 2000). Ilyen formában a fehérjék védettebbek a proteázokkal szemben, aminek nagy jelentősége van a csak kis mennyiségben termelődő C faktor esetén.



6. ábra Modell: A C faktor szekréciója a Twin-Arginin transzlokációs útvonalon, illetve a fermentlébe kiválasztódó fehérje integrációja a differenciálódás korai stádiumában levő sejtek membránjába a feltételezett transzmembrán régióján keresztül (Birkó Zsuzsanna, doktori értekezés, 2002).

A C faktor pontos hatásmechanizmusa még nem ismert, bár hatását több olyan *S. griseus* törzsön is tesztelték, melyek nem tartalmazzák a fehérje génjét. A *S. griseus* 52-1 törzsben a C faktor gént kis (kb. 10 plazmid/genom) és nagy (kb. 100 plazmid/genom) kópiaszámban is kifejeztették (Birkó és mtsai, 1999). A morfológiai differenciálódás szempontjából az extracellulárisan adott C faktorról megegyező hatást csak a gént kis kópiaszámban tartalmazó transzformánsok folyékony tenyészetében kaptak. A gént nagy kópiaszámban tartalmazó transzformánsok citomorfológiai képe a *S. griseus* 52-1 törzs jellemző jegyeit mutatta. A *S. griseus* NRRL B-2682 törzs kopasz, A-faktort nem termelő mutánsa szilárd táptalajon nem képez légmicéliumot, viszont spórázik, de a spórák éretlenek. A C faktor gént kis és nagy kópiaszámban tartalmazó transzformánsok légmicéliumot és érett, gömbölyű spórákat képeztek, tehát a C faktor képes volt komplementálni a *bald* mutációt úgy, hogy génje sem a *bald* mutánsban, sem a vad típusú törzsben nem található meg (Bíró és mtsai, 2000). A kísérletet megismételték a *S. griseus* NRRL-2682 törzs kopasz, A-faktort termelő mutánsán, és a gént kis kópiaszámban tartalmazó transzformánsok esetén szintén érett, gömbölyű spórák képződtek. Ez a törzs azért érdekes, mert *S. griseus*-ban az A-faktornak kulcsszerepe van a légmicéliumképzés indukálásában, ezért a kopasz fenotípust valószínűleg az A-faktor által kontrollált regulációs kaszkád valamelyik génjében történt mutáció okozza.

A C faktor, egy lehetséges magyarázat szerint, valószínűleg olyan mutáns fehérjét helyettesíthet, melyekkel szekvencia szintjén nem homológ, viszont funkcionálisan hasonló szerepet tölt be. Ugyancsak elképzelhető, hogy a C faktor a sporulációt érintő defektusok szupresszoraként működik, például azáltal, hogy eddig ki nem fejeződött sporulációs géneket indukál. Mindkét hipotézis azon alapul, hogy a sporuláció regulációja több, egymással kapcsolódó alternatív úton történhet, melyek összetett szabályozási hálózatot alkotnak (Babcock és Kendrick, 1988; Ueda és mtsai, 1993; Kudo és mtsai, 1995). A C faktorhoz kapcsolódó proteomikai vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a C faktor szerepet játszik több, az A-faktor regulonba tartozó extracelluláris enzim szabályozásában, egyrészt az A-faktor termelés indukálásán, másrészt az A-faktor regulonba tartozó gének közvetlen szabályozásán keresztül. A szabályozott enzimek többsége cink kofaktorról működik, s génjük előtt AdpA kötőhely van, melyhez az A-faktor regulon szabályozásában kulcsszerepet játszó AdpA fehérje kötődik. A C faktor által szabályozott extracelluláris enzimek többsége, a C faktorhoz hasonlóan, a Tat szekréciós útvonalon kerül ki a sejtéből (Birkó és mtsai, 2007).

2.5. A növénypatogén *S. scabies*ben azonosított patogenitási faktorok

A *Streptomyces*ek a talaj baktériumpopulációjának jelentős részét, 1-20%-át alkotják (Janssen, 2006), ahol kapcsolatba kerülhetnek az állat- és növényvilág egyedeivel, megbetegedést azonban csak ritkán okoznak, mert elsősorban szaprofita életmódot folytatnak és a patogenitás csak néhány fajra jellemző. A növénypatogén *S. scabies* felelős a burgonya és más gumós növények varasodásának kialakulásáért, ami által hatalmas mezőgazdasági károkat tud okozni, mert a fertőzés gyakran jár a gumók rothadásával és a fertőzött gumók kevésbé ellenállóak más fertőzésekkel szemben. Bár a *S. scabies* a legelterjedtebb és legjobban tanulmányozott burgonyapatogén, de burgonyavarasodásért felelős kórokozókat más, filogenetikailag diverz *Streptomyces* fajokban is azonosítottak, melyek közül néhány a *S. albidoflavus* csoportba tartozik (Doering-Saad és mtsai, 1992; Bramwell és mtsai, 1998).

A patogenitás egy rendkívül komplex tulajdonság, mely nagyfokú koordinációt és ezzel összefüggésben bonyolult szabályozó mechanizmusokat feltételez. A patogenitás magában foglalja a gazda megtámadását, a gazdaszervezetbe történő bejutást, az abban való elszaporodást, a gazda védekező rendszerének gátlását stb. (Loria és mtsai, 2008). *S. scabies*ben a patogenitásért felelős gének a kromoszómán egymás mellett, az ún. patogenitási szigeten (PAI = pathogenicity island) helyezkednek el. A PAI-n található virulencia gének elsősorban a PAI-n elhelyezkedő specifikus regulátorok, továbbá általános hatású regulátorok szabályozása alatt állnak (Walthers és mtsai, 2007). A nagyméretű PAI-n elhelyezkedő gének terjedésében a horizontális géntranszfer fontos szerepet játszik. Előfordul, hogy a PAI nem patogén *Streptomyces* törzsbe kerülve azt fertőzőképessé teszi (Kers és mtsai, 2005).

A legfontosabb és legismertebb virulencia faktor a ciklikus dipeptid fitotoxin, a thaxtomin és a thaxtomin család további tagjai, melyek gátolják a cellulóz bioszintézis folyamatát. A thaxtomin bioszintetikus gének csak a burgonyavarasodást okozó *Streptomyces*ekben fordulnak elő, s génmegszakítással a törzsek fertőzőképessége megszűnik (Healy és mtsai, 2000). A thaxtomin termelés önmagában nem elég a fertőzőképességhez, további virulencia faktorok (szekunder metabolitok és szekretált enzimek) koordinált együttműködése szükséges. Ilyen további fontos virulencia faktor a szintén a PAI-n elhelyezkedő *nec1* gén terméke a Nec1 nekrozis faktor. A *nec1* delécioja szintén a fertőzőképesség megszűnésével jár (Joshi és mtsai, 2007).

A burgonyagumók fertőzéséhez a baktériumsejteknek át kell jutniuk a gumók felületét borító külső védőrétegen, melyet a sejtfalba rakódó szuberin tesz ellenállóvá a kiszáradással és a fertőzésekkel szemben. A szuberin egy komplex heteropolimer, melynek szerkezetét a komponensek közötti észterkötések stabilizálják (Kolattukudy, 1981). A fertőzésnek ezért fontos része a gumó külső védőrétegének degradációja, melyet különböző hidrolitikus enzimek végeznek (Kolattukudy, 1985). Ide tartozik a kizárólag patogén *S. scabies* törzsekben kimutatott hőstabil extracelluláris észteráz (McQueen és Schottel, 1987; Schottel és mtsai, 1992) is. Az enzim szabályozásáról tudjuk, hogy termelődése cinkkel aktiválható és a génje előtt egy 23 bp nagyságú fehérje-kötőhely található (Babcock és mtsai, 1992), mely nagymértékben azonos az AdpA konszenzus kötőhellyel. Továbbá a *S. scabies*-ben található egy, az A-faktor bioszintézisében kulcsszerepet játszó enzim, az AfsA génjének homológja. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a patogenitásban szerepet játszó extracelluláris észteráz része az AdpA által szabályozott regulációs kaszkádnak.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérletek során használt baktérium törzsek és burgonya fajták

3.1.1. *Streptomyces* törzsek

<i>S. griseus</i> 45H	Szabó és mtsai, 1961
<i>S. griseus</i> 52-1	Szabó és mtsai, 1961
<i>S. flavofungini</i>	Szabó és mtsai, 1961
<i>S. griseus</i> 45H-B	<i>S. griseus</i> 45H törzs <i>bald</i> mutánsa
<i>S. europaeiscabiei</i> CFBP4501	Bouchek-Mechiche és mtsai, 2000

3.1.2. *Escherichia coli* törzsek

<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA46 thi⁻ relA1 lac⁻</i> F ⁺ {proAB ⁺ lac ^q lacZΔM15Tn10 (tet ^r)} Bullock és mtsai, 1987
<i>E. coli</i> Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80lacZΔM15ΔlacX74 <i>deoR recA1</i> <i>araD139Δ (ara-leu) 7697 galU</i> <i>galK rpsL(Str^R) endA1 nupG</i> Grant és mtsai, 1990
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR</i> <i>zjj201::Tn10 galK2 galT22</i> <i>ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 tonA3</i> <i>rpsL136 hisG4 tsx78 mtli glnV44 F⁻</i> MacNeil és mtsai, 1992

3.1.3. Burgonya (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae) fajták

A patogenitási teszthez nagyüzemi termesztésben is alkalmazott burgonyafajták (Európai Burgonyafajták Adatbázisa; <http://www.europotato.org>) *in vitro* gumóit használtuk:

<i>S. tuberosum</i> L. Cleopatra	<i>S. tuberosum</i> L. (ZPC 50-35 X Desiree) holland fajta
<i>S. tuberosum</i> L. Desiree	<i>S. tuberosum</i> L. (Urgenta X Depesche) holland fajta
<i>S. tuberosum</i> L. Rebeka	(<i>S. chacoense</i> X <i>S. famatinae</i>) X <i>S. tuberosum</i> L. (Vanessa X Desiree) magyar fajta

Az értekezés további részeiben csak a fajtaneveket (Cleopatra, Desiree és Rebeka) használom. A mikrogumók tenyésztésének módszerét a 3.3.7. pontban írom le.

3.2. A kísérletek során használt táptalajok

A recepteket, ha más szerző nincs feltüntetve, a Genetic Manipulation of *Streptomyces* (Hopwood és mtsai, 1985) és a Practical *Streptomyces* Genetics (Kieser és mtsai, 2000) kézikönyvekből vettük. A táptalajok receptje 1 literre vonatkozik.

3.2.1. *Streptomyces* törzsek tenyésztéséhez használt folyékony táptalajok

YEME (yeast extract, malt extract):

yeast extract	3 g
bactopepton	5 g
malt extract	3 g
glükóz	10 g
szaharóz	340g
Autoklávozás után kiegészítjük:	
MgCl ₂ x 6H ₂ O (2,5 M)	2ml liter ⁻¹
pH 7,2-7,4 (1 M NaOH)	

TSB (tripton, soya broth):

tripton	17 g
szójapepton	3 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
glükóz	2,5 g
szacharóz	100g
pH 7,2-7,4 (1 M NaOH)	

MM (minimál táptalaj):

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
casaminosav	5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,6
PEG 6000	50 g
nyomelem oldat II (Zn-mentes)	1 ml
deszt. víz	800 ml

Szétmérjük 80 ml-es egységekre és felhasználáskor az alábbi összetevőkkel egészítjük ki:

NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ puffer (0,1 M, pH 6,8)	15 ml
szénforrás (glükóz) 20%	2,5 ml
deszt. víz	2,5 ml

Nyomelem oldat II (Zn-mentes, 1 literhez):

FeSO ₄ x 7H ₂ O	1 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1 g
CaCl ₂ nem hidratált	1 g

3.2.2. *Streptomyces* törzsek tenyésztéséhez használt szilárd táptalaj

R2YE (R5 regeneráló táptalaj):

szacharóz	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	10,12 g
glükóz	10 g
casaminosav	0,1 g
nyomelem oldat	2 ml
yeast extract	5 g
TES puffer	5,73 g

Felhasználás előtt 100 ml táptalajt az alábbi összetevőkkel egészítünk ki:

KH ₂ PO ₄ (0,5%)	1 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (5 M)	0,4 ml
L-Prolin (20%)	1,5 ml
NaOH (1 M)	0,7 ml
pH 7,2-7,4	

100 ml táptalajhoz 2,2 g agart adunk.

3.2.3 *Streptomyces* törzsek protopasztálásához használt táptalaj

A YEME vagy TSB táptalajt kiegészítjük 25 ml 20%-os glicinnel.

P (protoplasztáló)-puffer (800 ml-hez):

szaharóz	103 g
K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,02 g
nyomelem oldat III	2 ml

Szétmérjük 80 ml-es egységekre és felhasználáskor az alábbi összetevőkkel egészítjük ki:

KH ₂ PO ₄ (0,5%)	1 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (3,68%)	10 ml
TES puffer (5,73%, pH 7,2)	10 ml

Nyomelem oldat III (1 literhez):

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ x 4 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg

3.2.4. *Escherichia coli* törzsek tenyésztéséhez használt táptalajok

LB (Luria-Broth) - folyékony:

tripton	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	5 g
glükóz	1 g

LB - agaros: 100 ml folyékony LB-hoz 1,5 g agart adunk.

3.2.5. Burgonya *in vitro* mikrogumók tenyésztéséhez használt táptalaj

MS (Murashige-Skooge hormonmentes táptalaj; Murashige és Skooge, 1962):

NH_4NO_3	1650 mg
KNO_3	1900 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	440 mg
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	370 mg
KH_2PO_4	170 mg
H_3BO_3	6,2 mg
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot \times 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6 mg
KI	0,83 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8 mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	37,2 mg
myo-inositol	100 mg
niacin	0,5 mg
tiamin-HCl	0,1 mg
piridoxin-HCl	0,5 mg
glicin	2,0 g

A táptalaj receptje 1 literre vonatkozik. Burgonya *in vitro* növények tenyésztéséhez a táptalajt 0,8% agarral és 3% szaharózzal egészítjük ki, a mikrogumóképzés indukálásához pedig 8%-os szacharózoldatot öntünk a táptalajra.

3.3. Molekuláris biológiai módszerek

3.3.1. *Escherichia coli* törzsek transzformálása plazmid DNS-sel

A. Kompetens sejtek készítése

1. 20 ml folyékony LB táptalajra leoltunk 20-40 µl tenyészetet és 12-16 órán keresztül inkubáljuk 37 °C-on enyhén rázatva.
2. Másnap 50 ml LB táptalajt inokulálunk 400 µl-lel a fenti tenyészetből és megfelelő optikai denzitás (OD) eléréséig növesztjük a tenyészetet. Az OD-t fotométeren mérjük 620 nm-en.
3. A megfelelő sejtsűrűségű tenyészetet 10 percig jégen tartjuk, majd centrifugáljuk (4000 fordulat/perc, 10 perc, 4 °C). A sejteket ezt követően is végig jégen tartjuk.
4. A felülúszó leöntése után a kiülepedett sejteket szuszpendáljuk 20 ml jéghideg 100 mM MgCl₂ oldatban, majd centrifugáljuk (4000 fordulat/perc, 10 perc, 4 °C).
5. A sejteket 2 ml jéghideg 100 mM CaCl₂ oldatban szuszpendáljuk, majd 1-2 órán keresztül jégen tartjuk. Ekkor kapjuk a kompetens sejteket.

B. Transzformálás

6. 200 µl kompetens sejthez hozzáadunk 5-10 ng plazmid DNS-t és jégen inkubáljuk 1 órán keresztül.
7. Hő sokk: 42 °C, 2 perc, majd megint jégre tesszük a sejteket 2-5 percre.
8. 1 ml folyékony LB hozzáadása után 1 órán át 37 °C-on inkubáljuk.
9. 100-200 µl sejtet szélesztünk antibiotikum tartalmú agaros LB táptalajra és egy éjszakán át inkubáljuk 37 °C-on (kb. 1 mm-es telepméretig).

3.3.2. Plazmid DNS izolálása *Escherichia coli*ből

1. 20 ml folyékony LB táptalajra leoltunk 40 µl tenyészetet vagy LB agaros táptalajról felszedett egyedi telepeket és 12-16 órán keresztül 37 °C-on inkubáljuk síkrázógépen (250 rpm).
2. 1,5 ml tenyészetet átviszünk egy Eppendorf csőbe és centrifugáljuk (12000 fordulat/perc, 1 perc, 4 °C).
3. A felülúszó leöntése után szuszpendáljuk a sejteket jéghideg 100 µl I-es oldatban és kémcsőrázóval erőteljesen kevertetjük 1 percig.

4. A fenti szuszpenzióhoz hozzáadunk 200 µl frissen készített II-es oldatot és a csövet 3-5X átforgatjuk, hogy a sejtek lízise tökéletes legyen, melyet az oldat feltisztulása jelez.
5. A mintához adunk 150 µl jéghideg III-as oldatot, aminek hatására a fehérjék és a kromoszómális DNS precipitálódnak, amit centrifugálunk (12000 fordulat/perc, 5 perc, 4 °C).
6. A felülúszóból 400 µl-t pipetázunk egy új csőbe és hozzámérünk 1 ml jéghideg abszolút etanolt, majd -20 °C-on inkubáljuk 20-60 percig és centrifugáljuk (12000 fordulat/perc, 5 perc, 4 °C).
7. Leöntjük a felülúszót és a cső alján levő áttetsző csapadékot 400 µl 70%-os etanollal mossuk, centrifugáljuk (12000 fordulat/perc, 1perc, 4 °C).
8. Leöntjük a felülúszót és a csapadékot vákumszáritóban szárítjuk.
9. A pelletet 50-100 µl TE-pufferben (pH 8,0) oldjuk.

I-es oldat: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 10 mM EDTA
 50 mM glükóz

II-es oldat: 1% SDS
 0,2 M NaOH

III-as oldat: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM EDTA

A fenti, alkalikus lízisen alapuló módszer mellett még a Sigma PLD-100 Gen EluteTM Plazmid Midi-Prep kitet is alkalmaztuk plazmid izolálásra.

3.3.3. *Streptomyces* törzsek transzformálása plazmid DNS-sel

A transzformációt az alábbi standard protokoll szerint végeztük: *Streptomyces lividans* 1326 törzs transzformációja pIJ702 plazmiddal.

A. Protoplaszt-készítés

1. 50 ml YEME vagy TSB táptalajt 0,1 ml spóraszuszpenzióval (kopasz mutáns esetén micéliummal) inokulálunk, majd síkrázógépen inkubáljuk 30 °C-on, 40 órán keresztül.
2. A tenyészetet szobahőmérsékleten centrifugáljuk (3000 fordulat/perc, 10 perc).
3. A felülúszó leöntése után a sejteket mossuk 15 ml steril 10,3%-os szacharóz oldattal, majd ismét centrifugáljuk (3000 fordulat/perc, 10 perc).
4. Az előző lépést megismételjük.
5. A felülúszó leöntése után a sejteket szuszpendáljuk 4 ml steril, 1 mgml⁻¹ lizozimot tartalmazó P-pufferben és 30 °C-on 30-60 percig inkubáljuk. A protoplaszt-képződést mikroszkóposan ellenőrizzük.
6. Az esetleges micéliális göbök megszüntetése céljából steril pipettába néhányszor felszívjuk a szuszpenziót, majd 15 percig tovább inkubáljuk.
7. A szuszpenziót kiegészítjük 5 ml P-pufferrel és megismételjük az előző lépést. Mikroszkóposan ellenőrizzük a protoplaszt-képződést.
8. Az esetlegesen nem protoplasztálódott micéliális formák eltávolítása céljából a protoplasztot steril vattán szűrjük, majd centrifugáljuk (3000 fordulat/perc, 7 perc).
9. A protoplasztokat szuszpendáljuk 10 ml P-pufferben.
10. Megszámoljuk a protoplasztokat hemocitóméterben és mintegy 4×10^9 protoplasztot tartalmazó aliquot-ot használunk egy transzformáláshoz.

B. Transzformálás

11. A protoplaszt centrifugálása (3000 fordulat/perc, 7 perc) és a felülúszó leöntése után a protoplasztot szuszpendáljuk a visszamaradó utolsó csepp pufferben.
12. A plazmid DNS hozzáadása (max. 20 µl pufferben) után azonnal hozzáadunk 0,5 ml 25% PEG tartalmú P-puffert.
13. 2-3 perc állás után kiegészítjük 5 ml P-pufferrel és centrifugáljuk (3000 fordulat/perc, 7 perc), majd újabb 1 ml P-pufferben szuszpendáljuk.

14. R2YE lemezekre 0,1-0,2 ml szuszpenziót szélesztünk és 30 °C-on 18-20 óráig inkubáljuk.
15. 18-20 óra múlva a lemezeket felülrétegezzük 1,5 ml thiostreptont tartalmazó (0,66 mgml⁻¹) deszt. vízzel. Két nap után a transzformánsok telepei már láthatóak.

3.3.4. Kromoszómális DNS izolálása *Streptomyces* törzsekből

A DNS izolálást az alábbi standard protokoll szerint végeztük: Kirby-módszer

1. 50 ml YEME vagy TSB táptalajon növesztett tenyészetet centrifugálás után szuszpendálunk 3 ml lizozim oldatban, majd 37 °C-on 10-30 percig inkubáljuk.
2. 4 ml 2 x Kirby-mix hozzáadása után 1 percig kevertetjük kémcsőrázóval.
3. 8 ml fenol/kloroform/izoamilalkohol (50:50:1) elegyet adunk hozzá és 15 másodpercig ismét kevertetjük kémcsőrázóval, majd centrifugáljuk (3000 fordulat/perc, 10 perc).
4. A felső vizes fázist új, tiszta centrifugacsőbe visszük át és újabb 3 ml fenol/kloroform/izoamilalkohol elegyet hozzáadva megismételjük a 3. lépést.
5. Ismét a felső vizes fázist visszük át új, tiszta centrifugacsőbe és 1/10 térfogatnyi 3M Na-acetátot (pH 6,0) valamint egyenlő térfogatnyi izopropanolt adunk hozzá, majd 10-30 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk.
6. A csapadékot vékony üvegbot hegyére óvatosan felcsavarjuk és 5 ml 70%-os alkoholban mossuk, majd szárítjuk.
7. Ezután oldjuk 5 ml TE pufferben (pH 8,0), majd RNáz-zal (40 µg ml⁻¹) kezeljük 37 °C-on 30 percig.
8. 1,5 ml fenol/kloroform/izoamilalkohol elegyet adunk hozzá majd a 4. lépés szerint kevertetjük és centrifugáljuk.
9. A kromoszómális DNS-t az 5. és 6. lépés szerint izopropanollal lecsapjuk, üvegbot hegyére felcsavarjuk és 70%-os alkohollal mossuk.
10. Szárítás után a csapadékot 1-2 ml TE pufferben (pH 8,0) oldjuk.

Lizozim oldat: 2 mgml⁻¹ lizozim
 0,3 M szacharóz
 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 25 mM EDTA (pH 8,0)

2 x Kirby-mix: 1% Na-triizopropilnaftalén-szulfonát
 6% Na-4-amino-szalicilát
 6% fenol:kloroform (1:1) (pH 7,0)
 50 mM Tris-HCl (pH 8,3)

3.3.5. C faktor gén megszakításához felhasznált plazmidok

A C faktor gén megszakítását *in vitro*, a pSGF4 plazmidba klónozott génkópián végeztük a pHP45*Ωaac* plazmidból származó aminoglükozid-3-acetiltranszferáz IV enzimet kódoló génkazetta (*aacC4*) felhasználásával (Blondelet-Rouault és mtsai, 1997). A génmegszakítás során a Practical *Streptomyces* Genetics (Kieser és mtsai, 2000) kézikönyv 14. fejezetében leírt módszert követtük.

3.3.6. Southern hibridizáció

Southern hibridizációval vizsgáltuk

- a) a C faktor gén előfordulását különböző *Streptomyces* törzsekben;
- b) a C faktor gén delécióját a *bald* mutánsban;
- c) a *nec1* nekrosis faktor gén jelenlétét különböző *Streptomyces* törzsekben.

A. A minta előkészítése:

- 1. A kromoszómális DNS emésztése különböző restrikciós enzimekkel.
- 2. Gélelektroforézis 1%-os agaróz gélen.

B. A minta blottolása:

- 1. Összeállítjuk a vákuum transzfer készüléket.
- 2. A gélrt ráfektetjük a blottoló membránra (Hybond-N, Amersham) és rögzítjük.
- 3. Depurinálás: 10 ml depurináló oldatot öntök a gélre és addig hagyjuk rajta míg a gélben levő brómfenolkék színe sárgára változik (kb. 10 perc). A végén a felesleges oldatot pipettával leszívjuk.
- 4. Denaturálás: 10 ml denaturáló oldatot öntünk a gélre és addig várunk míg a sárga szín újra kékre változik (kb. 10 perc). A felesleges oldatot pipettával eltávolítjuk.
- 5. Neutralizálás: 10 ml neutralizáló oldatot öntünk a gélre és kb. 10 percig hagyjuk rajta.

6. A fenti módon előkezelt géltre 300-500 ml 20xSSC oldatot öntünk és a vákumblottot 90 percig folytatjuk.
7. 90 perc után a vákumot megszüntetjük, a folyadékot leöntjük, a membránt 2xSSC-ben mossuk, majd UV fénnel mindkét oldalon 3-4 percig megvilágítva a DNS-t kovalensen kötjük a membránhoz.

Depurináló oldat: 0,25 M HCl

Denaturáló oldat: 1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralizáló oldat: 3 M NaCl
0,5 M Tris-HCl (pH 7,4)

20 x SSC: 3 M NaCl
0,3 M Na-citrát

C. Hibridizáció radioaktívan jelölt próba esetén:

1. Prehibridizáció: 42 °C; 1,5 óra; 40 ml prehibridizációs oldat I
2. Hibridizáció: 42 °C; 12-16 óra; 10 ml hibridizációs oldat I

Prehibridizációs oldat I: 25 mM K₂PO₄ (pH 7,4)
5 x SSC
5 x Denhardt oldat
50 % formamid

Hibridizációs oldat I: 10 ml prehibridizációs oldat
10 µl radioaktív foszforral jelölt próba (95 °C-on denaturált kétszálú DNS)

A jelölést Amersham Megaprime random priming kittel végeztük.

50 x Denhardt oldat: 1% fikoll (mw: 400000 Da)
1% BSA fraction V
1% polivinil pirrolidon
5 mgml⁻¹ denaturált hering sperma DNS

D. A filter mosása radioaktívan jelölt próba esetén:

1. 2 x NET/0,1% SDS; 42 °C, 15 perc
2. 2 x NET/0,1% SDS; 55 °C, 15 perc
3. 0,5 x NET/0,1% SDS; 55 °C, 15 perc
4. 0,1 x NET/0,1% SDS; 65 °C, 15 perc

20 x NET puffer: 3 M NaOH
 0,3 M Tris-HCl (pH 8,0)
 0,02 M EDTA

E. A hibridizáció eredményének detektálása radioaktívan jelölt próba esetén:

A membránt sötétben Amersham Hyperfilm MP típusú röntgenfilmre helyezzük úgy, hogy jelölt oldala a röntgenfilm felé nézzen és egy rövid időre röntgenfilm-kazettába zárjuk, míg a jel nem rögzül a filmen. Ez minimum 1 óra, de az idő szükség szerint növelhető. Ezt követően előhívjuk a filmet.

F. Hibridizáció digoxigeninnel jelölt próba esetén:

A próba jelölését, a hibridizálást és az eredmény detektálását a Dig Nucleid Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim) leírása illetve a Roche DIG DNA labeling and detection kit alapján végeztük.

1. Prehibridizáció: 42 °C; 1,5 óra; 40 ml prehibridizációs oldat II
2. Hibridizáció: 42 °C; 12-16 óra; 10 ml hibridizációs oldat II

Prehibridizációs oldat II: 5 x SSC
 2 % blokkoló reagens
 0,1% N-lauroylsarcosine
 0,02% SDS
 50% formamid

Hibridizációs oldat II: 10 ml prehibridizációs oldat II
 10 µl digoxigeninnel jelölt próba (95 °C-on denaturált
 kétszálú DNS)

G. A filter mosása digoxigeninnel jelölt próba esetén:

1. 2 x SSC/0,1 % SDS; szobahőmérséklet, 15 perc
2. 2 x SSC/0,1 % SDS; 42 °C, 30 perc
3. 2 x SSC/0,1 % SDS; 55 °C, 30 perc
4. 0,5 x SSC/0,1 % SDS; 55 °C, 30 perc

H. A hibridizáció eredményének detektálása digoxigeninnel jelölt próba esetén:

1. 50 ml mosó oldat (0,1 M maleinsav, 0,15 M NaCl, pH 7,5), 0,3% Tween 20), 1 perc
2. 100 ml blokkoló oldat (mosó oldat, 1% blokkoló reagens), 30 perc
3. 20 ml antitest oldat (anti-digoxigenin-AP konjugáns 1:5000 arányban 20 ml blokkoló oldatban), 30 perc
4. 100 ml mosó oldat, 2 x 15 perc
5. 20 ml előhívó oldat, (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl), 2 perc
6. A színreakció lejátsszódása 0,33 mgml⁻¹ NBT (nitro blue tetrazolium klorid, Sigma N5514) és 0,165 mgml⁻¹ BCIP (5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát, Sigma B0274) tartalmú előhívó oldatban (20 ml) történik (20 perc – 12 óra, sötét hidegszoba). A színreakciót deszt. vízben vagy TE pufferben való mosással állítjuk le.

3.3.7. 16S rRNS génszekvencia analízis

A *S. griseus* 45H törzs taxonómiai besorolását, valamint a *S. griseus* 45H, *S. flavofungini* és *S. griseus* 52-1 törzsek rokonságát 16S riboszómális RNS (rRNS) génszekvencia analízissel vizsgáltuk (Mehling és mtsai, 1995). A fenti törzsek, a törzsekkel rokon *Streptomyces*ek és a *Streptomyces* genusz reprezentatív tagjainak 16S rRNS gén szekvenciáiból a „Neighbour-joining” standard módszer (Saitou és Nei, 1987) valamint a Jukes és Cantor-féle távolságmatrix felhasználásával (Jukes és Cantor, 1969) történt a törzsek közötti rokonságot bemutató filogenetikai fa megszerkesztése.

3.3.8. Észteráz enzimaktivitás mérése

Az extracelluláris enzimaktivitást négy *Streptomyces* törzsben (*S. griseus* 45H, *S. griseus* 45H-B, *S. griseus* 52-1, *S. europaeiscabiei* CFBP4501) vizsgáltuk. A *S. europaeiscabiei* CFBP4501 egy ismert burgonyapatogén és franciaországi szabadföldi termesztésben lévő burgonyagumókról izolálták (Bouchek-Mechiche és mtsai, 2000). A sejteket 50 ml MM táptalajon tenyésztettük (28 °C, 72 óra). Törzsenként két párhuzamos tenyészet került leoltásra, az egyik 2 µM cinket tartalmazó, a másik cinkmentes MM táptalajon. Az extracelluláris észteráz-aktivitást a sejtek fermentlevéből mértük spektrofotométerrel, p-nitrofenil-butirát (PNB) mesterséges szubsztrát felhasználásával (McQueen és Schottel, 1987). 200 µl fermentléhez 3 ml 80 mM Na-foszfát puffert adtunk (pH 8,0), hogy biztosítsuk az enzimaktivitáshoz szükséges optimális pH-t. A kiindulási szubsztrátkoncentráció 0,4 mM PNB 2,5 ml acetonitrilben; a PNB hidrolízist Camspec M 301 UV-Visible spektrofotométerben mértük 10 percig 420 nm-en. Az enzimaktivitást párhuzamosan mértük hőkezelt (60 °C, 10 perc) és nem hőkezelt mintákban. Az extracelluláris észteráz aktivitást (U) 1 mg száraz micéliumra vonatkoztatva adtuk meg nmolmin⁻¹mg⁻¹ egységben. Három párhuzamos mérés alapján szórást számoltunk, illetve Student-féle T próba alapján szignifikancia analízist is végeztünk.

3.3.9. Burgonya mikrogumó patogenitási teszt

A. *Streptomyces* törzsek tenyésztése:

100 ml folyékony TSB táptalajt inokuláltunk 2×10^5 spóra/ml spóraszuszpenzióval ill. kopasz mutáns esetén 2×10^5 cfu/ml micéliummal. A tenyésztés 500 ml-es, rozsdamentes acélspirált tartalmazó Erlenmeyer-lombikban történt síkrázógépen (28 °C, 72 óra, 250 fordulat/perc). Az acélspirál a tenyészet jó levegőzését biztosítja, s homogénebb tenyészetet eredményez.

B. Burgonya mikrogumók *in vitro* tenyésztése (Dobránszki és mtsai, 1999):

Egy-leveles szárdarabokat teszünk hormonmentes MS táptalajra (30 db/40 ml táptalaj/tenyészedény), ezen neveljük őket 4 hétig (24/15 °C nappali/éjszakai hőmérséklet, 16 órás megvilágítás). A négyhetes tenyésztés során kifejlett *in vitro* növényeket kapunk. A gumóképződés indukálásához minden tenyészedénybe 5 ml 8%

szacharózt tartalmazó oldatot öntünk és az *in vitro* növényeket 2 hétre rövidnappalos megvilágításra helyezzük. Ezt követően 11 hétig teljes sötétségben neveljük a gumókat. A gumósítás teljes ideje a gumók betakarításig 17 hét. A betakarítást követően az *in vitro* gumókat (mikrogumókat) 1 héteg szobahőmérsékleten parásítjuk, vagyis hagyjuk, hogy kialakuljon és kellően megvastagodjon a mikrogumók külső védőrétege a para (szuberin) szövet. A mikrogumókat ezt követően használjuk fel a kísérletekhez.

C. Patogenitási teszt burgonya mikrogumókon:

A tesztelés során négy *Streptomyces* törzset (*S. griseus* 45H, *S. griseus* 45H-B, *S. griseus* 52-1, *S. europaeiscabiei* CFBP4501) és három burgonyafajtát (Cleopatra, Desiree, Rebeka) használtuk. A *Streptomyces* sejteket a tenyésztést követően centrifugáljuk (3000 fordulat/perc, 10 perc), majd szuszpendáljuk 50 ml steril deszt. vízben. Fajtánként 12 burgonya mikrogumót helyezünk 20-20 ml sejtszuszenzióba (kb. 10^8 cfu/ml), 5 mikrogumót steril deszt. vízbe helyezünk. 10 perc után a mikrogumókat kivesszük és nedves papírvattával bélelt, lefedett Petri-csészékben 28 °C-os termosztátba helyezzük. A tünetek alapján öt betegségfokozatot különböztettünk meg, melyek alapján betegségindexet (Bi) számoltunk. A mikrogumókat a kezelést követően 10 napig monitoroztuk. Négy párhuzamos kísérletet végeztünk és a tesztet kétszer ismételtük. A kapott eredményekből szórást számoltunk és szignifikancia analízist is végeztünk.

3.3.10. További molekuláris biológiai módszerek

A kísérletek során még az alábbi molekuláris biológiai módszereket használtuk fel, melyek megtalálhatók a Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. (Sambrook and Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) kézikönyvben:

Agaróz gél elektroforézis	1. kötet, 1. fejezet,
DNS fragmentek ligálása	1. kötet, 1. fejezet
DNS fragmentumok amplifikálása	
polimeráz láncreakcióval	2. kötet, 8. fejezet

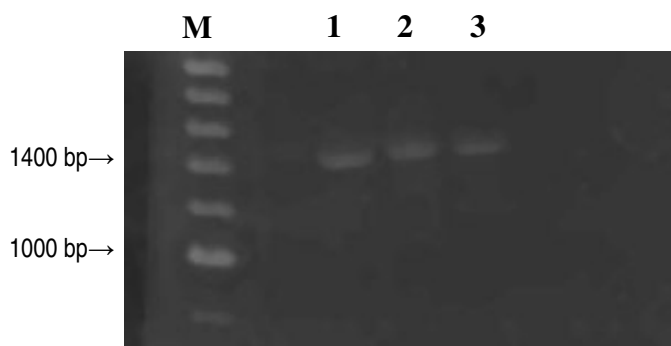
A DNS fragmentek gélből való izolálására gyári kit-eket használtunk: QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen); Sigma 5-6501 Genelute Minus EtBr Spin Columns Kit.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A C faktort termelő törzs taxonómiai átsorolása

A C faktor génjének klónozását követően (Birkó és mtsai, 1999) egyértelművé vált, hogy a *S. griseus* 45H törzs nem a *S. griseus* 52-1 törzs „leszármazottja”, ugyanakkor felvetődött annak lehetősége, hogy a C faktort termelő törzs taxonómiai besorolását tekintve valójában *S. flavofungini*. A törzsek rokonságát és így a *S. griseus* 45H törzs taxonómia besorolását 16S rRNS génszekvencia analízissel és Southern hibridizációval kívántuk tisztázni.

Első lépésben a *S. griseus* 52-1, *S. griseus* 45H és *S. flavofungini* törzsekből kromoszómális DNS-t izoláltunk, majd a 16S rRNS génjét PCR reakcióval amplifikáltuk mindhárom törzsben, amihez az alábbi primerpárt használtuk: 16SF (forward) 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' és 16SR (reverz) 5'GGCTACCTTGTACGACTTC3'. A kapott kb. 1425 bp-os fragmenteket gélből izoláltuk (7. ábra). A 16S rRNS gének szekvenciáját direkt szekvenálási módszerrel (Kim és mtsai, 2000) határoztuk meg, melyek a GenBank adatbázisban az EF571001 (*S. griseus* 52-1), EF571002 (*S. griseus* 45H) EF571003 (*S. flavofungini*) számon hozzáférhetőek.



7. ábra A 16S rRNS gén PCR reakció eredménye 1%-os agaróz gélen

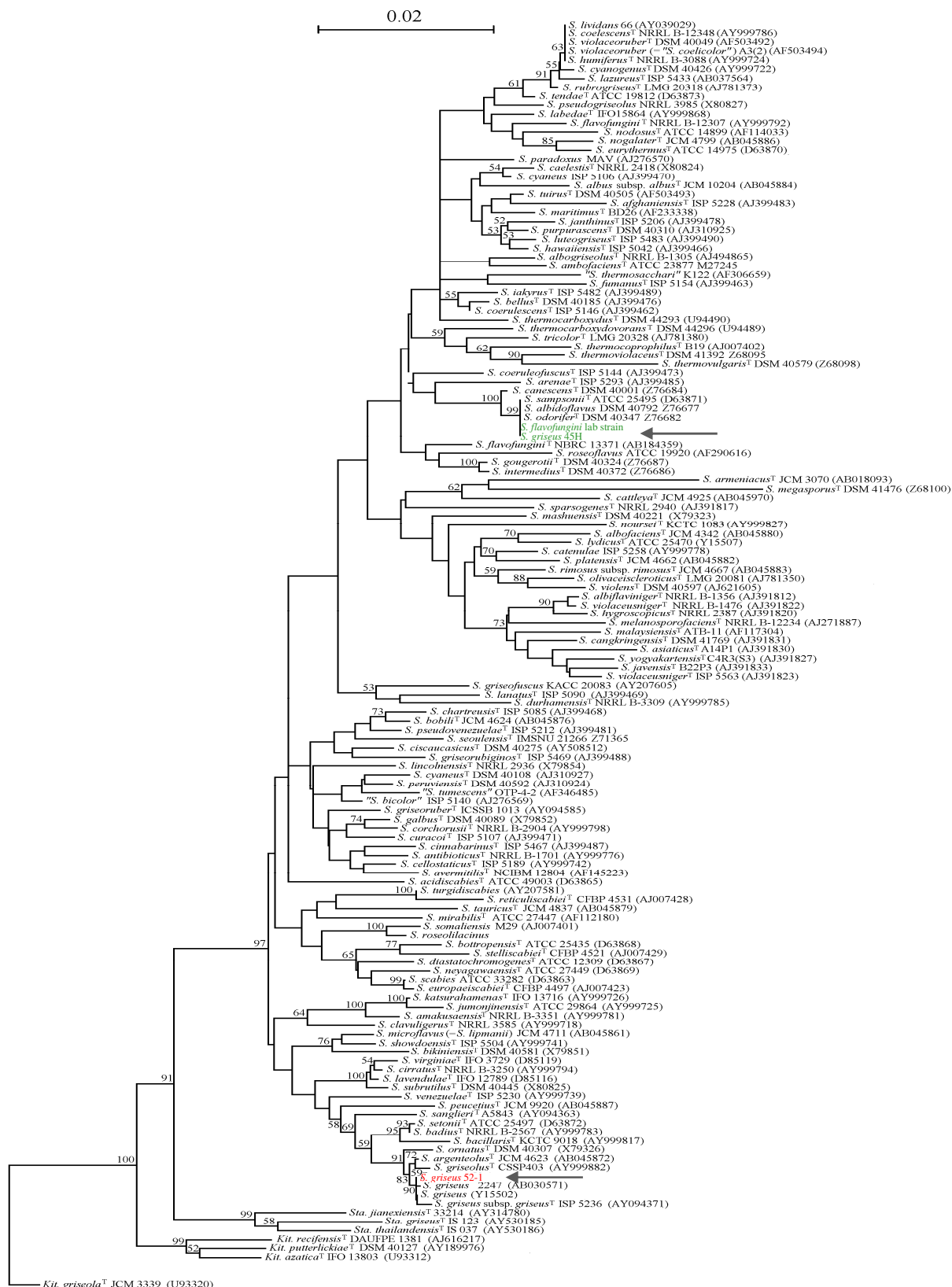
M – 200bp DNS molekulasúly marker (Promega); 1. *S. griseus* 52-1, 2. *S. griseus* 45H, 3. *S. flavofungini*

Ezt követően a kapott szekvenciákat egymással és a GenBank-ban fellelhető szekvenciákkal összehasonlítva az alábbi eredményeket kaptuk:

1. A *S. griseus* 52-1 törzs 16S rRNS gén szekvenciája megegyezik a *S. griseus* 2247 törzs rRNS operonok rrnA-E (GenBank AB030567-AB030572) szekvenciáival, és más *S. griseus* törzsek szekvenciájával, azaz a törzs valóban *S. griseus*.
2. A *S. griseus* 45H és *S. flavofungini* törzsek 16S rRNS gén szekvenciái egymással teljesen megegyeznek, de hasonlóságuk a *S. griseus* 52-1 törzsszel csak 96%-os. Eltérnek továbbá a típustörzs *S. flavofungini* NRRL B-12307^T (GenBank AY999792) és NBRC 13371 (GenBank AB184359) szekvenciáitól is, azokkal csak 97,21%-ban illetve 97,40%-ban egyeznek meg. Teljesen azonosak viszont a *S. albidoflavus* csoport 16S rRNS gén szekvenciáival (GenBank DQ855477, DQ978978, stb.).

A szekvencia-összehasonlítás eredményei a „9. Függelék” fejezetben kerültek feltüntetésre.

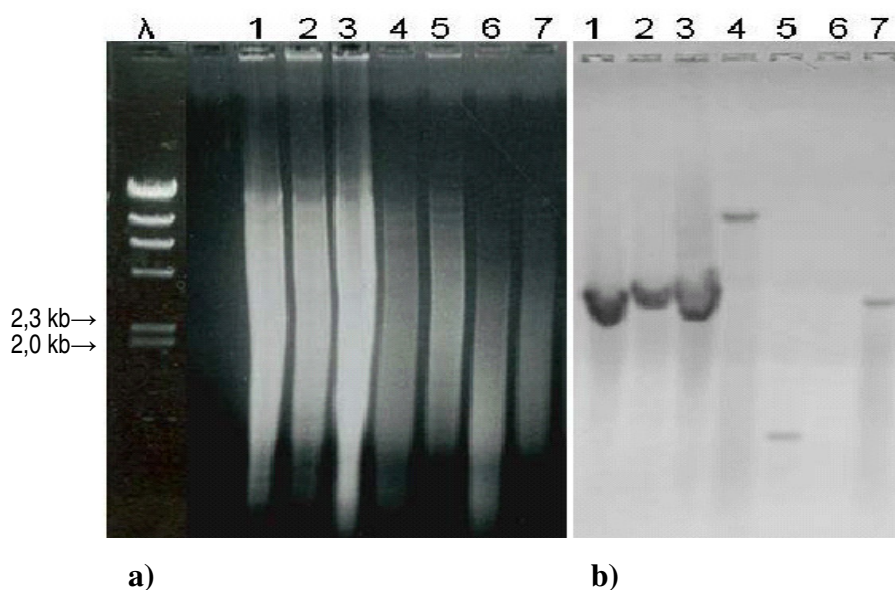
A génszekvenciák ismeretében meghatároztuk a laboratóriumban izolált *S. griseus* 45H, *S. flavofungini* és *S. griseus* 52-1 törzsek filogenetikai elhelyezkedését a *Streptomyces*ek törzsfáján (8. ábra).



8. ábra A *S. griseus* 45H, *S. flavofungini* és *S. griseus* 52-1 törzsek elhelyezkedése a *Streptomyces*ek törzsfáján a 16S rRNS szekvenciák összehasonlítása alapján.

Root: *Kitasatospora griseola*; bootstrap értékek (>50 %) 1000 ismétlés után %-ban vannak kifejezve. A vonal 0,02 szubsztitúciót jelent nukleotid pozícióként.

Mivel a szekvenenciaanalízis alapján egyértelművé vált, hogy a laboratóriumban izolált *S. griseus* 45H és *S. flavofungini* törzseink azonosak és a *S. albidoflavus* csoportba tartoznak, Southern hibridizációval vizsgáltuk a C faktor gén meglétét a *S. albidoflavus* csoport fajaiban (9. ábra). A különböző törzsekből származó kromoszómális DNS-t *Sac*II enzimmel emésztettük, próbaként a gén 860 bp hosszúságú *Eco*RV-*Sal*I fragmentjét használtuk (Birkó és mtsai, 1999). Négy vizsgált törzs közül háromban (*S. canescens* ICSSB 1002^T, *S. odorifer* ICSSB 1004^T és *S. sampsonii* ICSSB 1011^T) megtalálható a gén. Egyedül a *S. albidoflavus* Rossi Doria 1891 törzsben nincs meg a C faktor gén, amely törzs relative távoli rokona a csoport tagjainak (Ferguson és mtsai, 1997).



9. ábra A C faktor gén azonosítása a *Streptomyces albidoflavus* csoportba tartozó törzsekben. **a)** *Streptomyces* törzsek *Sac*II enzimmel emésztett kromoszómális DNS-e 1%-os agaróz gélen; **b)** Southern hibridizáció eredménye

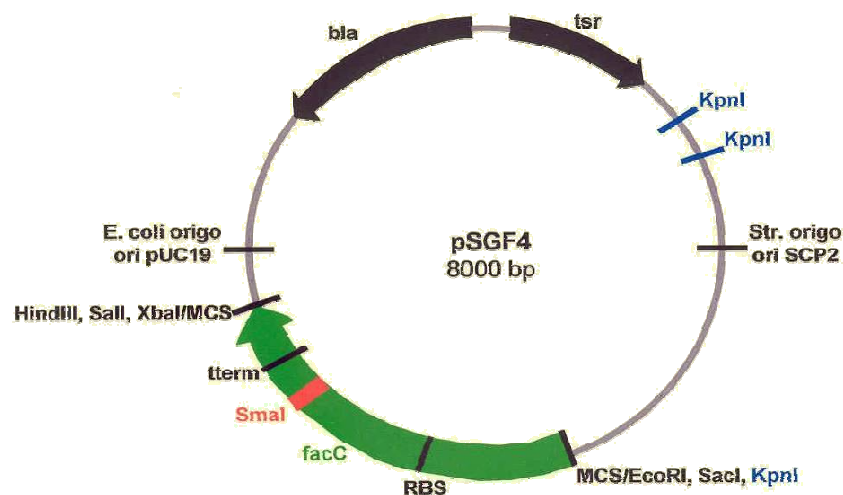
λ : *Hind*III enzimmel emésztett λ fág DNS; 1. *S. albus*, 2. *S. griseus* 45H, 3. *S. flavofungini*, 4. *S. canescens* ICSSB 1002^T, 5. *S. odorifer* ICSSB 1004^T, 6. *S. albidoflavus* Rossi Doria 1891, 7. *S. sampsonii* ICSSB 1011^T.

Eredményeink alapján valószínűsítjük, hogy a C faktort termelő törzs azonos az ugyanabban az időszakban, ugyanabban a laboratóriumban tanulmányozott *flavofungint* termelő *S. flavofungini* törzsszel (Úri és Békési, 1958), melyet véletlen laboratóriumi kontaminációként izoláltak. A 16S rRNS génszekvencia-analízis és a Southern hibridizáció eredményei alapján a törzsek a *S. albidoflavus* csoportba tartoznak, ezért a C faktort termelő törzs elnevezését *S. albidoflavus* 45H-ra javasoltuk megváltoztatni.

4.2. A C faktort nem termelő mutáns létrehozása és fenotípusos vizsgálata

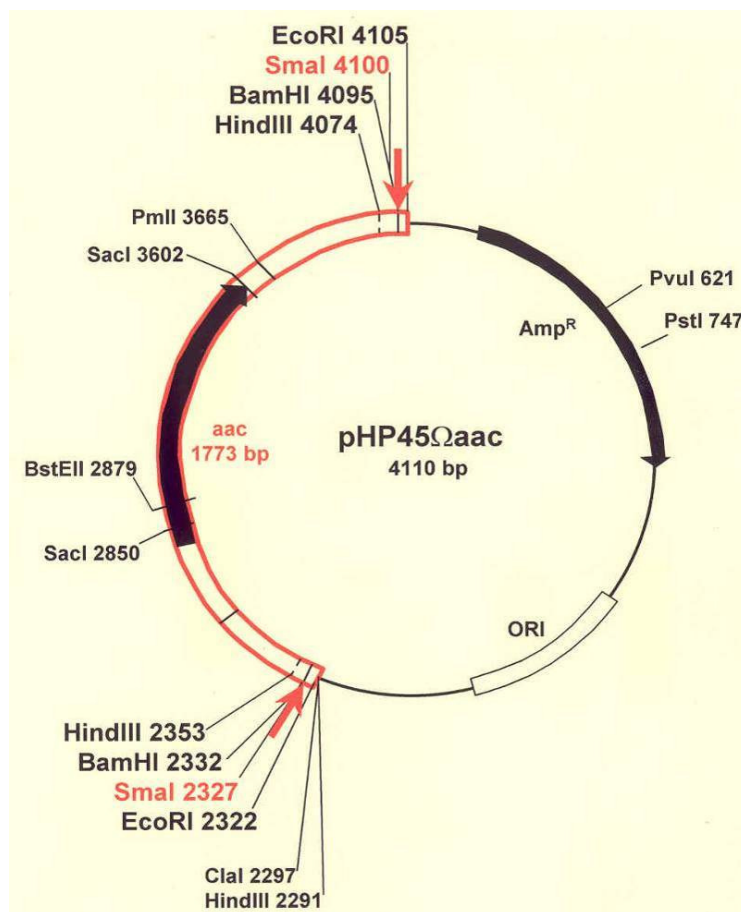
Ebben a kísérletben arra kerestük a választ, hogy a C faktor az életciklus mely lépéseit szabályozza a *S. griseus* 45H törzsben. Ennek vizsgálatához létre kellett hoznunk a törzs C faktort nem termelő mutánsát, melynek fenotípusából következtetni tudunk a fehérje differenciálódásban betöltött szerepére. *In vitro* kísérletsorozatban terveztük a C faktor gén inzerciós inaktiválását, melynek során egy antibiotikum rezisztenciát kódoló génkazettát építünk be a C faktor génbe egy restriktációs enzim egyedi hasítóhelyére, majd egy olyan vektort hozunk létre, amely csak akkor marad fenn, ha homológ módon integrálódik a genomba és így az inaktív gén kettős crossing overrel a kromoszómális kópia helyére kerül. A gén megszakításához a pSGF4 (Birkó és mtsai, 1999) és pHP45 Ω aac (Blondelet-Rouault és mtsai, 1997) plazmidokból indultunk ki. A génmegszakítás és az inaktivált gént tartalmazó plazmid szelektálása *E. coli*-ban történt, majd ezt a plazmidot transzformáltuk a *S. griseus* 45H törzsbe.

A C faktor gén, melynek kódoló régiójában az 1765-1770 nt szekvenciánál található egy egyedi *Sma*I enzim hasítóhely CCCGGG szekvenciával (Birkó, 1999), egy 2100 bp nagyságú fragmentumon van klónozva a pSGF4 plazmidba (10. ábra).



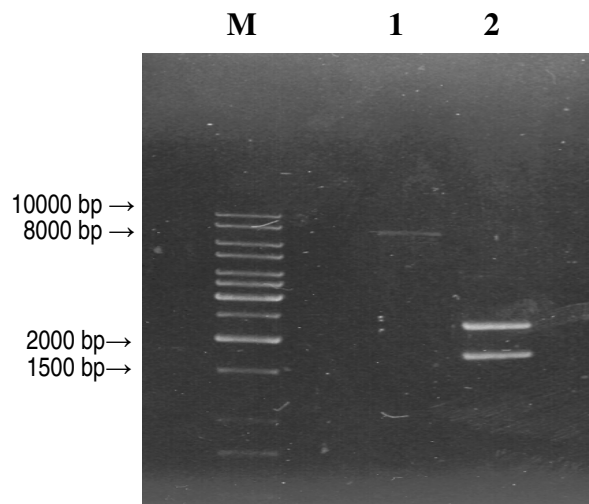
10. ábra A pSGF4 plazmid térképe

A pHP45 Ω aac plazmidba egy aminoglükozid-3-acetiltranszferáz IV enzimet (*aacC4*) kódoló génkazetta (11. ábra) van klónozva, mely *Sma*I enzimmal kivágható, és így beépíthető a C faktor génben lévő *Sma*I enzim hasítóhelyre.



11. ábra A pHP45 Ω aac plazmid térképe

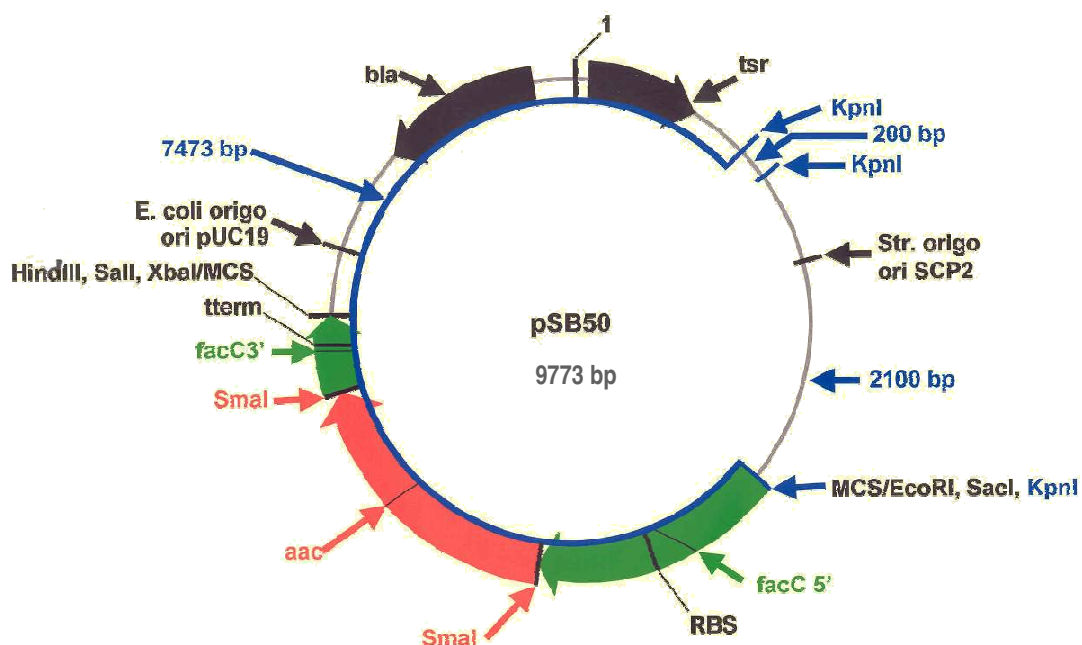
Mindkét plazmidot *Sma*I enzimmal emésztettük, így a pSGF4 plazmidból egy 8000 bp-os lineáris fragmentet, a pHP45 Ω aac plazmidból pedig egy 1773 bp-os és egy 2337 bp-os fragmentet kaptunk (12. ábra), melyek közül a kisebbik fragment tartalmazta az *aacC4*-génkazettát. A megfelelő fragmenteket 1%-os agaróz gélből izoláltuk.



12. ábra *Sma*I enzimmel emésztett pSGF4 és pHP45Ω*aac* plazmidok 1%-os agaróz gélen.

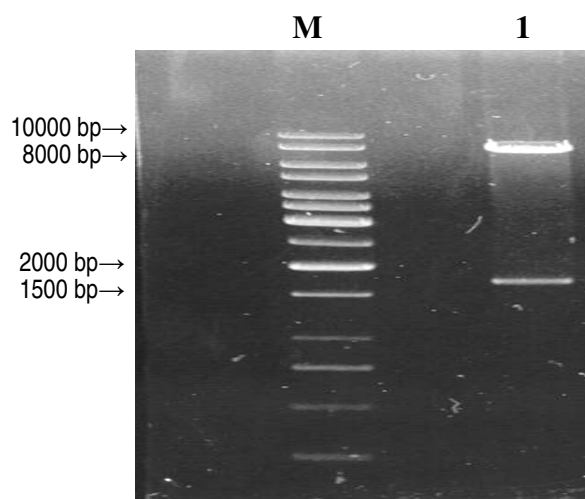
M - GeneRuler™ 1 kb DNS molekulásúly marker (Fermentas); 1. pSGF4 plazmid 8000 bp nagyságú lineáris fragment; 2. pHP45Ω*aac* plazmid 1773 bp és 2337 bp nagyságú fragmentek

A gélből izolált két fragment ligálásával jött létre a 9773 bp méretű pSB50 plazmid (13. ábra). A pSB50 plazmid tartalmazza az *aacC4* génkazettával megszakított C faktor gént, valamint *E. coli* és *Streptomyces* replikációs origóval (*ori*pUC19 és *ori*SCP2) is rendelkezik.



13. ábra A pSB50 plazmid térképe

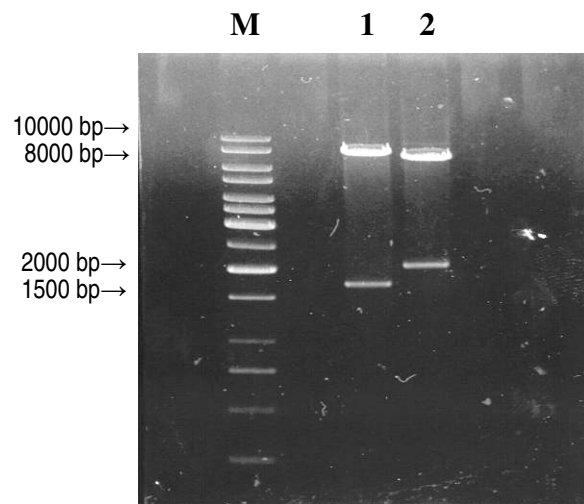
A pSB50 plazmidot *E. coli* Top10 törzsbe transzformáltuk. Mivel az *aacC4* egy aminoglükozid-3-acetiltransferáz IV enzimet kódol, ami apramycin (Apr), gentamycin (Gm), és geneticin (Gn) rezisztenciát eredményez, a transzformánsokat $100\ \mu\text{gml}^{-1}$ ampicillin (Amp) és $20\ \mu\text{gml}^{-1}$ gentamycin (Gm) tartalmú agaros LB táptalajon szelektáltuk. Az Amp^R Gm^R telepekből plazmidot izoláltunk, majd a plazmid szerkezetét restrikciós emésztéssel ellenőriztük (14. ábra).



14. ábra *Sma*I enzimmal emésztett pSB50 plazmid 1%-os agaróz gélen.

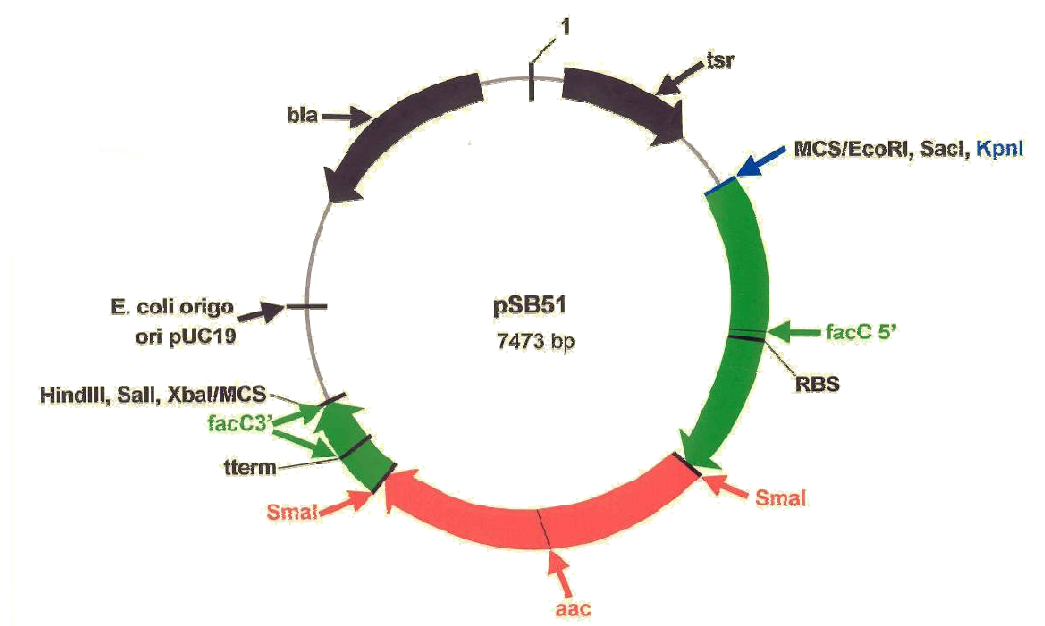
M - GeneRuler™ 1 kb DNS molekulasúly marker (Fermentas); 1. pSB50 plazmid 1773 bp és 8000 bp nagyságú fragmentek

A *S. griseus* 45H törzsben tervezett homológ rekombinációhoz olyan plazmidra van szükség, amely ebben a törzsben nem képes replikálódni, ezért a pSB50 plazmidból el kellett távolítani az *oriSCP2* régiót. Ehhez a pSB50 plazmidot *Kpn*I enzimmal emésztettük, amelynek eredményeképpen három fragmentet - 200 bp, 2100 bp, 7473 bp - kaptunk (15. ábra). Az *oriSCP2* replikációs origó a 2100 bp-os fragmenten, míg az *aacC4* génkazettával megszakított C faktor gén a 7473 bp-os fragmenten található. Ez utóbbi fragmentet izoláltuk a gélből, majd cirkularizáltuk.



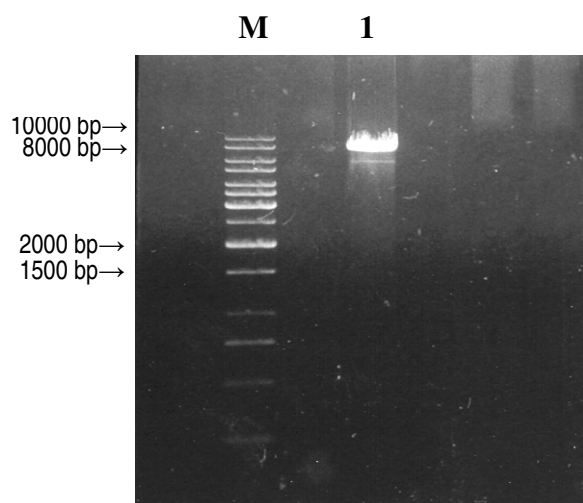
15. ábra A pSB50 plazmid *Sma*I és *Kpn*I enzimekkel emésztve 1%-os agaróz gélen.
M - GeneRuler™ 1 kb DNS molekulásúly marker (Fermentas); 1. pSB50 plazmid 1773 bp és 8000 bp nagyságú *Sma*I fragmentek; 2. pSB50 plazmid 2110 bp és 7473 bp nagyságú *Kpn*I fragmentek

A 7473 bp-os *Kpn*I fragment cirkularizációjával jött létre a pSB51 plazmid (16. ábra), amely *Streptomyces*ben nem képes replikálódni és csak akkor marad fenn, ha homológ módon integrálódik a genomba.



16. ábra A pSB51 plazmid térképe

A pSB51 jelű plazmidot *E. coli* 12567 *Dam*⁻*Dcm*⁻*Hsd*⁻ metilációban mutáns törzsbe transzformáltuk. Ez a törzs a megfelelő enzimek hiányában nem képes a pSB51 plazmid metilációjára, így a *Streptomyces* törzsben lévő metilspecifikus restriktációs enzimek nem bontják le az idegen DNS-t. Ezzel nagyobb transzformációs hatásfokot érhetünk el, amit figyelembe kell venni a nehezen transzformálható *Streptomyces* törzsek esetében. A transzformánsokat 100 µgml⁻¹ ampicillin (Amp) és 20 µgml⁻¹ gentamycin (Gm) tartalmú agaros LB táptalajon szelektáltuk. Az Amp^R Gm^R telepekből plazmidot izoláltunk, majd a plazmid szerkezetét restriktációs emésztéssel ellenőriztük (17. ábra).

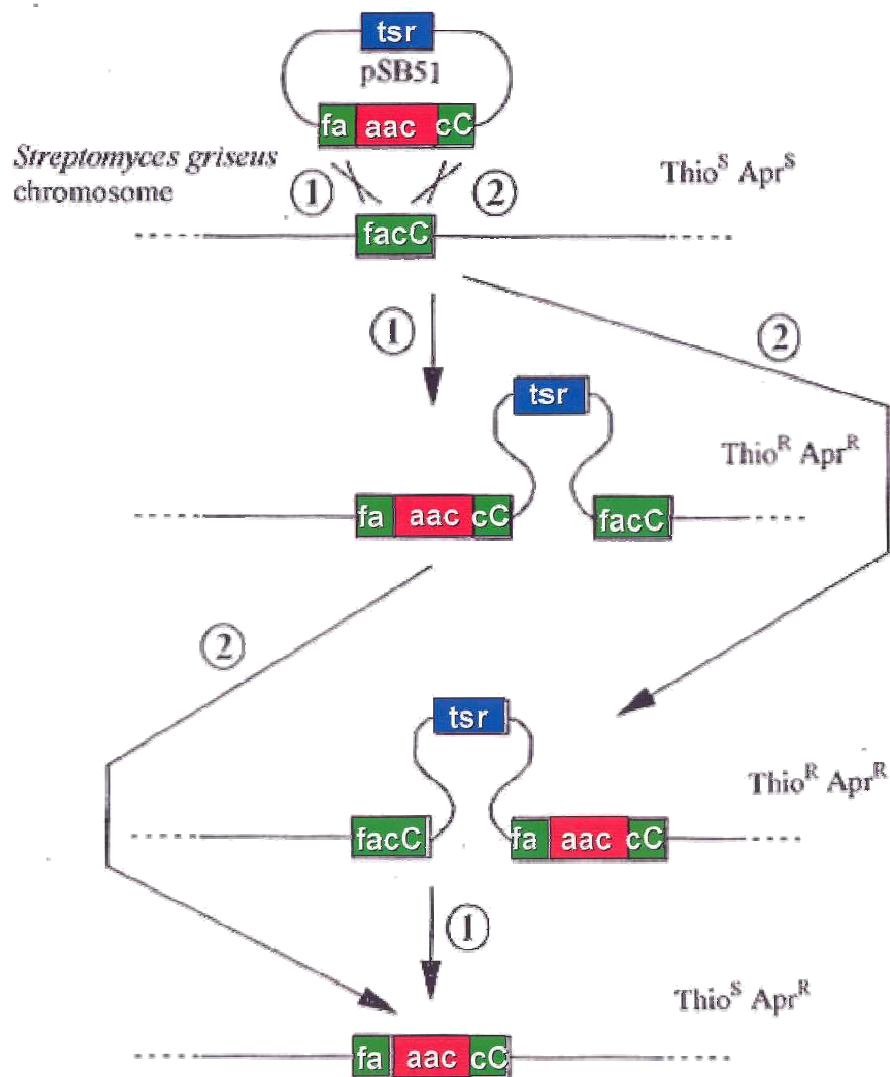


17. ábra A pSB51 plazmid *Kpn*I enzimmal emésztve 1%-os agaróz gélen.

M - GeneRuler™ 1 kb DNS molekulasúly marker (Fermentas); 1. pSB51 plazmid 7473 bp nagyságú lineáris fragment

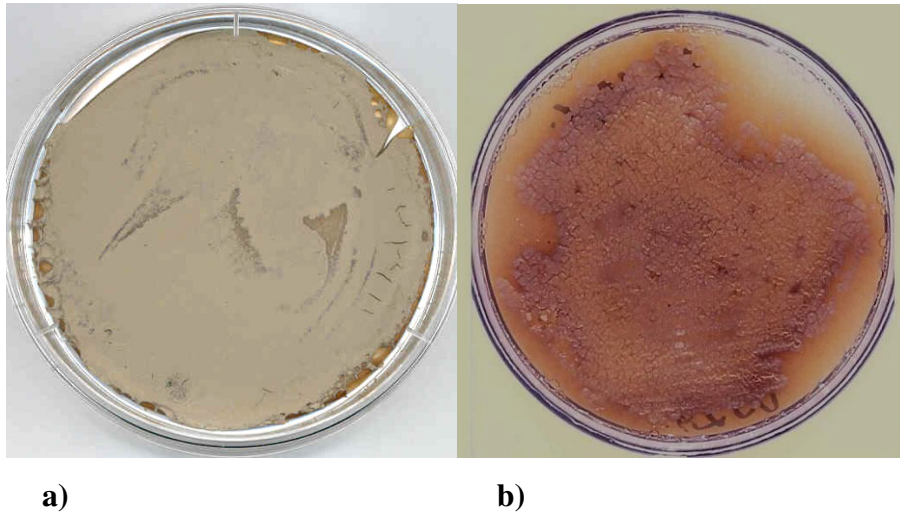
A pSB51 plazmid alkalmas a genomi gén helyettesítésére a *S. griseus* 45H törzsben, mivel tartalmazza az *aacC4* génkazettával megszakított C faktor gént, *Streptomyces* replikációs origó hiányában önálló replikációra nem képes, így csak akkor marad fenn, ha homológ módon integrálódik a genomba. A pSB51 plazmidot transzformáltuk a *S. griseus* 45H törzsbe. Az első crossing over eredményeként egy komplex DNS (ún. kointegrát) alakul ki, mely mind a plazmid, mind a kromoszómális DNS elemeit tartalmazza. Azok a telepek, melyekben ez a folyamat lezajlott, mind thiostreptonra, mind pedig apramycinre rezisztensek (Thio^RApr^R) lesznek, mivel a komplex DNS mindkét rezisztencia-markert tartalmazza. Ennek megfelelően a transzformánsokat tartalmazó R5 lemezeket a transzformálást követő napon thiostreptonnal felülrétegeztük, majd a thiostreptonra rezisztens (Thio^R) telepeket átvittük 50 µgml⁻¹ apramycin tartalmú R5-táptalajra, hogy így szelektáljuk a mindkét

antibiotikumra rezisztens (Thio^RApr^R) telepeket, melyekkel tovább dolgoztunk. Egy rövid ideig (egy-két generáción keresztül) növesztettük a telepeket az Apr tartalmú R5 táptalajon, amely idő elegendő arra, hogy - kis gyakorisággal - bekövetkezzen a második crossing over, aminek eredményeképpen a genomiális gén helyére kerül a megszakított gén a kromoszóma megfelelő, homológ régiójába. Ha ez megtörténik, a transzformánsok elvesztik Thio rezisztenciájukat, de Apr-re rezisztensek maradnak (Thio^SApr^R) és a C faktor gént inaktív formában tartalmazzák. A genomi gén helyettesítésének menete a 18. ábrán követhető nyomon:



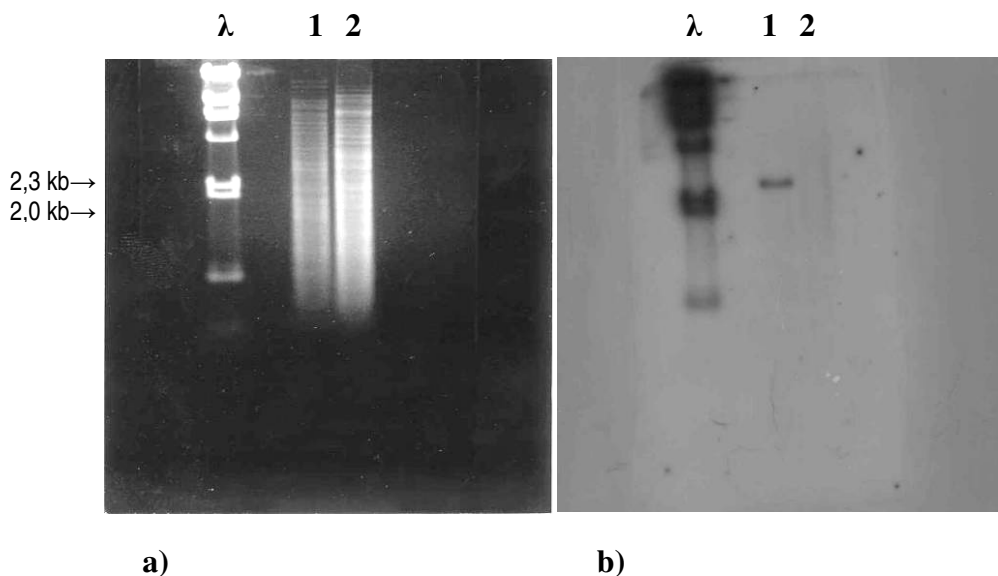
18. ábra A genomi gén helyettesítésének menete

Azt vártuk, hogy a kettős crossing over eredményeképpen a *S. griseus* 45H törzsben a differenciálódás valamely stádiuma zavart szenved. A pSB51 plazmid transzformálása után kapott Thio^SApr^R telepek fenotípusa várakozásunknak megfelelően alakult, a kopasz telepek sem légmicéliumot, sem spórát nem képeztek (19. ábra). A *bald* mutánst *S. griseus* 45H-B törzsnek neveztük el.



19. ábra A pSB51 plazmid transzformálásának eredménye. **a)** *S. griseus* 45H vad fenotípus, mely a működő C faktor gén következtében légmicéliumot és spórát is képez; **b)** *S. griseus* 45H-B *bald* fenotípus, mely a C faktor termelés hiányában sem légmicéliumot, sem spórát nem képez

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a *bald* mutánsokban valóban megtörtént-e a kettős crossing over és a kopasz fenotípus ennek eredményeképpen jött létre. Ennek igazolására Southern hibridizációt terveztünk. Mindkét törzs kromoszómális DNS-ét *Sac*II enzimmel emésztettük, próbaként a gén 860 bp hosszúságú, radioaktív foszforral [α^{32} -P]dCTP] jelölt *Eco*RV-*Sal*I fragmentjét használtuk (Birkó és mtsai, 1999). A próba hibridizációja a kromoszómális DNS homológ régiójához a *S. griseus* 45H törzs esetén történt meg, a *S. griseus* 45H-B törzs esetén nem (20. ábra).



20. ábra A Southern hibridizáció eredménye a *S. griseus* 45H és *S. griseus* 45H-B törzsekben. **a)** *Streptomyces* törzsek *SacII* enzimmel emésztett kromoszómális DNS-e 1%-os agaróz gélen; **b)** Southern hibridizáció eredménye
 λ : *HindIII* enzimmel emésztett λ fág DNS; 1. *S. griseus* 45H, 2. *S. griseus* 45H-B

A Southern hibridizációt megismételtük több, különböző transzformációból származó, egymástól függetlenül felszedett kopasz telepből izolált kromoszómális DNS-sel is és ugyanezt az eredményt kaptuk. Ebből arra következtetünk, hogy nem az általunk tervezett génmegszakítás és homológ rekombináció történt, hanem a gén egy jelentős része delécióra került és a *bald* fenotípus ennek eredménye. Feltételezve, hogy a kettős crossing over során a *SmaI* enzim hasítóhelytől (1765 bp) upstream irányban levő C faktor génrész került delécióra, akkor olyan kisméretű (25 bp) DNS szakasz maradt meg a próbával (860 bp hosszúságú, radioaktív foszforral [α^{32} -P]dCTP) jelölt *EcoRV-SalI* fragment) homológ részből, hogy azt a Southern hibridizáció nem detektálja (21. ábra). A megmaradt rész viszont tartalmazza az *aacC4* génkazettát, ami biztosítja a kopasz telepek Apr rezisztenciáját.

4.3. C faktor fehérjével homológ fehérjék keresése adatbázisokban

A C faktor esetében nem ismert, hogy mely regulációs kaszkád tagja, ezért adatbázisokban homológ géneket illetve fehérjéket kerestünk, amelyek funkciójából esetleg következtethetünk a C faktor hatásmechanizmusára. A C faktor gén klónozása és szekvenálása időpontjában a *Bacillus subtilis* TagC fehérjéje volt az egyetlen ismert homológ (29%), melynek funkciója a DNS károsodással indukálható DNS javításhoz kötődik (Mauël és mtsai, 1994); az utóbbi években azonban több *Streptomyces* törzs genomjának szekvenálása is befejeződött. 19 hozzáférhető, annotált vagy részlegesen annotált *Streptomyces* genom közül csak a *S. albus* J1074 (98% szekvencia azonosság aminosav szinten), *S. scabies* 87.22 (52%), *S. ambofaciens* (51%), *S. clavuligerus* (35%) és *Streptomyces sp.* Mg1 (27%) törzsekben fordul elő, míg a *S. coelicolor* A3(2), *S. avermitilis* MA-4680 és *S. griseus* IFO 13350 törzsben nem (23. ábra). 70 további hozzáférhető, részben vagy teljesen annotált *Actinomycetes* genomból (30 nemzetség, 56 faj) C faktor homológot mindössze kettőben találtunk: *Thermomonospora curvata* (52%) és *Stackebrandtia nassauensis* három (37%, 35% és 26%) homológgal.

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossz (aa)	Azonosság %	Hasonlóság %
1	Q9Z4K0_STRGR	C faktor, <i>Streptomyces griseus</i> (<i>Streptomyces albidoflavus</i>)	324	100	100
2	ZP 04703994	Teichoinsav bioszintézis fehérje C, <i>Streptomyces albus</i> J1074	336	98	98
3	A4FHG8_SACEN	Teichoinsav bioszintézis fehérjeC, <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 23338	332	54	68
4	A3KIF3_STRAM	Feltételezett C faktor, <i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	346	51	66
5	nem annotált	C faktor-szerű fehérje, <i>Streptomyces scabies</i>	325	52	65
6	B5GVY5_STRCL	Teichoinsav bioszintézis fehérje C, <i>Streptomyces clavuligerus</i> ATCC 27064	340	35	50
7	B4V276_9ACTO	Teichoinsav bioszintézis fehérje C, <i>Streptomyces sp.</i> Mg1	331	27	41

23. ábra *Streptomyces*ekben azonosított C faktor homológok

Találtunk C faktor homológokat alacsony G+C tartalmú Gram-pozitív baktériumokban, főleg *Staphylococcus aureus* törzsekben, *Lactobacillus* fajokban és ezek fágjaiban, ahol a homológok egy nagyobb fehérje egyik doménjét alkotják.

A bakteriális homológok mellett találtunk C faktor homológokat patogén fonalas gombákban is (24. ábra). Az *Aspergillus fumigatus* és *Neosartorya fisherii* törzsekben 2-2, kismértékben eltérő, s valószínűleg függetlenül felvett gén található. A C faktor homológok többszörös előfordulása a *Lactobacillus* fajokban is jellemző, azonban az itt található C faktor homológok azonosságának mértéke eltérő, s teljesen azonos nincs köztük. Megtalálható még többek között *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum* és *A. terreus* törzsekben is. Nincs ugyanakkor C faktor gén a részletesen tanulmányozott *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *A. nidulans*, *A. niger* és *Neurospora crassa* törzsekben. A gomba fehérjék (összesen 15 fehérje) általában jobban hasonlítanak az *Actinomycetes*-fonalas gomba csoport tagjaihoz, mint a bakteriális és fág fehérjékhez.

Sor-szám	UNIPROT azonosító	A fehérje neve és a termelő törzs	Hossz aa	Azonosság %	Hasonlóság %
1	Q4WZ07_ASPFU	C faktor-szerű extracelluláris szignálfehérje <i>Aspergillus fumigatus</i>	315	56	70
2	B0XZT7_ASPFC	C faktor-szerű extracelluláris szignálfehérje <i>Aspergillus fumigatus</i>	315	56	70
3	A1D5S9_NEOFI	Feltételezett fehérje <i>Neosartorya fisherii</i>	315	56	70
4	Q2GNH8_CHAGB	Feltételezett fehérje <i>Chaetomium globosum</i>	321	57	69
5	Q4WDT0_ASPFU	C faktor-szerű extracelluláris szignálfehérje <i>Aspergillus fumigatus</i>	310	50	63
6	B0Y182_ASPFC	C faktor-szerű extracelluláris szignálfehérje <i>Aspergillus fumigatus</i>	310	50	63
7	A1D0U9_NEOFI	Feltételezett fehérje <i>Neosartorya fisherii</i>	310	50	63
8	B6HVZ0_PENCW	Pc22g15320 fehérje <i>Penicillium chrysogenum</i>	312	48	61
9	Q0CRZ8_ASPTN	Feltételezett fehérje <i>Aspergillus terreus</i>	128	58	71

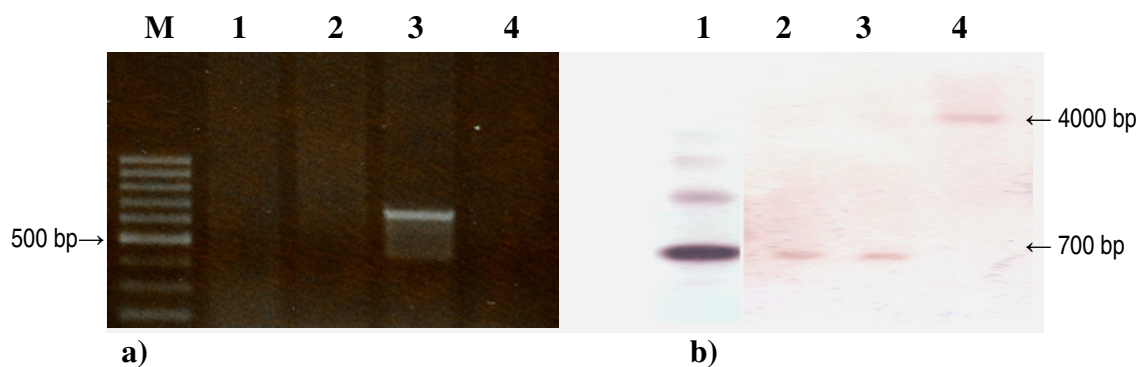
24. ábra Fonalas gombákban talált homológok (csak a legjellemzőbbek kerültek feltüntetésre)

4.4. A *nec1* nekrozis faktor gén jelenlétének vizsgálata a C faktort termelő törzsben

A C faktorra homológ géneket, illetve fehérjéket keresve a gén homológiát megtaláltuk a *Streptomyces*ek között ritkának számító növényi kórokozóban, a *S. scabies*ben, valamint több patogén fonalas gombában és fágban is. *S. scabies*ben a fertőzés kialakításában fontos szerepet játszik a patogenitási szigeten (PAI) elhelyezkedő *nec1* gén terméke a Nec1 nekrozis faktor. Mivel a *nec1* gén deléciója a fertőzőképesség megszűnésével jár (Joshi és mtsai, 2007) ugyanakkor nem-patogén *S. lividans* törzsbe klónozva, azt patogénné transzformálta (Bukhalid és Loria, 1997), megnéztük, hogy a gén jelen van-e az alábbi törzsekben: *S. griseus* 45H, *S. griseus* 45H-B, *S. griseus* 52-1 és *S. europaeiscabiei* CFBP4501. A *nec1* gén kimutatására PCR reakciót terveztünk, melyben a gén detektálására korábban leírt (Bukhalid és mtsai, 1998) paramétereket és primer párt [Nf (forward) 5'-ATGAGCGCGAACGGAAGCCCCGGA-3' és Nr (reverse) 5'-GCAGGTCGTCACGAA GGATCG-3'] alkalmaztuk.

A *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzs esetében amplifikálódott a várt kb. 718 bp nagyságú fragment, de a többi törzs esetében nem (25a. ábra). A PCR reakciót kétszer megismételtük, de ugyanezt az eredményt kaptuk. Ismeretes, hogy baktériumokban a PAI széleskörűen elterjedt, s hogy a különböző patogén törzsekben nagy fokban konzervált (Ritter és mtsai, 1995; Hacker és Carniel, 2001), mégis feltételeztük, hogy a filogenetikailag távolabbi *S. griseus* 45H törzsben a *nec1* szekvencia divergenciája lehet a negatív eredmény magyarázata. Ezért a *nec1* gén jelenlétét megvizsgáltuk Southern hibridizációval is. A *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzsben kapott PCR fragmentumot gélből izoláltuk, digoxigeninnel jelöltük (Roche DIG DNA labeling and detection kit), és ezt használtuk próbaként a Southern hibridizációban (25b. ábra).

Ezzel a módszerrel sikerült a gén jelenlétét kimutatni a *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzs mellett a *S. griseus* 45H és *S. griseus* 45H-B törzsekben, de a *S. griseus* 52-1 törzsben nem. Ez alapján azt feltételezzük, hogy a PAI, de legalábbis annak egy része, megtalálható a *S. griseus* 45H törzsben, ugyanakkor a C faktor gén deléciója (lásd 4.2. fejezet) ezt a régiót nem érintette.



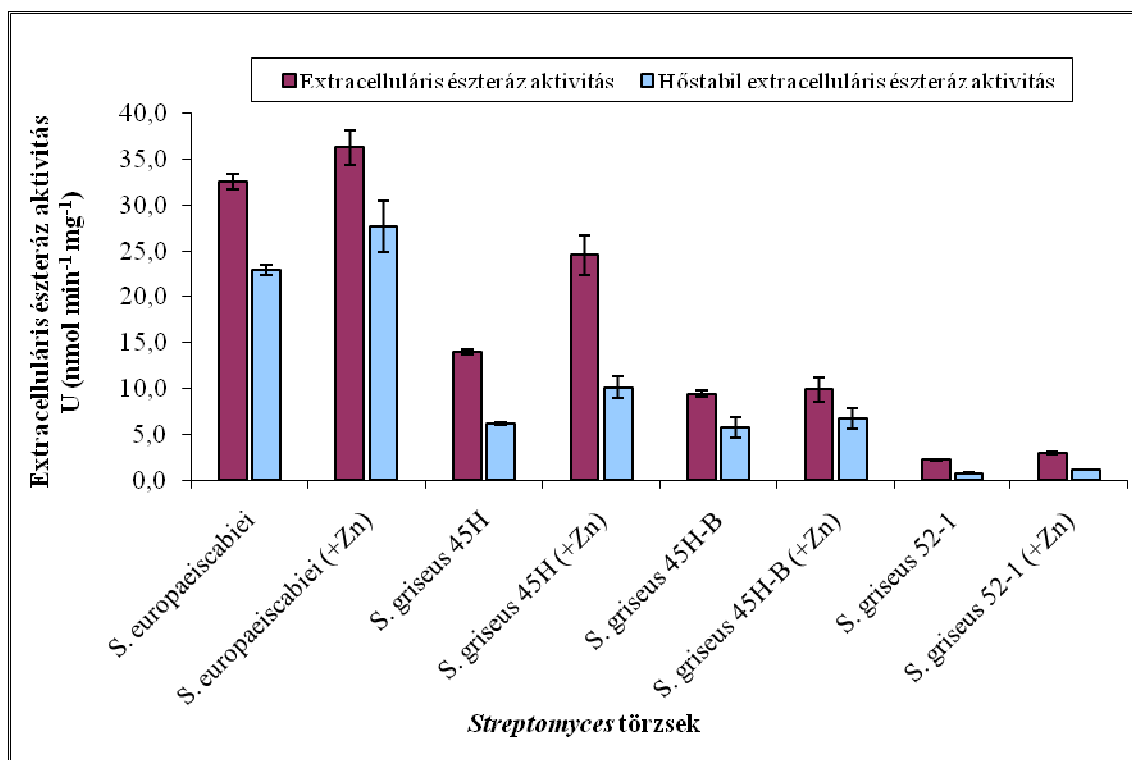
25. ábra A *necI* gén jelenlétének vizsgálata

a) A *necI* PCR reakció eredménye a vizsgált törzsekben. M - 100 bp DNS molekulasúly marker (Promega); 1. *S. griseus* 45H; 2. *S. griseus* 45H-B; 3. *S. europaeiscabiei* CFBP4501; 4. *S. griseus* 52-1.

b) Southern hibridizáció eredménye a vizsgált törzsekben; 1. A PCR amplifikált *S. europaeiscabiei* fragmentum, mint pozitív kontroll. 2. *S. griseus* 45H kromoszómális DNS, *SacII* emésztés; 3. *S. griseus* 45H-B kromoszómális DNS, *SacII* emésztés; 4. *S. europaeiscabiei* CFBP4501 kromoszómális DNS, *PstI* emésztés.

4.5. Az extracelluláris észteráz enzimaktivitás vizsgálata a C faktort termelő törzsben

A *S. scabies* fertőzőképességét több virulencia faktor koordinált együttműködése biztosítja, ezért vizsgáltuk, hogy a *S. griseus* 45H törzsben termelődik-e cinkkel aktiválható hőstabil extracelluláris észteráz. Mivel az enzim génje előtt lévő 23 bp nagyságú fehérjekötőhelyről megállapítottuk, hogy nagymértékben azonos az AdpA konszenzus kötőhellyel, a C faktor pedig szerepet játszik több, az A-faktor regulonba tartozó extracelluláris enzim szabályozásában, négy *Streptomyces* törzset - *S. griseus* 45H, *S. griseus* 45H-B, *S. griseus* 52-1, *S. europaeiscabiei* CFBP4501 - összehasonlítva vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a C faktor termelés és az enzimaktivitás között. Az enzimaktivitást az "Anyag és módszer" fejezet 3.3.8. szakaszában leírt módszer (McQueen és Schottel, 1987) szerint mértük és az alábbi eredményeket kaptuk (26. ábra):



26. ábra A vizsgált *Streptomyces* törzsek extracelluláris észteráz aktivitásának vizsgálata. A törzseket párhuzamosan tenyésztettük 2 μ M cinket tartalmazó illetve cinkmentes táptalajon. A hőstabil észteráz aktivitás mérése előtt a mintákat hőkezeltük (60 °C, 10 perc). A PNB hidrolízisét spektrofotométerrel mértük. A diagramon a szórásstartományok is feltüntetésre kerültek.

Az észteráz aktivitás vizsgálata során először az egyes törzsek teljes extracelluláris észteráz aktivitását mértük, majd ezt követően mértük a hőstabil és cinkkel indukálható észteráz aktivitást. Az észteráz aktivitás a *S. europaeiscabiei* CFBP4501 és *S. griseus* 45H törzsekben magas, illetve közepes mértékű volt, mely mindkét törzsben hőstabilnak bizonyult és cinkkel indukálható volt. A *S. griseus* 45H-B törzs esetében alacsony, kevésbé hőstabil és cinkkel kisebb mértékben indukálható enzimaktivitást mértünk. A *S. griseus* 45H törzs teljes észteráz aktivitása jelentősen nagyobb volt, mint a *S. griseus* 45H-B törzs észteráz aktivitása, azonban a mutáns törzs esetében valamivel kisebb mértékben csökkent az aktivitás a hőkezelést követően. A *S. griseus* 52-1 törzs esetében nagyon alacsony, hőre inaktiválódó és cinkkel nem indukálható enzimaktivitást mértünk. A mért különbségek szignifikánsak voltak ($p=0,05$), ezért valószínű, hogy a *S. griseus* 45H törzs termel egy, a *S. scabies*-re jellemző hőstabil, cinkkel indukálható extracelluláris észterázt, melynek szabályozásában a C faktor szerepet játszik. Mivel a C faktor null mutánsban nem szűnt meg a cinkkel indukálható hőstabil észteráz aktivitás, feltételezzük, hogy a C faktor gén deléciója az észteráz gént nem érintette, azonban a C faktor fehérje hiánya az észteráz gén expressziójára hatással van.

4.6. A C faktort termelő törzs vizsgálata növényi kórokozóként

A virulencia faktorok vizsgálatát követően teszteltük a *S. griseus* 45H törzs fertőzőképességét, összehasonlítva a *S. griseus* 45H-B, *S. griseus* 52-1, *S. europaeiscabiei* CFBP4501 fertőzőképességével. A *S. scabies* okozza a burgonya (*Solanum tuberosum* L.) közönséges - ún. "sugárgombás" - varasodását, ezért a fertőzőképességet három különböző, szabadföldi termesztésben is használt burgonyafajtán teszteltük, melyek az Európai Burgonyafajták Adatbázisából (The European Cultivated Potato Database; <http://www.europotato.org>) elérhető információk alapján eltérő érzékenységgel rendelkeznek a fertőzéssel szemben: a Cleopatra nagymértékben, a Desiree közepesen érzékeny, a Rebeka pedig rezisztens a fertőzésre. A tesztben a burgonyafajták *in vitro* tenyésztett mikrogumóit használtuk (27. ábra).



27. ábra Burgonya mikrogumók 17 hetes *in vitro* tenyésztést követően (Desiree fajta)

A mikrogumók alkalmazásának előnye a szabadföldi termesztésben használt normál gumókhoz képest, hogy a steril és ellenőrzött tenyésztési körülményeknek köszönhetően kórokozó-mentesek, hosszú ideig tárolhatók, könnyen szállíthatók, valamint az *in vitro* körülmények közül kikerülve (pl. üvegházi kiültetés során) az új környezeti feltételekhez könnyen alkalmazkodnak. A mikrogumókat elsősorban vírusmentes szaporítóanyag előállításához használják fel.

A burgonya mikrogumókon megjelent tünetek alapján öt betegségfokozatot különböztettünk meg (28. ábra) és ezek alapján betegségindexet (Bi) számoltunk.

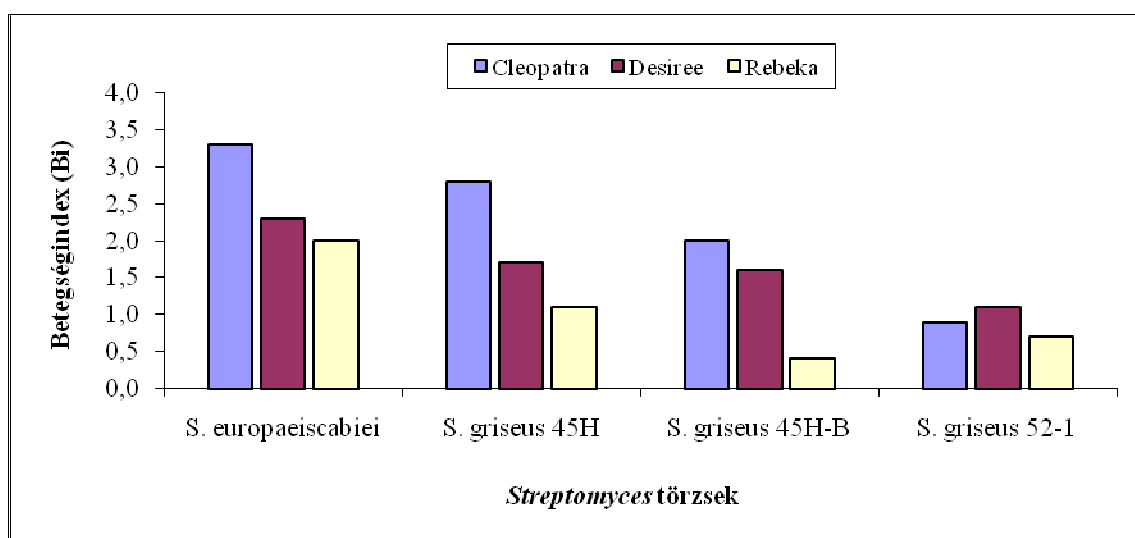


a) b) c) d) e)

28. ábra A mikrogumókon megjelent tünetek alapján elkülönített betegségfokozatok.

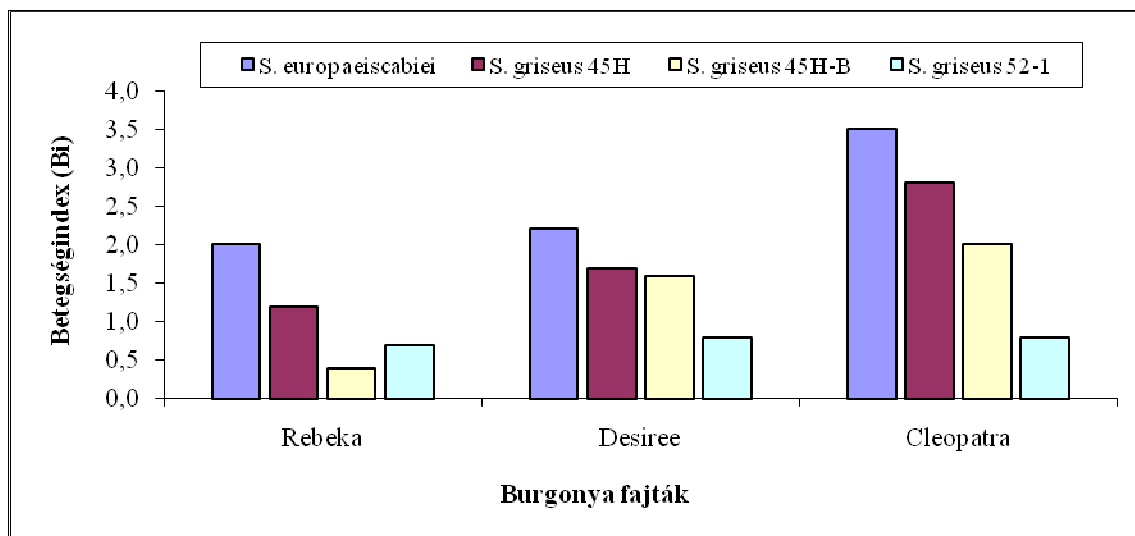
a) tünetmentes (0 pont); **b)** fehér foltok, telepek a lenticellák körül (1 pont); **c)** barna foltok, kezdődő varasodás a lenticellák körül (2 pont); **d)** kiterjedt varasodás az egész gumó felületén (3 pont); **e)** kiterjedt varasodás, rothadás (4 pont).

A vizsgált törzsekre és a vizsgált burgonyafajtákra jellemző betegségindexet (Bi) a mikrogumókon megjelent tünetek alapján számoltuk ki. A betegségindex (Bi) alapján a vizsgált *Streptomyces* törzseket az alábbi csoportokba soroltuk: a) nem fertőzőképes ($Bi < 1$), b) mérsékelten fertőzőképes ($1 \leq Bi \leq 2$), c) nagymértékben fertőzőképes ($Bi > 2$). Az átlagos Bi alapján a legfertőzőképesebb a *S. europaeiscabiei* ($Bi = 2,53$), mérsékelten fertőzőképes a *S. griseus* 45H ($Bi = 1,87$) és a *S. griseus* 45H-B ($Bi = 1,33$), a *S. griseus* 52-1 ($Bi = 0,9$) pedig nem fertőzőképes. A *S. europaeiscabiei* mindegyik burgonyafajta esetében okozott kiterjedt varasodást, míg a *S. griseus* 52-1 egyik esetben sem. A *S. griseus* 45H nagyfokú varasodást okozott a Cleopatra, és közepes mértékűt a Desiree és Rebeka esetében. A *S. griseus* 45H-B a Cleopatra és Desiree esetében közepes varasodást okozott, míg a Rebeka esetében nem okozott megbetegedést (29. ábra).



29. ábra A vizsgált *Streptomyces* törzsek fertőzőképességének összehasonlítása

A betegségindex (Bi) alapján a vizsgált burgonyafajtákat az alábbi csoportokba soroltuk: a) fertőzésnek ellenálló ($Bi < 1$), b) fertőzésre mérsékelten érzékeny ($1 \leq Bi \leq 2$), c) fertőzésre nagymértékben fogékony ($Bi > 2$). Az átlagos Bi alapján a burgonyafajták között különbség volt a fertőzésre való fogékonyságban, ugyanis a legérzékenyebbek a Cleopatra ($Bi=2,3$), míg a legkevésbé érzékenynek a Rebeka bizonyult ($Bi=1,1$), a Desiree pedig a kettő között volt ($Bi=1,6$) és mindkettőtől szignifikánsan eltért (30. ábra). Ez az eredmény megegyezik az Európai Burgonyafajták Adatbázisában a burgonyafajták érzékenységeire vonatkozó adatokkal.



30. ábra A vizsgált burgonyafajták érzékenysége a *Streptomyces* fertőzéssel szemben

Valószínű, hogy a *S. griseus* 45H ($Bi=1,87$) és *S. griseus* 45H-B ($Bi=1,33$) törzsek fertőzőképessége közötti különbség összefüggésben van a C faktor gén deléciójával, aminek következtében a patogenitásban szerepet játszó extracelluláris észteráz szintje is csökkent a null mutánsban.

5. MEGBESZÉLÉS

A genetika egyik alapvető feladata annak tanulmányozása, hogy az egyedfejlődés különböző szakaszaiban kialakuló struktúrák és funkciók milyen szabályozó mechanizmusok kölcsönhatása következtében jönnek létre. A *Streptomyces*ek bár egyszerű, prokarióta szervezetek, de komplex növekedési és differenciálódási folyamataik, illetve extracelluláris szabályozó mechanizmusaik révén kiváló modelljei a sejtdifferenciálódás tanulmányozásának. A *Streptomyces*ek vizsgálatát az is indokolja, hogy komplex életciklusuk nagyszámú szekunder metabolit (pl. antibiotikumok, ipari enzimek) termelésével jár együtt. A differenciálódás és a szekunder metabolit termelés szabályozásában, valamint a sejtek közötti kommunikációban a változatos szerkezetű ún. pleiotróp hatású autoregulátorok játszanak fontos szerepet.

Munkám során az alábbiakat tűztem ki célul:

1. A *S. griseus* 45H törzs eredetének és taxonómiai besorolásának tisztázása 16S riboszómális RNS génszekvencia analízis és Southern hibridizáció segítségével.
2. A *S. griseus* 45H törzs C faktort nem termelő mutánsának létrehozása, melynek fenotípusából következtetni tudunk a fehérje differenciálódásban betöltött szerepére.
3. Adatbázisokban C faktorra homológ gének illetve fehérjék keresése, amelynek eredményéből esetleg következtethetünk a C faktor hatásmechanizmusára.
4. A C faktor homológja megtalálható a növényi kórokozóként ismert *S. scabies*ben, melynek fertőzőképességét több virulencia faktor együttes működése biztosítja, ezért annak kiderítése, hogy megtalálható-e a *S. griseus* 45H törzsben a Nec1 nekrozis faktor génje, illetve termelődik-e a kizárólag patogén *S. scabies* törzsekre jellemző és a növényi sejttel degradációjában szerepet játszó hőstabil extracelluláris észteráz. Különböző *Streptomyces* törzseket - köztük a *S. griseus* 45H törzs differenciálódási mutánsát - vizsgálva arra is szeretnénk volna választ kapni, hogy a virulencia faktorok, különösen az extracelluláris észteráz, állhatnak-e a C faktor regulációja alatt.
5. A virulencia faktorok vizsgálatát követően a *S. griseus* 45H törzs fertőzőképességének tesztelése burgonya mikrogumókon összehasonlítva azon törzsek fertőzőképességével, melyekben vizsgáltuk a virulencia faktorok jelenlétét.

A bakteriális differenciálódással kapcsolatos kutatások Tanszékünkön az 1960-as években kezdődtek. A *S. griseus* 45H törzs fermentlevében sikerült egy olyan anyagot - a fehérje természetű C faktort - találni, amely egyaránt befolyásolja a morfológiai differenciálódást és a szekunder metabolit termelést (Szabó és mtsai, 1961; Szabó és mtsai, 1962). A *S. griseus* 45H törzsnek szilárd és folyékony táptalajon is spóráképzéssel végződő teljes életciklusa van, míg a C faktor hatásának tesztelésére választott *S. griseus* 52-1 törzs differenciálódása folyékony tenyészetben elakad, sem reproduktív hifákat, sem spórát nem képez. Ha a tisztított fehérjét a *S. griseus* 52-1 törzs 16 óránál nem idősebb szűrt szójás folyékony tenyészetéhez adták, akkor már 0,5 ng ml⁻¹ koncentrációban reproduktív elemek képződését indukálta (Birkó és mtsai, 1999).

A C faktor kutatással kapcsolatos első közlések szerint a C faktort termelő *S. griseus* 45H törzset a *S. griseus* 52-1 törzshöz kapcsolódó mutagenézis program keretében izolálták, de a két törzs közötti rokonság és a *S. griseus* 45H törzs taxonómiai besorolása az eltérő morfológiai differenciálódás, az eltérő szénforrás hasznosítás és a DNS-DNS filterhibridizáció eredménye (Szabó és mtsai, 1960; Szabó és mtsai, 1961, Fehér és Szabó, 1978) miatt kérdéses volt számunkra. A C faktor génjének klónozását követően egyértelművé vált, hogy a 45H jelű törzs nem lehet az 52-1 jelű törzs „leszármazottja”, mivel Southern hibridizációval nem sikerült a gént a „szülői”-nek tartott törzsben kimutatni (Birkó és mtsai, 1999). Tekintettel arra, hogy a *S. griseus* 45H törzs izolálásakor többek között egy flavofungint termelő *S. flavofungini* törzsszel is dolgoztak ugyanabban a laboratóriumban és a két törzsnek nagyon hasonló a restrikciós mintázata, felvetődött annak lehetősége, hogy a *S. griseus* 45H törzs egy véletlen laboratóriumi kontamináció és taxonómiai besorolását tekintve valójában *S. flavofungini*. A *S. griseus* 45H törzs eredetének és taxonómiai besorolásának kérdését a fenti három törzsből származó 16S rRNS gén szekvencia összehasonlításával kívántuk tisztázni és az eredményt Southern hibridizáció segítségével terveztük megerősíteni.

A 16S rRNS génszekvencia analízissel kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a *S. griseus* 52-1 törzs valóban *S. griseus*, ugyanakkor a *S. griseus* 45H és *S. flavofungini* törzsek 16S rRNS génszekvenciái megegyeznek és azonosak a *S. albidoflavus* csoport szekvenciáival. Southern hibridizációval a C faktor gént négy vizsgált *S. albidoflavus* törzs közül csak háromban sikerült detektálni. Az a törzs, amelyben nem sikerült a C faktor gén kimutatni, relative távoli rokona a csoport

tagjainak, ami alapján valószínűsíthető a C faktor gén specifikus előfordulása a *S. albidoflavus* csoportban.

Eredményeink igazolják azt a korábbi feltételezést, hogy a C faktort termelő törzs nem a *S. griseus* 52-1 jelű, streptomycint termelő törzs mutánsa, hanem azonos az ugyanabban az időszakban, ugyanabban a laboratóriumban tanulmányozott flavofungint termelő *S. flavofungini* törzsszel (Úri és Békési, 1958), melyet véletlen laboratóriumi kontaminációként izoláltak. A 16S rRNS génszekvencia analízis és a Southern hibridizáció eredménye alapján a C faktort termelő törzs elnevezését *S. albidoflavus* 45H-ra javasoltuk megváltoztatni.

A következő kísérletben arra kerestük a választ, hogy a C faktor az életciklus mely lépéseit szabályozza a *S. griseus* 45H törzsben és mennyire esszenciális a fehérje a törzs differenciálódásának szabályozásában. Ennek vizsgálatához létre kellett hoznunk a törzs C faktort nem termelő mutánsát, melynek fenotípusából következtetni tudunk a fehérje differenciálódásban betöltött szerepére. *In vitro* kísérletsorozatban terveztük a C faktor gén inzerációs inaktiválását, amihez a pSGF4 (Birkó és mtsai, 1999) és pHP45 Ω aac (Blondelet-Rouault és mtsai, 1997) plazmidokat használtuk. A génmegszakítás és az inaktivált gént tartalmazó plazmidok szelektálása *E. coli*-ban történt, majd az így előállított pSB51 plazmidot transzformáltuk a *S. griseus* 45H törzsbe. A pSB51 plazmid tartalmazza az *aacC4* génkazettával megszakított C faktor gént és a *S. griseus* 45H törzsben csak akkor marad fenn, ha homológ rekombinációval integrálódik a genomba. Azt vártuk, hogy a kettős crossing over eredményeképpen a *S. griseus* 45H törzsben a differenciálódás valamely stádiuma zavart szenved. A pSB51 plazmid transzformálása után kapott Thio^SApr^R telepek fenotípusa várakozásunknak megfelelően alakult, a kopasz (*bald*) telepek sem légmicéliumot, sem spórát nem képeztek. Így fenotípusosan igazolni láttuk, hogy a C faktor gén jelenléte illetve a fehérje termelődése esszenciális a differenciálódás szabályozásában. A *bald* mutánst *S. griseus* 45H-B törzsnek neveztük el.

Ezután következett annak vizsgálata, hogy a kapott *bald* mutánsok valóban a C faktor gén inaktív formáját tartalmazzák-e, s a differenciálódásban bekövetkezett zavar ennek eredménye. Ennek eldöntésére Southern hibridizációt terveztünk. A hibridizációban egy olyan radioaktívan jelölt próbát használtunk, mely a C faktor gén kódoló szekvenciájának 80%-át lefedi. Az előhívás után egy számunkra meglepő eredményt kaptunk. A jelölt próba hibridizációja a kromoszómális DNS megfelelő

régiójához csak a *S. griseus* 45H törzs esetén történt meg, a mutánsból származó DNS esetén nem. Ebből arra következtettünk, hogy nem az általunk tervezett génmegszakítás és kettős crossing over történt, hanem a teljes gén vagy annak egy jelentős része delécióra került. A Southern hibridizációt megismételtük több, különböző transzformációból származó, függetlenül felszedett kopasz telepből izolált kromoszómális DNS-sel is és ugyanezt az eredményt kaptuk. A lineáris szerkezetű *Streptomyces* kromoszómára jellemző az instabilitás, gyakran fordulnak elő különböző strukturális változások (spontán deléciók, rekombináció, stb.) Ez a strukturális instabilitás kapcsolatban lehet a *Streptomyces* evolúciójával (Chen és mtsai, 2002; Chater és Chandra, 2006). Deléció gyakran fordul elő a kromoszóma terminális régióiban. A *S. scabies*ben illetve *S. ambofaciens*ben talált C faktorra homológ gének a kromoszóma terminális régiójában helyezkednek el. Feltételezzük, hogy a C faktor gén hasonlóan helyezkedik el a *S. griseus* 45H törzsben és a transzformációval indukálódott a gént hordozó kromoszómadarab deléciója.

Ismert, hogy a C faktor képes komplementálni a *bald* mutációt olyan *Streptomyces* törzsek esetében, melyek nem tartalmazzak C faktorra homológ gént (Birkó és mtsai, 1999), ezért pSGF4 plazmidon klónozva transzformáltuk a gént a *S. griseus* 45H-B *bald* mutánsba és a transzformálás eredményeként mind a légmicéliumképzés, mind a sporuláció helyreállt.

Összeségében megállapíthatjuk, hogy bár a kopasz fenotípus nem génmegszakítás, hanem géndeléció eredménye, ez nem befolyásolja azt a tényt, hogy a C faktor esszenciális a termelő törzs differenciálódásának szabályozásában és a fehérje hiánya mind a légmicélium-, mind pedig a spóráképzésre hatással van.

A C faktor esetében nem ismert, hogy mely regulációs kaszkád tagja, ezért adatbázisokban homológ géneket illetve fehérjéket kerestünk, amelyek funkciójából esetleg következtethetünk a C faktor hatásmechanizmusára. C faktor homológok előfordulása *Streptomyces*ekben sporadikus, a gén homológját az elérhető, annotált vagy részlegesen annotált *Streptomyces* genomok közül csak néhányban találtuk meg. A sporadikus előfordulás arra utal, hogy *Streptomyces*ekben a gén horizontális géntranszferrel terjedhetett el. A *S. albus*ban talált 98%-os szekvencia azonosság és az a tény, hogy *S. griseus*ban nem fordul elő, alátámasztja a C faktort termelő törzs taxonómiai átsorolását, valamint arra enged következtetni, hogy a C faktor génnek lehet valamilyen még nem ismert, specifikus funkciója a *S. albidoflavus* csoportban.

Találtunk még C faktor homológokat *Staphylococcus aureus* törzsekben, *Lactobacillus* fajokban és ezek fágjaiban, valamint több fonalas gombában is, melyek többsége patogén tulajdonságokkal rendelkezik.

A C faktor domén szekvencia alapján megszerkeszthető az ún. filogenetikai fa - hasonlóan, mint azt a 16S rRNS génszekvenciák esetében is tettük -, amelyből levezethető a C faktor feltételezett evolúciója (Chater és mtsai, 2010). Ebben a filogenetikai rendszerben a fágokban megtalálható C faktor homológok egymáshoz közeli csoportokba vannak összerendezve és ettől jól elkülönülő csoportba tartoznak a bakteriális ill. fonalas gombákból származó szekvenciák. A *Streptomyces* szekvenciák a két csoport között találhatók. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a C faktor evolúciója valószínűleg fágokban zajlott le, és a fágok között illetve a baktériumokba és fonalas gombákba laterális géntranszferrel terjedt el. A gombákba való átkerülésére magyarázat lehet a *Streptomyces*ek és fonalas gombák azonos élőhelye, ahol gyakran kerülnek egymás DNS-vel kapcsolatba és így a C faktor gén könnyen felvételre kerülhetett. Ebben szerepük lehetett bizonyos DNS felvételt stimuláló faktoroknak (DUSF – DNA Uptake Stimulating Factor), melyek megkönnyítik a DNS ill. oligonukleotidok felvételét a környezetből és ilyen faktorok jelenlétét *Neurospora crassa*-ban már sikerült kimutatni (Tóth és Szabó, 1991).

A C faktoralal homológ géneket, illetve fehérjéket keresve a gén homológiát megtaláltuk a *Streptomyces*ek között ritkának számító növényi kórokozóban, a burgonya és más gumós növények közönséges (ún. „sugárgombás”) varasodását okozó *S. scabies*ben is, melynek fertőzőképességét több virulencia faktor - thaxtomin, extracelluláris enzimek, nekrosis faktor - koordinált együttműködése biztosítja. Vizsgáltuk, hogy a *S. griseus* 45H törzsben termelődik-e hőstabil extracelluláris észteráz illetve megtalálható-e ebben a törzsben a Nec1 nekrosis faktor génje.

A burgonyagumók fertőzéséhez a baktériumsejteknek át kell jutniuk a gumók felületét borító külső védőrétegen, melyet a sejtfalba rakódó szuberin tesz ellenállóvá a fertőzésekkel szemben. A gumó külső védőrétegének degradációját különböző hidrolitikus enzimek végzik (Kolattukudy, 1985). Ez lehet a funkciója a kizárólag patogén *S. scabies* törzsekben kimutatott hőstabil extracelluláris észteráznak is (McQueen és Schottel, 1987; Schottel és mtsai, 1992). Az enzimnek cink az aktivátora és génje előtt egy 23 bp nagyságú fehérjekötőhely található (Babcock és mtsai, 1992). Mivel erről a fehérjekötőhelyről megállapítottuk, hogy nagymértékben azonos az AdpA

konszenzus kötőhellyel, a C faktor pedig szerepet játszik több, az A-faktor regulonba tartozó extracelluláris enzim szabályozásában, melyek többségében cink kofaktorral működnek, négy *Streptomyces* törzset - *S. griseus* 45H, *S. griseus* 45H-B, *S. griseus* 52-1, *S. europaeiscabiei* CFBP4501 – összehasonlítva vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a C faktor termelés és az enzimaktivitás között. A *S. europaeiscabiei* CFBP4501 egy ismert burgonyapatogén és franciaországi szabadföldi termesztésben lévő burgonyagumókról izolálták (Bouчек-Mechiche és mtsai, 2000). Az enzim természetes szubsztrátja a para vagy szuberin, ezt a kísérletben p-nitrofenil-butiráttal (PNB) helyettesítettük. Az enzimaktivitást párhuzamosan mértük hőkezelt (60 °C, 10 perc, mely a nem hőstabil észteráz aktivitást megszünteti) és nem hőkezelt mintákban. Az észteráz aktivitás a *S. europaeiscabiei* CFBP4501 és *S. griseus* 45H törzsekben magas, illetve közepes mértékű volt és mindkét törzsben hőstabilnak bizonyult illetve cinkkel indukálható volt. A *S. griseus* 45H-B törzsben alacsony, kevésbé hőstabil és cinkkel kisebb mértékben indukálható enzimaktivitást, míg a *S. griseus* 52-1 törzsben nagyon alacsony, hőre inaktiválódó és cinkkel nem indukálható enzimaktivitást mértünk.

Az eredményekből arra következtetünk, hogy a *S. griseus* 45H törzs termel egy, a *S. scabies*-re jellemző hőstabil, cinkkel indukálható extracelluláris észterázt, amelynek szabályozásában a C faktor szerepet játszik. Mivel a C faktor null mutánsban nem szűnt meg a cinkkel indukálható észteráz aktivitás, feltételezzük, hogy a C faktor gén deléciója az észteráz gént nem érintette, azonban a C faktor fehérje hiánya az észteráz gén expressziójára hatással van.

S. scabies-ben a fertőzés kialakításában fontos szerepet játszik a patogenitási szigeten (PAI) elhelyezkedő *nec1* gén terméke a Nec1 nekrozis faktor is. Baktériumokban a PAI széleskörűen elterjedt és a különböző patogén törzsekben nagy fokban konzervált (Ritter és mtsai, 1995; Hacker és Carniel, 2001). A *nec1* gén esszenciális a fertőzőképesség szempontjából, mivel deléciója a fertőzőképesség megszűnésével jár (Joshi és mtsai, 2007). A PAI horizontális géntranszferrel terjedhetett a különböző *Streptomyces*-ek között. Az extracelluláris észteráz termeléssel párhuzamosan megnéztük, hogy a *nec1* gén jelen van-e az általunk vizsgált törzsekben. A gént PCR reakcióval csak a *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzsben sikerült kimutatnunk. Feltételeztük, hogy a filogenetikailag távolabbi *S. griseus* 45H törzsben a *nec1* szekvencia divergenciája lehet a negatív eredmény magyarázata, ezért a gén jelenlétét megvizsgáltuk Southern hibridizációval is, melyben a *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzsben kapott PCR fragmentumot használtuk próbaként. Ezzel a

módszerrel sikerült a *nec1* gén jelenlétét kimutatni a *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzs mellett a *S. griseus* 45H és *S. griseus* 45H-B törzsekben is, de a *S. griseus* 52-1 törzsben nem. Ez alapján azt feltételezzük, hogy a PAI, de legalábbis annak egy része, megtalálható a *S. griseus* 45H törzsben, ugyanakkor a C faktor gén deléciója (lásd 4.2. fejezet) ezt a régiót nem érintette.

A virulencia faktorok vizsgálatát követően teszteltük a *S. griseus* 45H törzs fertőzőképességét, összehasonlítva a *S. griseus* 45H-B, *S. griseus* 52-1 és *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzsek fertőzőképességével. A patogenitási teszthez három különböző, a nagyüzemi termesztésben is alkalmazott burgonyafajta mikrogumóit használtuk. A burgonya mikrogumókon megjelent tünetek alapján öt betegségfokozatot különböztettünk meg és ezek alapján betegségindexet (Bi) számoltunk.

Az átlagos Bi alapján a Cleopatra a fertőzésre nagymértékben fogékonnak, s Desiree mérsékelten érzékenynek, a Rebeka pedig fertőzésnek ellenállónak bizonyult. Ez az irodalmi adatokkal megegyező eredmény.

Az átlagos Bi alapján a *S. europaeiscabiei* CFBP4501 törzs bizonyult a legfertőzőképesebbnek, a *S. griseus* 45H és a *S. griseus* 45H-B törzsek közepes fertőzőképességet mutattak, míg a *S. griseus* 52-1 gyakorlatilag nem volt fertőzőképes. A *S. europaeiscabiei* CFBP4501 mindegyik burgonyafajta esetében okozott az egész gumóra kiterjedő varasodást, míg a *S. griseus* 52-1 egyik esetben sem. A *S. griseus* 45H nagyfokú varasodást okozott a Cleopatra, és közepes mértékűt a Desiree és Rebeka esetében. A *S. griseus* 45H-B a Cleopatra és Desiree esetében közepes mértékű varasodást okozott, míg a Rebeka esetében nem okozott megbetegedést.

A patogenitási tesztben kapott eredmény összhangban van a különböző törzsekben mért extracelluláris észteráz aktivitással és a nekrosis faktor génjének előfordulásával. Valószínű, hogy a *S. griseus* 45H és 45H-B törzsek fertőzőképessége közötti különbség összefüggésben van a C faktor gén deléciójával, aminek következtében a patogenításban szerepet játszó extracelluláris észteráz szintje csökkent a null mutánsban.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az C faktor fehérjét, mint extracelluláris szignálmolekulát illetve a morfológiai differenciálódásban és szekunder metabolit termelésben betöltött szerepét régóta tanulmányozzák. Mivel a fehérjét termelő *S. griseus* 45H törzs eredete kérdéses volt számunkra, megpróbáltuk tisztázni a törzs pontos taxonómiai besorolását. Eredményeink alapján valószínűsítjük, hogy a *S. griseus* 45H törzset az ugyanabban a laboratóriumban vizsgált *S. flavofungini* törzs kontaminációjaként izolálták. A 16S rRNS génszekvenciák összehasonlítása és a Southern hibridizáció eredménye alapján a *S. griseus* 45H és *S. flavofungini* törzsek teljesen megegyeznek és a *S. albidoflavus* csoportba tartoznak. Ezért a *S. griseus* 45H törzs elnevezését *S. albidoflavus* 45H-ra változtattuk meg.

A *S. griseus* 45H törzs jól spórázik szilárd és folyékony táptalajon is, ezért a törzs C faktort nem termelő mutánsán keresztül vizsgáltuk, hogy a C faktor az életciklus mely lépéseit szabályozza. A C faktor null mutáns létrehozásához megterveztük a C faktor gén *in vitro* inaktiválását, és azt vártuk, hogy az inaktivált gén homológ rekombinációval a kromoszómán lévő C faktor gén helyére kerül. A feltételezett „rekombinációs” mutánsok várákozásunknak megfelelően kopasz fenotípust mutattak, ugyanakkor a Southern hibridizációt követően kiderült, hogy a homológ rekombinációval összefüggésben valószínűleg kromoszóma átrendeződés történt, ami a C faktor gén delécióját eredményezte. A deléció nem ritka az instabil lineáris kromoszóma terminális régiójában, így a C faktor gén hasonló kromoszómális lokalizációja magyarázat lehet a bekövetkezett delécióra. A létrejött kopasz fenotípus, melyet a klónozott és plazmidon bejuttatott C faktor gén helyreállított, megerősíti, hogy a C faktor kulcsszerepet játszik a differenciálódás szabályozásában.

A C faktor gén homológja megtalálható a legismertebb növényi kórokozóban, a *S. scabies*ben, mely a burgonyagumók közösleges varasodását okozza. A *nec1* gént használtuk a PAI jelenlétének vizsgálatára, mely felelős a különböző *Streptomyces* törzsek patogenitásáért. PCR reakcióval és Southern hibridizációval kimutattuk a *nec1* gént a *S. europaeiscabiei* CFBP4501, *S. griseus* 45H és 45H-B törzsekben, de nem volt jelen a *S. griseus* 52-1 törzsben. Valószínű, hogy a null mutánsban a C faktor génnel együtt további DNS szakaszok is delécióra kerültek, ugyanakkor a PAI-hoz tartozó DNS egy része, melyen a *nec1* gén is található, megmaradt.

Szoros összefüggést találtunk a cinkkel indukálható, hőstabil extracelluláris észteráz termelése és a törzsek fertőzőképessége között. A C faktor null mutánsban csökkent a cinkkel indukálható észteráz szintje, ami alapján feltételezzük, hogy az extracelluláris észteráz termelés szabályozásában a C faktor szerepet játszik. Mivel a null mutánsban nem szűnt meg az észteráz aktivitás, arra következtetünk, hogy a C faktor gén deléciója az észteráz gént nem érintette. Figyelembe véve a C faktor lehetséges szerepét az A-faktor regulonba tartozó extracelluláris enzimek szabályozásában és a szabályozott extracelluláris enzimek jellemzőit valamint azt, hogy az extracelluláris észteráz génje előtt lévő fehérje kötőhely nagyon hasonlít az AdpA konszenzus kötőhelyhez, feltételezzük, hogy a C faktor a morfológiai differenciálódás mellett az extracelluláris észteráz (és más extracelluláris hidrolázok) termelését is szabályozza.

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy a *S. albidoflavus* 45H törzs által termelt C faktor kulcsszerepet játszik a morfológiai differenciálódásban és valószínűleg szabályozza különböző extracelluláris hidrolázok, köztük a hőstabil, cinkkel indukálható észteráz expresszióját is. Az extracelluláris észteráz és a Nec1 nekrosis faktor, mint esszenciális virulencia faktorok, szerepet játszanak a patogenitásban.

SUMMARY

The extracellular signalling protein Factor C and its role in morphological differentiation and in secondary metabolite production have been studied for a long time. Since the origin of the Factor C producer strain, *Streptomyces griseus* 45H, has often been questioned we made effort to clarify its taxonomic identification. Our recent molecular data in line with previous findings indicates that *S. griseus* 45H was probably picked up as a laboratory contaminant of the strain of *S. flavofungini*. Based on 16S rRNA gene sequences and Southern hybridization, *S. griseus* 45H and *S. flavofungini* from our culture collection are clearly identified as the same and belong to the *S. albidoflavus* group. Therefore *S. griseus* 45H should be named as *Streptomyces albidoflavus* 45H in the future.

S. griseus 45H has been described as a strain that sporulates well both on solid medium and in liquid culture. We were interested whether Factor C plays a key role in the morphological differentiation of the Factor C producer strain and which steps of differentiation are regulated by Factor C. A null mutant of *S. griseus* 45H was designed by replacing the factor C gene in the chromosome by its inactivated form via homologous recombination. The candidate gene replacement mutants showed the expected *bald* phenotype; however, instead of the expected homologous recombination probably induced genome rearrangement happened that resulted in deletion to part of the factor C gene (i.e. to the left of the inserted resistance gene) as it was revealed by Southern hybridization. Deletions often occur in the terminal region of the unstable linear chromosomes so loss of factor C gene can be explained assuming that factor C gene is located close to the end of the chromosome. The resulting *bald* phenotype and its complementation by the cloned factor C gene confirmed that factor C plays a key role in controlling cellular differentiation.

Southern hybridization and database searches revealed only very few *Streptomyces* strains with homologous genes and proteins. One of them was the potato scab causing *S. scabiei*. We used *nec1* gene as an indicator of the presence of the large pathogenicity island (PAI) that confers pathogenicity to different *Streptomyces* strains. Using PCR reaction and Southern hybridization the *nec1* gene and some part of PAI was detected in *S. europaeiscabiei* CFBP4501, *S. griseus* 45H and its null mutant, *S. griseus* 45H-B, but not detected in *S. griseus* 52-1.

We found a good correlation between the production of a zinc-induced heat-stable extracellular esterase and the pathogenicity of the strains. Both the pathogenicity and esterase activity was decreased but not lost in null mutant which suggest that Factor C has a possible regulatory role in the production of extracellular hydrolases and the change in esterase activity can not be attributed to codeletion of factor C gene and the esterase gene. Combining the information regarding to the possible interaction between Factor C and A-factor regulon as well as characteristics of extracellular enzymes regulated by Factor C and the fact that upstream of extracellular esterase genetic determinant there is a protein binding site that is highly similar to the AdpA consensus binding site, we assume that factor C plays a regulatory role in the production of extracellular esterases (and other extracellular hydrolases as well) and consequently cellular differentiation.

It can be concluded that the signalling protein factor C secreted by *S. albidoflavus* 45H has a key role in morphological differentiation and probably regulates the production of different extracellular hydrolases including a zinc-induced, heat-stable esterase which is involved in scab development, furthermore, the *nec1* gene, another important virulence factor, is also present in that strain.

7. IRODALOMJEGYZÉK

7.1. Hivatkozások

- Akanuma G, Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S (2009) Dynamic changes in the extracellular proteome caused by absence of a pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol.* 73: 898–912.
- Anisova LN, Blinova IN, Efremenkova OV, Smirnova GM, Khokhlov AS (1984) Regulators of differentiation in *Streptomyces cyaneofuscatus*. *Mikrobiologiya* 53(6): 890-5.
- Babcock MJ, Kendrick KE (1988) Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 170: 2802-2808.
- Babcock MJ, McGew M, Schottel JL (1992) Identification of a protein binding sequence involved in expression of an esterase gene from *Streptomyces scabies*. *J Bact.* 174: 4287-4293.
- Barabas G, Szabo G (1965) Comparison of cell wall composition of *Streptomyces griseus* strains. *Arch Mikrobiol.* 50:156-63.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM et al. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141–147.
- Bérdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot. (Tokyo)* 58: 1–26.
- Birkó Zs, Sümegi A, Vinnai A, van Wezel G, Szeszák F, Vitális S, Szabó PT, Kele Z, Janáky T, Biró S (1999) Characterization of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in morphological differentiation of *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145: 2245-2253
- Birkó Zs, Schauwecker F, Pfennig F, Szeszák F, Vitális S, Keller U, Biró S (2001) Expression and rapid one-step purification of biologically active His-tagged factor C by Ni⁺ affinity column chromatography. *FEMS Microbiology Letters* 196: 223-227
- Birkó Zs (2002) Egy pleiotróp hatású autoregulátor génjének molekuláris genetikai analízise *Streptomyces griseus*ban. *Doktori értekezés.* Debreceni Egyetem
- Birkó Zs, Bialek S, Buzás K et al. (2007) The secreted signalling protein Factor C triggers the A-factor response regulon in *Streptomyces griseus*. *Mol Cell Proteomics.* 6.7: 1248-1256.

- Biró S, Békési I, Vitális S, Szabó G (1980) A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. *Eur J Biochem.* 103: 359-363.
- Biró S, Birkó Zs, van Wezel GP (2000) Transcriptional and functional analysis of the gene for factor C, an extracellular signal protein involved in cytodifferentiation of *Streptomyces griseus*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 277-285
- Blondelet-Rouault MH, Weiser J, Lebrihi A, Branny P, Pernodet JL (1997) Antibiotic resistance gene cassettes derived from the Ω interposon for use in *E. coli* and *Streptomyces*. *Gene* 190: 315-317
- Bloomfield BJ, Alexander M (1967) Melanins and resistance of fungi to lysis. *J Bact.* 93: 1276–1280.
- Bouchek-Mechiche K, Gardan L, Normand P, Jouan B (2000) 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. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 91-99.
- Bramwell PA, Wiener P, Akkermans ADL, Wellington EMH (1998) Phenotypic, genotypic and pathogenic variation among streptomycetes implicated in common scab disease. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 255-260.
- Bukhalid RA, Loria R (1997) Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. *J Bact.* 179: 7776-7783.
- Bukhalid RA, Chung SY, Loria R (1998) *nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. *Mol Plant Microbe Interact.* 11(10): 960-7.
- Bullock WO, Fernández JM, Short JM (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5: 376.
- Champness W (2000) Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. In *Prokaryotic Development*, pp. 11-31. Edited by Brun YV and Shimkets LJ, Washington DC, American Society for Microbiology.
- Chater KF, Merrick MJ (1979) Streptomycetes. *Developmental Biology of Prokaryotes* (Parish JH, ed), pp. 93–114. Blackwell, Oxford.

- Chater KF (1984) Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In *Microbial Development*, pp. 89-115. Edited by Losick R and Shapiro L, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
- Chater KF (1993) Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol.* 47: 685-713.
- Chater KF (2000) Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in *Streptomyces*. In *Prokaryotic Development*, pp. 33-48. Edited by Brun YV and Shimkets LJ, Washington DC, American Society for Microbiology.
- Chater KF, Chandra G (2006) The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev.* 30: 651-672.
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev.* 34(2): 171-98.
- Chen CW, Huang CH, Lee HH, Tsai HH, Kirby R (2002) Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet.* 18, 522-529.
- Cundliffe E, Bate N, Butler A, Fish S, Gandecha A, Merson-Davies L (2001) The tylosin-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 79: 229-34. Review.
- Dobránszki J, Tábori KM, Ferenczy A (1999) Light and genotype effects on *in vitro* tuberization of potato plantlets. *Potato Research* 42: 483-488
- Doering-Saad C, Kämpfer P, Manulis S, Kritzman G, Schneider J, Zakrewska-Czerwinska J, Schrempf H, Barash, I (1992) Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. *Appl. Env. Microbiol.* 58: 3932-3940.
- Engel P, Scharfenstein LL, Dyer JM, Cary JW (2001) Disruption of a gene encoding a putative gamma-butyrolactone-binding protein in *Streptomyces tendae* affects nikkomycin production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 414-9.
- Fehér Zs, Szabó G (1978) Genetic relatedness between streptomycin-producing and non-producing strains of *Streptomyces griseus*, studied by means of DNA-DNA hybridization. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 29: 165-172.
- Ferguson EV, Ward AC, Sanglier JJ, Goodfellow M (1997) Evaluation of *Streptomyces* species-groups by pyrolysis mass spectrometry. *Zentralbl Bakteriol.* 285: 169-181.
- Folcher M, Gaillard H, Nguyen LT, Nguyen KT, Lacroix P, Bamas-Jacques N, Rinkel M, Thompson CJ (2001) Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis*

- autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 276: 44297-306.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(12): 4645-9.
- Hacker J, Carniel E (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* 2(5): 376-81.
- Healy FG, Wach M, Krasnoff SB, Gibson DM, Loria R (2000) The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthase required for phytotoxin taxtomin A production and pathogenicity. *Mol Microbiol.* 38: 794-804.
- Hirano S, Kato JY, Ohnishi Y, Horinouchi S (2006) Control of the *Streptomyces* subtilisin inhibitor gene by AdpA in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 188: 6207–6216.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf H (1985) *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual.* Norwich, John Innes Foundation.
- Hopwood DA (2007) *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers.* Oxford University Press, New York.
- Horinouchi S, Beppu T (1992) Autoregulatory factors and communication in Actinomycetes. *Annu Rev Microbiol.* 46: 377-98.
- Horinouchi S, Beppu T (1994) A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol.* 12: 859–864
- Horinouchi S (1996) *Streptomyces* genes involved in aerial mycelium formation. *FEMS Microbiol Lett* 141: 1-9.
- Horinouchi S (1999) γ -Butyrolactones that control secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*. In *Cell-Cell Signaling in Bacteria*, pp. 193-207. Edited by Gray M, Dunny M and Winans SC, Whashington DC, American Society for Microbiology
- Horinouchi S (2002) A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci.* 7: d2045-57. Review.

- Horinouchi S (2007) Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotech Bioch.* 71: 283–299.
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21: 526–531.
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 72(3): 1719-28. Review.
- Joshi M, Rong X, Moll S, Kers J, Franco C, Loria R (2007) *Streptomyces turgidiscabies* secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 20(6):599-608.
- Jukes TH, Cantor CR (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, pp. 21-123. Edited by Munro HN, Academic Press, New York.
- Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W (1998) Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ.* 9(1):13-21.
- Kato J, Suzuki A, Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S (2002) Control by A-factor of a metalloendopeptidase gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 184: 6016–6025.
- Kato JY, Miyahisa I, Mashiko M, Ohnishi Y, Horinouchi S (2004) A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 186(7): 2206-11.
- Kato J, Chi WJ, Ohnishi Y, Hong SK, Horinouhi S (2005) Transcriptional control by A-factor of two trypsin genes in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 187: 286–295.
- Kawamoto S, Watanabe H, Hesketh A, Ensign JC, Ochi K (1997) Expression analysis of the *ssgA* gene product, associated with sporulation and cell division in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 143 (Pt 4): 1077-86.
- Kendrick KE, Ensign JC (1983) Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J Bact.* 155(1): 357-366.
- Kers JA, Cameron KD, Joshi MV, Bukhalid RA, Morello JE, Wach MJ, Gibson DM, Loria R (2005) A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol Microbiol.* 55: 1025-1033.
- Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Schevchenko LA, Kornitskaya EY, Ivkina NS, Rapoport IA (1967) A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomycetes streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 177: 232-235.

- Khokhlov AS, Anisova LN, Tovarova II, Kleiner EM, Kovalenko IV, Krasilnikova OI, Kornitskaya EY, Pliner SA (1973) Effect of A-factor on the growth of asporogenous mutants of *Streptomyces griseus*, not producing this factor. *Z Allg Mikrobiol.* 13(8): 647-55.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, The John Innes Foundation.
- Kim B, Al-Tai AM, Kim SB, Somasundaram P, Goodfellow M (2000) *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 505-509.
- Kitani S, Iida A, Izumi TA, Maeda A, Yamada Y, Nihira T (2008) Identification of genes involved in the butyrolactone autoregulator cascade that modulates secondary metabolism in *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Gene* 425(1-2):9-16.
- Kleiner EM, Pliner SA, Soifer VS, Onoprienko VV, Balashova TA, Rosynov BV, Khokhlov AS (1976) The structure of A-factor bioregulator from *Streptomyces griseus*. *Bioorg Chem.* 2: 1142-1147.
- Kolattukudy PE (1981) Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. *Annu Rev Plant Physiol.* 32:539-567
- Kolattukudy PE (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 23:223-250
- Kudo N, Kimura M, Beppu T, Horinouchi S (1995) Cloning and characterization of a gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 177 (22): 6401-6410.
- Kwak J, Kendrick KE (1996) Bald mutants of *Streptomyces griseus* that prematurely undergo key events of sporulation. *J Bact.* 178(15): 4643-4650.
- Mauël C, Young M, Monsutti-Grecescu A, Mariott SA, Karamata D (1994) Analysis of *Bacillus subtilis tagC* gene expression using transcriptional fusions. *Microbiology* 140: 2279-2288.
- MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T (1992) Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111(1): 61-8.
- McCann PA, Pogell BM (1979) Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *J Antibiot.* 32: 673-678.

- McQueen DAR, Schottel JL (1987) Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J Bact.* 169: 1967-1971
- Mehling A, Wehmeier UF, Piepersberg W (1995) Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiology* 141(Pt 9): 2139-47.
- Miguélez EM, Hardisson C, Manzanal MB (1999) Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol.* 145: 515–525.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-479.
- Nakano H, Takehara E, Nihira T, Yamada Y (1998) Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae barA* gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts as a repressor in virginiamycin biosynthesis. *J Bact.* 180: 3317-22.
- Nishio K, Ishida T, Arioka H, Kurokawa H, Fukuoka K, Nomoto T, Fukumoto H, Yokote H, Saijo N (1996) Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer Res.* 16(6B): 3387-95.
- Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka H, Horinouchi S (1999) The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol.* 34: 102-111.
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bact.* 190: 4050–4060.
- Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol.* 25(4):447-53.
- Omura S (1992) The expanded horizon for microbial metabolites—a review. *Gene* 115: 141–149.

- Onaka H, Ando N, Nihira T, Yamada Y, Beppu T, Horinouchi S (1995) Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 177: 6083-6092.
- Prosser JI, Gray DI, Gooday GW (1988) Cellular mechanisms for growth and branch formation in Streptomycetes. In *Biology of Actinomycetes '88*, pp. 316-320. Edited by Okami Y, Beppu T, Ogawara H. Tokyo, Japan Scientific Societies Press.
- Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol.* 21: 77-96.
- Ritter A, Blum G, Emödy L, Kerenyi M, Böck A, Neuhierl B, Rabsch W, Scheutz F, Hacker J (1995) tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 17(1): 109-21.
- Sambrook J Russel (2001) *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425.
- Schimmel TG, Coffman AD, Parsons SJ (1998) Effect of butyrolactone I on the producing fungus, *Aspergillus terreus*. *Appl Environ Microbiol.* 64(10): 3707-12.
- Schottel JL, Hale V, Babcock MJ (1992) Regulation and secretion of an extracellular esterase from *Streptomyces scabies*. *Gene* 115: 27-31.
- Stratigopoulos G, Gandeche AR, Cundliffe E (2002) Regulation of tylosin production and morphological differentiation in *Streptomyces fradiae* by TylP, a deduced gamma-butyrolactone receptor. *Mol Microbiol.* 45(3): 735-44.
- Szabó G, Vályi-Nagy T, Barabás Gy, Bássler G (1960) Comparison of strains of *Streptomyces griseus* which produce streptomycin and those which do not. *Nature* 188: 428-42.
- Szabó G, Barabás Gy, Vályi-Nagy T (1961) Comparison of *Streptomyces griseus* strains which produce streptomycin and those which do not. *Arch Microbiol.* 40: 261-274.
- Szabó G, Vályi-Nagy T, Vitális S (1962) A new factor regulating life cycle of *Streptomyces griseus*. In *Genetics of Microorganisms, Proceedings of a Symposium on Heredity and Variability of Microorganisms*, pp. 282-292. Edited by Timakova VD. Moscow, State Publishing House of Medical Literature.

- Szeszák F, Vitális S, Tóth F, Valu G, Facht J, Szabó G (1990) Detection and determination of factor C -a regulatory protein- in *Streptomyces* strains by antiserum and monoclonal antibody. *Arch Microbiol.* 154(1): 82-4.
- Szeszák F, Vitális S, Biró S, Dalmi L (1997) Amino acid sequence homology of factor C produced by *Streptomyces griseus* with regulatory proteins of zinc finger type. *Acta Biol Hung.* 48(3): 265-273.
- Takano E, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y, Bibb MJ (2001) A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 41(5): 1015-28.
- Tomono A, Tsai Y, Ohnishi Y, Horinouchi S (2005) Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 187: 6341–6353.
- Tóth G, Szabó G (1991) Nucleotide and DNA uptake by *Neurospora crassa*: involvement of an uptake stimulating protein. *Biochim Biophys Acta.* 1063(2): 247-52.
- Ueda K, Miyake K, Horinouchi S, Beppu T (1993) A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. *J Bact.* 175: 2006-2016.
- Úri J, Békési I (1958) Flavofungin, a new crystalline antifungal antibiotic: origin and biological properties. *Nature* 181: 908.
- Vasilenko TI, Tovarova II, Khokhlov AS (1983) Effect of the A-factor on the adenylate level in *Streptomyces griseus*. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 19(3): 356-61.
- Vitális S, Szabó G (1969) Cytomorphological effect of factor C in submerged cultures on the hyphae of *Streptomyces griseus* strain no. 52-1. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 20(1): 85-92.
- Voronina OI, Novikova GV, Khokhlov AS (1982) Changes in NADP-glycohydrolase activity in the process of *Actinomyces streptomycini* development *Izv Akad Nauk SSSR Biol.* (4): 620-4.
- Vujaklija D, Horinouchi S, Beppu T (1993) Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 175: 2652–2661.
- Wildermuth H (1970) Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol.* 60: 43–50.

- Wu LF, Ize B, Chanal A, Quentin Y, Fichnat G (2000) Bacterial twin-arginine signal peptide -dependent protein translocation pathway: evolution and mechanism. *J Mol Microbiol Biotechnol.*2(2): 179-89.
- Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S (2000) An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (sigma(AdsA)) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 182(16): 4596-605.
- Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S (2003a) Transcriptional switch on of *ssgA* by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J Bact.* 185(4): 1273-83.
- Yamazaki H, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S (2003b) *amfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol.* 50(4): 1173-87.

7.2. A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények

- Kiss Zs**, Ward AC, Birkó Zs, Chater KF, Biró S (2008) *Streptomyces griseus* 45H, the producer of the extracellular autoregulator protein factor C, is a member of the species *Streptomyces albidoflavus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1029-1031 (IF: 2.222).
- Kiss Zs**, Dobránszki J, Hudák I, Birkó Zs, Vargha Gy, Biró S (közlésre elfogadva): The possible role of factor C in common scab disease development. *Acta Biol Acad Sci Hung.* (IF: 0.619)

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Biró Sándornak, a lehetőséget, hogy egyetemi hallgatóként csatlakozhattam kutatócsoportjához és megismerhettem ezt a kutatási területet, köszönet a támogatásért és a hasznos útmutatásokért.

Köszönöm Birkó Zsuzsának értékes tanácsait és hasznos ötleteit és azt, hogy munkámat figyelemmel kísérte.

Köszönöm Keserű Juditnak a kísérletek végzése és a dolgozat készítése közben nyújtott segítségét.

Köszönöm a Humángenetika Tanszék minden munkatársának, hogy lehetőségeikhez képest segítették munkámat.

Köszönöm a Debreceni Egyetem AMTC KIK – Nyíregyházi Kutató Intézet munkatársainak, különösen Dr. Dobránszki Juditnak és Hudák Ildikónak, az *in vitro* burgonyagumókon végzett kísérletekhez nyújtott segítségét.

Köszönöm családom, elsősorban Szüleim támogatását és áldozatvállalását, továbbá köszönöm barátaim, különösen Osztrozics Ágnes támogatását.

9. FÜGGELÉK

Ebben a fejezetben a 16S rRNS génszekvenciák összehasonlításának eredményei kerültek feltüntetésre az alábbiak szerint:

1. *S. griseus* 52-1 16S rRNS gén (GenBank EF571001) és *S. griseus* rRNS operon *rrnA* régió gén (GenBank AB030567)
2. *S. griseus* 52-1 16S rRNS (GenBank EF571001), *S. griseus* 45H 16S rRNS gén (GenBank EF57002) és a laboratóriumban izolált *S. flavofungini* 16S rRNS gén (GenBank EF571003)
3. *S. griseus* 45H 16S rRNS gén (GenBank EF57002) és a laboratóriumban izolált *S. flavofungini* 16S rRNS gén (GenBank EF571003)
4. *S. albidoflavus* 16S rRNS gén (GenBank DQ978978), *S. griseus* 45H 16S rRNS gén (GenBank EF57002) és a laboratóriumban izolált *S. flavofungini* 16S rRNS gén (GenBank EF571003).

Alkalmazott rövidítések:

52-1: *S. griseus* 52-1

rrnA: *S. griseus* rRNS operon *rrnA*

45H: *S. griseus* (*S. albidoflavus*) 45H

flavof: laboratóriumban izolált *S. flavofungini*

albidof: *S. albidoflavus*

1.
Query= gb|EF571001.1| Streptomyces griseus strain 52-1 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence

dbj|AB030567.1| Streptomyces griseus ribosomal RNA operon rrnA region

ALIGNMENTS

```
52-1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC 60
rrnA AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC 958

52-1 GATGAAGCCTTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC 120
rrnA GATGAAGCCTTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC 1018

52-1 CTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCA 180
rrnA CTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCA 1078

52-1 TGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGG 240
rrnA TGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGG 1138

52-1 TGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA 300
rrnA TGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA 1198

52-1 CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT 360
rrnA CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT 1258

52-1 GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCT 420
rrnA GGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCT 1318

52-1 CTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACG 480
rrnA CTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACG 1378

52-1 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG 540
rrnA TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG 1438

52-1 AGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCAGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCA 600
rrnA AGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCAGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCA 1498

52-1 TTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA 660
rrnA TTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAA 1558

52-1 ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACG 720
rrnA ATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACG 1618

52-1 CTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 780
rrnA CTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 1678

52-1 ACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAA 840
rrnA ACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAA 1738

52-1 GTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCG 900
rrnA GTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCG 1798

52-1 CACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG 960
rrnA CACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTG 1858

52-1 ACATATACCGGAAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCA 1020
rrnA ACATATACCGGAAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCA 1918

52-1 TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT 1080
rrnA TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT 1978
```

52-1 TGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGT 1140
 rrnA TGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGT 2038

52-1 CAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCA 1200
 rrnA CAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCA 2098

52-1 CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAA 1260
 rrnA CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAA 2158

52-1 AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAG 1320
 rrnA AAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAG 2218

52-1 TAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 1380
 rrnA TAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT 2278

52-1 CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCT 1440
 rrnA CACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCT 2338

52-1 GTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC 1487
 rrnA GTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC 2385

2.

Query= gb|EF571001.1| Streptomyces griseus strain 52-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

gb|EF571002.1| Streptomyces griseus strain 45H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

gb|EF571003.1| Streptomyces flavofungini 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ALIGNMENTS

52-1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC	60
45H	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC	60
flavof	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC	60
52-1	GATGAAGC-CTTTCGGG-GTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG	118
45H	GATGAACC G CTTTCGGG C GGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG	120
flavof	GATGAACC G CTTTCGGG C GGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG	120
52-1	CCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACA CT CTGTCC--	176
45H	CCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGA--CTGTCC AT	178
flavof	CCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGA--CTGTCC AT	178
52-1	CGCAT-G-GGACGGGG T A AAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCT	234
45H	CGCAT G G T GGATGGTG-T-AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCT	236
flavof	CGCAT G G T GGATGGTG-T-AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCT	236
52-1	TGTTGGTGGGGTAATGG C T -ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC	293
45H	TGTTGGTGAGGTAGTGG-CT C ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC	295
flavof	TGTTGGTGAGGTAGTGG-CT C ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC	295
52-1	GGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT	353
45H	GGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT	355
flavof	GGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT	355
52-1	GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTG	413
45H	GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTG	415
flavof	GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTG	415
52-1	TAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCT	473
45H	TAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCT	475
flavof	TAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCT	475
52-1	AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG	533
45H	AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG	535
flavof	AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG	535
52-1	CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGG	593
45H	CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGG	595
flavof	CGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGG	595
52-1	GTCTGCATTCGATACGGGC T AG-CTAGAGT G T-GGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT	651
45H	GTCTGCAGTCGATACGGGC-AG G CTAGAGT-T C GGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT	653
flavof	GTCTGCAGTCGATACGGGC-AG G CTAGAGT-T C GGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT	653
52-1	AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC-	710
45H	AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC G	713
flavof	AGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCC G	713

52-1	AT T ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	770
45H	AT- A CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	772
flavof	AT- A CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC	772
52-1	CACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCT	830
45H	CACGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT	832
flavof	CACGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCT	832
52-1	AACGCATTAAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	890
45H	AACGCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	892
flavof	AACGCATTAAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGA	892
52-1	CGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA	950
45H	CGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA	952
flavof	CGGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA	952
52-1	CCAAGGCTTGACATATACCGGAAA G CATCAG-AGAT- G GTGCCCC C TTGTGGTCGGTAT	1008
45H	CCAAGGCTTGACATACACCGGAAA- C GTCT G GAGAC A GGCGCCCC- T TGTGGTCGGTGT	1010
flavof	CCAAGGCTTGACATACACCGGAAA- C GTCT G GAGAC A GGCGCCCC- T TGTGGTCGGTGT	1010
52-1	ACAGGTGGTGTCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC	1068
45H	ACAGGTGGTGTCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC	1070
flavof	ACAGGTGGTGTCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC	1070
52-1	GAGCGCAACCCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTT C GGGGTGATGGGGACTCACAGGA	1128
45H	GAGCGCAACCCCTTGTTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTT- G TGGTGCTGGGGACTCACGGGA	1129
flavof	GAGCGCAACCCCTTGTTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTT- G TGGTGCTGGGGACTCACGGGA	1129
52-1	GACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATG	1188
45H	GACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATG	1189
flavof	GACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATG	1189
52-1	TCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGGA	1248
45H	TCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGA	1249
flavof	TCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGA	1249
52-1	GCGAATCTCAAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT	1308
45H	GCGAATCTCAAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT	1309
flavof	GCGAATCTCAAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGT	1309
52-1	CGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA	1368
45H	CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA	1369
flavof	CGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA	1369
52-1	CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTG	1428
45H	CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTG	1429
flavof	CACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTG	1429
52-1	TGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	1487
45H	TGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	1488
flavof	TGGGAGGGAGCTGTCTGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	1488

3.

Query= gb|EF571002.1| Streptomyces griseus strain 45H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

gb|EF571003.1| Streptomyces flavofungini 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ALIGNMENTS

45H	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC	60
flavof	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAAC	60
45H	GATGAACCGCTTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG	120
flavof	GATGAACCGCTTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTG	120
45H	CCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCG	180
flavof	CCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGTCCATCG	180
45H	CATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTT	240
flavof	CATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTT	240
45H	GGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCA	300
flavof	GGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCA	300
45H	CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA	360
flavof	CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA	360
45H	ATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAC	420
flavof	ATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAC	420
45H	CTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA	480
flavof	CTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTA	480
45H	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA	540
flavof	CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA	540
45H	AGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTG	600
flavof	AGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTG	600
45H	CAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG	660
flavof	CAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTG	660
45H	AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA	720
flavof	AAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGA	720
45H	CGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT	780
flavof	CGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT	780
45H	AAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATT	840
flavof	AAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATT	840
45H	AAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	900
flavof	AAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC	900
45H	CGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT	960
flavof	CGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT	960
45H	TGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTG	1020
flavof	TGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTG	1020

45H	CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1080
flavof	CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC	1080
45H	CTTGTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGG	1140
flavof	CTTGTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGG	1140
45H	TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGC	1200
flavof	TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTGGGCTGC	1200
45H	ACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAA	1260
flavof	ACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAA	1260
45H	AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTA	1320
flavof	AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTA	1320
45H	GTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCG	1380
flavof	GTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCG	1380
45H	TCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGC	1440
flavof	TCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGC	1440
45H	TGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	1488
flavof	TGTCGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCC	1488

4.

Query= gb|DQ978978.1| *Streptomyces albidoflavus* strain NRRL B-24475 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

gb|EF571002.1| *Streptomyces griseus* strain 45H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

gb|EF571003.1| *Streptomyces flavofungini* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ALIGNMENTS

albidof	TCGAACGATGAACCGCTTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC	60
45H	TCGAACGATGAACCGCTTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC	114
flavof	TCGAACGATGAACCGCTTTTCGGGCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC	114
albidof	AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGT	120
45H	AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGT	174
flavof	AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGT	174
albidof	CCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAG	180
45H	CCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAG	234
flavof	CCATCGCATGGTGGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAG	234
albidof	CTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC	240
45H	CTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC	294
flavof	CTTGTTGGTGAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGAC	294
albidof	CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT	300
45H	CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT	354
flavof	CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT	354
albidof	TGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT	360
45H	TGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT	414
flavof	TGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT	414
albidof	GTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC	420
45H	GTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC	474
flavof	GTAAACCTCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGC	474
albidof	TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG	480
45H	TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG	534
flavof	TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG	534
albidof	GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCG	540
45H	GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCG	594
flavof	GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCG	594
albidof	GGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA	600
45H	GGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA	654
flavof	GGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTA	654
albidof	GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGA	660
45H	GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGA	714
flavof	GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGA	714
albidof	TACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	720
45H	TACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	774
flavof	TACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA	774

albidof	CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAA	780
45H	CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAA	834
flavof	CGCCGTAAACGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAA	834
albidof	CGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG	840
45H	CGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG	894
flavof	CGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG	894
albidof	GGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACC	900
45H	GGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACC	954
flavof	GGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACC	954
albidof	AAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAG	960
45H	AAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAG	1014
flavof	AAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCTGGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTTCGGTGTACAG	1014
albidof	GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC	1020
45H	GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC	1074
flavof	GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC	1074
albidof	GCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCG	1080
45H	GCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCG	1134
flavof	GCAACCCTTGTCCCGTGTGTCAGCAGGCCCTTGTGGTGCTGGGGACTCACGGGAGACCG	1134
albidof	CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTG	1140
45H	CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTG	1194
flavof	CCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCTTG	1194
albidof	GGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAA	1200
45H	GGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAA	1254
flavof	GGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAA	1254
albidof	TCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG	1260
45H	TCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG	1314
flavof	TCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG	1314
albidof	TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACG	1300
45H	TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACG	1354
flavof	TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACG	1354