

Methods Morphological, physiological and biochemical properties for selection strain mycelial fungi-producing protein, vitamins и other biologically active substances have been studied, using of known methods. Modern methods have been used to for preclinical animal trials. **Results.** Established the strains of *Fusarium sambucinum* F-10011F F-139 have a high growth rate of 0.28–0.34 hour⁻¹, rich in essential amino acids, unsaturated fatty acids such as oleic, linoleic, linolenic and arachidonic have been detected. Especially valuable presence in fungi arachidonic acid which is a precursor of prostaglandins in the body of animals and humans. The biotechnology of biopreparation obtaining based on physiology-biochemical properties was developed using joint cultivation of selected strains of *Fusarium sambucinum*. The preparation has high content of vitamins, unsaturated fatty acids and other biologically active substances a but and zinc nanoakvahalat. The results of preclinical testing of fungal product have revealed a positive impact not only on the growth of living biomass but also to increase to organism resistance to various infections diseases increase bakteriatsidnoy and lysozyme aktivnosti of blood serum, and this led to increased survival of juveniles **Conclusions.** The resulting protein-vitamin supplement containing zinc nanoakvahalat urluchay biochemical and immunological characteristics of animals. The experimental data allow to predict the effectiveness of using supplements as treatment and prevention to improve performance indicators and the natural resistance of farm animals.

Key words: biotechnology, vitamins, protein, food additiv.

УДК 57.085.23

ТАНАСІЄНКО І.В.¹, БУЗІАШВІЛІ Н.², ЄМЕЦЬ А.І.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹ Державна Установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: iratanasoenko@gmail.com

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології», Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13

АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТОМАТІВ (*SOLANUM LYCOPERSICON*) ГЕНОМ ЛАКТОФЕРИНУ ЛЮДИНИ

У результаті взаємодії із навколишнім середовищем рослинні організми зазнають впливу негативних абіотичних та біотичних факторів. Їх здатність протистояти стресовим умовам та адаптуватись до них, зберігаючи власний життєвий потенціал, залежить від реалізації захисних механізмів організму. Для багатьох сільськогосподарських культур, зокрема томатів, проблема комплексної довготривалої стійкості до цих стресових факторів досі не вирішена [2]. Оскільки плоди томатів широко використовують у харчуванні без попередньої термічної обробки, застосування традиційних хімічних засобів боротьби із фітопатогенами рослин, таких як інсектициди, фунгіциди та ін., значно обмежується, тоді як втрати врожаю внаслідок хвороб та ушкодження рослин і плодів шкідниками досягають 80%. Окрім того, додаткову загрозу для здоров'я людини становить вживання контамінованих продуктів, внаслідок синтезу патогенами токсинів, наприклад мікотоксинів, що характеризуються канцерогенними, мутагенними, тератогенними,

ембріотоксичними, алергічними, імуносупресорними ефектами [1].

Для вирішення даної проблеми необхідна селекція стійких до фітопатогенів сортів рослин. Однак томати вражаються більш ніж п'ятнадцятьма видами збудників хвороб, не враховуючи широкого ряду шкідників, що послаблюють захисну систему рослин та роблять плоди не придатними для використання в їжу. Альтернативою створенню сортів стійких до певних видів і штамів мікроорганізмів є підвищення системної стійкості рослин до широкого спектру патогенів та несприятливих факторів абіотичного походження. Для досягнення поставленого завдання використовують технології переносу протимікробних генів, зокрема лактоферину, до рослин-реципієнтів [7]. Лактоферин – глікопротеїн молекулярною масою 80 кДа, віднесений до родини трансферинів завдяки його здатності приєднувати та переносити іони заліза, секретується в організмі людини разом із молоком, слиною, жовчю, шлунковим соком, носовим слизом, сльозами, вагінальним

секретом [6]. Цей білок характеризується широким спектром біологічної активності, включаючи антибактеріальну, протівірусну, протизапальну та імуномодулюючу функції [6] та є перспективним для привнесення в рослини-реципієнти.

Матеріали та методи

Рослинний матеріал та середовище. Для експериментів було використано насіння томатів сорту Манімейкер (Moneymaker). Насіння стерилізували у 5 %-ному розчині гіпохлориду натрію протягом 20 хв, після чого відмивали у стерильній дистильованій воді (чотири рази по 10 хв). Після відмивання насіння підсушували на фільтрувальному папері та висаджували на середовище Мурашіге та Скуга [8]. Як експланти використовували гіпокотилі, сім'ядольні листки та апікальну меристему 7-и денних проростків. Кожен гіпокотиль розрізали лезом на фрагменти довжиною 3–4 мм, сім'ядольні листки також розрізали перпендикулярно до центральної жилки на 2–3 частини в залежності від розміру кожного окремого листка.

Для ініціації регенерації рослин перераховані типи експлантів вирощували на базовому середовищі МС (бМС) – солі МС [8], сахароза 30 г/л, міо-інозитол 100 мг/л, нікотинова кислота 0,5 мг/л, піридоксин 0,5 мг/л, тіамін-НСІ 1 мг/л, гліцин 2 мг/л, доповненому різними фітогормонами:

1. Середовище МСТ1: бМС, доповнене 2 мг/л зеатину та 0,1 мг/л індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК)

2. Середовище МСТ2: бМС, доповнене 2 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,2 мг/л ІОК.

Висаджені експланти культивували при температурі 24°C та 16-годинному фотоперіоді. Ефективність регенерації рослин фіксували через місяць після висадження експлантів на середовище із фітогормонами. Частоту регенерації пагонів визначали як співвідношення кількості пагонів, що регенерували, до загальної кількості висаджених експлантів томату. Після того, як пагони досягали розмірів 2–3 см в довжину, їх переносили для подальшого вкорінення на живильне середовище того ж складу (бМС), але без додавання фітогормонів. У дослідах використовували по 100 експлантів кожного типу. Вкорінені рослини-регенеранти розміром 7–8 см висаджували у ґрунт.

Бактеріальні штами та плазміди. Для

проведення агробактеріальної трансформації томату було створено конструкцію рВІN35LF (рис.), що містила ген лактоферину людини (*hLF*) під контролем 35S промотору мозаїки цвітної капусти та ген стійкості до канаміцину (*nptII*) як селективний маркерний ген. Вектор було створено на базі плазмід рАFT 105 та рВІNAR. Плазмиду було привнесено до супервірулентного штаму *Agrobacterium tumefaciens* ЕНА105.

Підбір ефективних концентрацій селективного агенту. Оскільки для трансформації томатів використовували різні типи експлантів, то попередньо були визначені селективні концентрації канаміцину. Антибіотик тестували в діапазоні концентрацій від 10 мг/л до 100 мг/л, ефективність концентрацій оцінювали за здатністю калюсних клітин виживати, проліферувати та регенерувати повноцінні пагони у присутності різних концентрацій селективного агенту.

Агробактеріальна трансформація томат. Культуру агробактерій вирощували на середовищі LB [11], що містило 100 мг/л канаміцину, протягом двох діб на шейкері при температурі +28 °С. Для трансформації томатів всі перераховані вище типи експлантів інокулювали із суспензією бактеріальних клітин відразу після ізолювання, через 2 доби або 15 діб культивування. Трансформовані експланти переносили до термостату на 2-ї доби та культивували при температурі +28 °С. Після кокультивування експланти переносили на свіже живильне середовище для калюсогенезу та регенерації, доповнене 500 мг/л цефотаксиму для елімінації бактерії та 50 мг/л канаміцину (селективний агент). Пасаж культури проводили кожен місяць.

Результати та обговорення

Ефективне перенесення чужинної ДНК у клітини-мішені та їх подальша регенерація є одним із основних етапів успішної генетичної трансформації рослин, зокрема томату. Тож на першому етапі досліджень було вивчено регенераційний потенціал різних типів експлантів: гіпокотилів, сім'ядольних листків та апікальної меристеми томатів, що найчастіше використовуються для агробактеріальної трансформації цієї сільськогосподарської культури [3–5, 9, 10,]. Для дослідження регенераційного потенціалу всіх вище перерахованих експлантів використовували середовище на основі МС [8], доповнене двома різними комбінаціями фітогормонів (табл.).

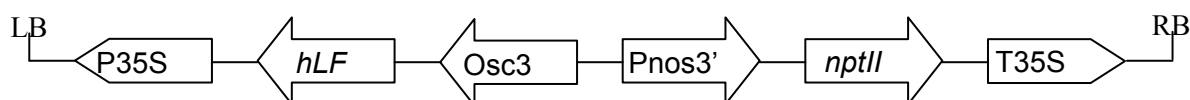


Рис. Схема Т-ДНК конструкції рВІN35LF. LB та RB – ліва та права границі Т-ДНК, Р 35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *hLF* – ген лактоферину людини, *Osc3* – октопіновий термінатор, Р *pos3'* – нопаліновий промотор, *nptII* – ген неоміцин-фосфотрансферази II; T35S – термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти.

Таблиця. Ефективність регенерації рослин томатів із різних типів експлантів

Тип експлантів Концентрація фітогормонів	Частота регенерації, %		
	Гіпокотилі	Сім'ядольні листки	Апікальна меристема
ЗТ - 2мг/л ІОК - 0,1мг/л	94,9%	50%	100%
БАП - 2мг/л ІОК - 0,2мг/л	35,2%	33,4%	100%

Протягом кількох діб культивування гіпокотилів та сім'ядольних листків на середовищах МСТ1 та МСТ2 спостерігали збільшення експлантів внаслідок активної проліферації клітин. Через 7–10 діб починалось формування калюсної тканини на рановій поверхні експлантів. Отриманий калюс характеризувався високим морфогенетичним потенціалом, в результаті чого через 20–25 діб культивування спостерігали формування точок регенерації з наступним розвитком пагонів. Однак незважаючи на інтенсивний калюсогенез на середовищі МСТ2 отриманий калюс характеризувався нижчим регенераційним потенціалом у порівнянні із калюсом, отриманим на середовищі МСТ1. Проте у разі перенесення експлантів на середовище МСТ1, що містило зеатин, фіксували підвищення ефективності регенерації обох типів експлантів. Так ефективність регенерації із гіпокотилів та сім'ядольних листків на середовищі, що містило зеатин, складала 94,9 % та 50 %, відповідно. У той час як на живильному середовищі, що містило БАП, регенераційний потенціал експлантів томату знаходився на рівні 35,2 % для гіпокотилів та 33,4 % для сім'ядольних листків (табл.). Слід відзначити, що апікальна меристема ефективно регенерувала у повноцінні фертильні рослини на обох типах середовищ,

минаючи стадію калюсогенезу. Слід також відзначити, що на середовищі МСТ2 через 15 діб культивування спостерігали інтенсивний розвиток коренів із калюсної тканини. На середовищі, доповненому зеатином, подібного ризогенезу не фіксували.

Встановлення ефективної селективної концентрації канаміцину. Для визначення селективних концентрацій було проведено оцінку впливу канаміцину (10–100 мг/л) на процеси морфогенезу гіпокотилів, сім'ядольних листків та апікальної меристеми. Для цього на середовище МСТ1, доповнене канаміцином у різних концентраціях, висаджували по 20 експлантів. Експерименти проводили у трьох повторностях. Було встановлено, що в перший тиждень культивування експланти, як і у випадку культивування на звичайному живильному середовищі без антибіотику, характеризувались активною проліферацією клітин. Через 10–15 діб культивування спостерігали етіювання гіпокотилів та сім'ядольних листків, в той час як із апікальної меристеми розвивались фенотипово повноцінні пагони. Проте через місяць після початку культивування на селективному середовищі у рослини-регенерантів, отриманих із апікальної меристеми, також спостерігали ознаки руйнування хлорофілу. Таким чином, через 30

діб після початку експерименту всі типи експлантів гинули вже при концентрації діючої речовини 50 мг/л. Найбільш чутливими до впливу антибіотику виявились гіпокотилі томату. Ознаки проліферації їх клітин зникали через тиждень після початку культивування на середовищі, що містило 25 мг/л канаміцину. На відміну від гіпокотилів, сім'ядольні листки зберігали проліферативну активність протягом 15 діб культивування за цих же умов. Однак через місяць після висадження даного типу експлантів на середовище, що містило 25 мг/л селективного агента, з'являлись ознаки некротизації тканин. На середовищі із 100 мг/л канаміцину після 30 діб культивування виживали окремі фрагменти тканин, що гинули впродовж наступних 10 діб культивування на свіжому середовищі. Отже для подальшої роботи із генетичної модифікації томатів використовували 50 мг/л канаміцину.

Трансформація гіпокотилів, сім'ядольних листків та апікальної меристеми томату геном лактоферину людини. Для агробактеріальної трансформації томатів штамом *A. tumefaciens* ENA105, що містив вектор pBIN35LF, використовували по 75 експлантів кожного типу. Щойно ізольовані експланти томату інокулювали із суспензією клітин бактерії та ко-культивували протягом двох діб у термостаті при 28°C. Для елімінації бактерії та підвищення життєздатності експлантів тканину після трансформації відмивали у стерильній дистильованій воді, підсушували на фільтрувальному папері та висаджували на середовище, доповнене цефотаксимом та канаміцином. Для рівномірного доступу поживних речовин та антибіотику до рослинних тканин експланти занурювали у шар живильного середовища. Із-за формування шару бактеріальних клітин на поверхні експлантів через 3–4 доби після відмивання тканини проводили повторне відмивання експлантів у стерильній дистильованій воді та підвищували вміст цефотаксиму у живильному середовищі до 700 мг/л. Однак не зважаючи на зміни концентрації антибіотику інфіковані тканини

гинули через два тижні після інокуляції в суспензії бактеріальних клітин.

Оскільки щойно ізольовані експланти томату виявились надзвичайно чутливими до впливу бактерії, надалі проводили прекультивуацію гіпокотилів та сім'ядольних листків на середовищі МСТ1 протягом 2-х та 15-ти діб. Тобто в останньому випадку використовували сформовану калюсну тканину до початку розвитку меристематичних бруньок. Що стосується апікальної меристеми, то у зв'язку із інтенсивною регенерацією пагонів даним типом експлантів попередньої прекультивуації тканин не проводили. Для зменшення негативного впливу агробактерії на апікальну меристему суспензію бактеріальних клітин розводили середовищем МС [8] у співвідношенні 1:1 та використовували для інокуляції. Подальші маніпуляції із даним типом експлантів проводили за раніше описаною схемою.

Після перенесення всіх типів експлантів на селективне середовище спостерігали пригнічення їх росту та часткову некротизацію тканин. Калюсна тканина, що була використана для трансформації, характеризувалась пригніченим ростом в перший тиждень селекції та масовою некротизацією тканин протягом наступних 10-ти діб культивування рослинного матеріалу на селективному середовищі. В той час як сім'ядольні листочки після 2-х діб прекультивування формували калюсну тканину вже через 2 тижні після початку селекції. Формування пагонів та їх елонгацію спостерігали через 1,5 місяці селекції. Слід відмітити, що на пагонах, які інтенсивно розвивались із апікальної меристеми протягом першого тижня селекції, через 20 діб культивування відзначали появу ознак етіювання тканин. Отримані рослини томату знаходяться на етапі вкорінення на безгормональному середовищі бМС доповненому селективним агентом.

Висновки

Було підібрано умови для ефективної трансформації та селекції комерційно важливого сорту томатів Манімейкер.

Література

1. Шамрай С.М. Микотоксини – постоянная угроза со стороны «экологически чистых» природных ядов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.e-osnova.ru/PDF/osnova_1_0_3.pdf.
2. Поликсенова В.Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам // Вестник БГУ. – 2009. – 2. № 1. – С. 48–60
3. Abu-El-Heba A., Hussein M., Abdalla A.A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system // Landbauforschung. – vTI Agricult Forestry Res. – 2008. – 58. – P. 103–110.

4. Hamza S., Chupeau Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*) // J Exp Bot. – 1993. – 44. – P. 1837–1845.
5. Ling H-Q., Kriseleit D., Ganai M. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) // Plant Cell Rep. – 1998. – 17. – P. 843–847
6. Lønnerdal B., Suzuki Y.A. Lactoferrin. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. Proteins: Basic Aspects. Advanced Dairy Chemistry. – New York: Springer Science+Business Media, 2013. – P. 295–315.
7. Marcos J.F., Mucoz A., Páirez-Payó E., Misra S., Lypez-García B. Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection // Annu. Rev. Phytopathol. – 2008. – 46. – P. 273–301.
8. Murashige T., Skoog F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473–479
9. Park S., Morris L., Park E., Hirschi D., Smith H. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium* – mediated tomato transformation // J. Plant Physiol. – 2003. – 160. – P. 1253–1257.
10. Raj S., Singh R., Pandey S., Singh B. *Agrobacterium*-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing *Tomato leaf curl virus* coat protein gene for resistance against TLCV infection // Current sci. – 2005. – 88, N 10. – P. 1674 – 1679.
11. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989.

TANASIENKO I. ¹, BUZIASHVILI N. ², YEMETS A.I. ¹, BLUME YA. ¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Academy of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: iratanasenko@gmail.com*

² *National Taras Shevchenko University of Kyiv, ESC “Institute of Biology”, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymerska str., 64/13*

AGROBACTERIUM-MEDIATED TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) TRANSFORMATION WITH HUMAN LACTOFERRIN GENE

Aims. Chemicals are classical agents for the control of plant diseases, however, the emergence of new resistant pathogens strains and their toxins as well as chemicals’ limited biological activity and negative long-term effects both on human health and the environment are the challenges for biotechnologists to develop an alternative approach of plant protection. **Methods.** Cell and tissue culture protocols were combined with *Agrobacterium*-mediated transformation to obtain modified tomato plants. **Results.** A range of explants, culture mediums, pre-cultivation time and their combination were established for the development of the effective tomato transformation protocol. Therefore, the regeneration of green shoots from the transformed explants under the selective pressure has been obtained. **Conclusions.** The effective protocol for transformation of commercial tomato cultivar “Many maker” was obtained.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, tomato, human lactoferrin gene, systemic resistance.

УДК 636.4.082.12:611.7

ХОХЛОВ А.М.

Харьковская государственная зооветеринарная академия,

Украина, 62341, Харьковская обл., Дергачевский район, п/о Малая Даниловка, ул. Академическая, 1, e-mail: zoovet@zoovet.kh.ua

ЭВОЛЮЦИЯ ЗУБНОЙ И КОСТНОЙ СИСТЕМЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *SUS*

Свинья как животное всеядное в отношении устройства зубной системы стоит между плотоядными и травоядными. Степень морфологических сходств и различий может указывать на большую или меньшую филогенетическую близость (родственность) разных видов между собой. Исходя из этого, нами была сделана попытка разобраться в

эволюции зубной системы у представителей рода *Sus* [5].

Зубная система в целом и строение отдельных зубов имеют очень большое диагностическое значение. Эволюция зубной системы у представителей рода *Sus* представлена в таблице 1.