

GALAEVA M.V., FAYT V.I., GALAEV A.V., FEDOROVA V.R., SIVOLAP Yu.M.

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigations, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya dor., 3, e-mail: mariagall@rambler.ru

FROST RESISTANCE OF WHEAT RECOMBINANT-INBRED LINES AND ITS RELATION WITH MICROSATELLITE LOCI ALLELES

Aim. The study of the relation between allelic differences of microsatellite loci and frost resistance of recombinant-inbred lines Luzanovka odesskaya/Odesskaya krasnokolosaya. **Methods.** Polymerase chain reaction (PCR), gel-electrophoresis, test of frost resistance. **Results.** Microsatellite analysis of chromosomes of homeologous group 5 and the analysis of frost tolerance were performed on recombinant-inbred lines (RILs) derived from a cross between winter wheat varieties Luzanovka odesskaya (tolerant to frost) and Odesskaya krasnokolosaya (susceptible to frost). Microsatellite analysis of parental varieties by using 7 microsatellite markers located on chromosomes 5A, 5B and 5D showed polymorphism for loci *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* and *Xgpw3191-5B*. These microsatellite markers were used for analysis of RILs. The association between allelic differences at microsatellite loci and frost resistance was studied. **Conclusions.** Allelic differences of RILs Luzanovka odesskaya/Odesskaya krasnokolosaya for *Xgpw3191-5B* locus showed a significant relationship with the level of frost resistance. Increase of frost resistance of lines at the germination stage by 11–17 % was associated with 178 bp allele for this microsatellite locus, which is typical for the frost resistant variety Luzanovka odesskaya. Increase of frost resistance of lines at the tillering stage was associated with 236 bp allele, which is typical for the variety Odesskaya krasnokolosaya.

Key words: *Triticum aestivum* L., frost resistance, microsatellite loci.

УДК 579.873.1:577.181.4

ГОРБАЛЬ Л.О.¹, ЮЩУК О.С.¹, ЗАБУРАНИЙ Н.¹, КОБИЛЯНСЬКИЙ А.М.², ОСТАШ Б.О.¹, МАРІНЕЛЛІ Ф.², ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.³, ФЕДОРЕНКО В.О.¹

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського 4, e-mail: v.fedorenko@franko.lviv.ua

² Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria, Varese and “The Protein Factory” Research Center Politecnico of Milano, ICRM CNR Milano and University of Insubria, Varese Italy

³ Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland, Germany, Saarbrücken

ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТРУМЕНТАРІЙ ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ *ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS* ІЗ ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ПРОДУКЦІЇ ТЕЙКОПЛАНІНУ

Виникнення і розповсюдження патогенних мікроорганізмів, стійких до більшості відомих антибіотиків, є однією з найголовніших проблем сучасної медицини. Антибіотичні препарати все частіше стають неефективними у боротьбі зі збудниками інфекцій. Тому існує потреба у пошуку нових антибіотиків. Продуцентами більшості відомих антибіотиків є актинобактерії, а саме представники роду *Streptomyces*. Однак останнім часом зусилля науковців все більше спрямовані на виділення та дослідження метаболічного потенціалу «нестрептоміцетних» актинобактерій, зокрема тих, що належать до роду *Actinoplanes*, серед яких є багато продуцентів біологічно-активних сполук. До цього роду належить *Actinoplanes teichomyceticus* –

продуцент глікопептидного антибіотика тейкопланіну, який застосовується для лікування важких інфекційних хвороб, викликаних множиннорезистентними збудниками. Попри те, що тейкопланін є фармацевтично-важливим препаратом, а кластер генів його біосинтезу виявлено ще у 2004 році [1, 2], особливості генетичного контролю і регуляція продукції цього антибіотика в *A. teichomyceticus* залишаються малодослідженими. Це зумовлено складністю маніпуляцій з цим об'єктом, а також з тим, що методи генетичної та генно-інженерної роботи з ним розроблені недостатньо. Тому розробка нових генетичних підходів щодо *A. teichomyceticus* має важливе значення не тільки для вивчення механізмів біосинтезу тейкопланіну, але й селекції його

надпродуцентів, генетичного маніпулювання синтезом тейкопланіну і отримання його похідних. У цій роботі узагальнено наші дослідження з розробки генетичного інструментарію для *A. teichomyceticus*: методів перенесення генетичного матеріалу в цей штам, вибору ефективних реплікативних й інтегративних векторів, репортерної системи для оцінки експресії генів і активності промоторів в *A. teichomyceticus*. З використанням розроблених методів нами створено декілька рекомбінантних штамів із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну.

Матеріали і методи

У роботі використано штами *Actinoplanes teichomyceticus* – продуценти тейкопланіну, а також штами *Escherichia coli* DH5б для конструювання рекомбінантних плазмід і ET12567 рUZ8002 для кон'югаційного перенесення плазмід в *A. teichomyceticus*.

Для надекспресії генів-регуляторів в *A. teichomyceticus* застосовано інтегративний й реплікативний вектори рКC1139 і рSET152, а також їхні похідні. Ампліфікацію фрагментів ДНК, що містили гетерологічні промотори або регуляторні гени здійснювали методом ПЛР використовуючи Pfu-полімеразу фірми Thermo scientific.

Продукцію тейкопланіну вивчали за описаних умов глибинної ферментації структурного аналізу [8]. Аналіз глюкуронідазної активності здійснювали за методикою описаною в [8].

Результати та обговорення

Кон'югаційне перенесення реплікативних та інтегративних векторів у *A. teichomyceticus*. Для перенесення векторних і рекомбінантних молекул ДНК у клітини актиноміцетів використовують різноманітні підходи: трансформацію протопластів, електропорацію, кон'югаційні схрещування між *Escherichia coli* і актиноміцетами [3]. Перші два методи мають низку недоліків, а тому як найперспективніший спосіб перенесення ДНК у клітини *A. teichomyceticus* може розглядатися міжродова кон'югація з *E. coli*. Вона вже набула широкого застосування у генно-інженерних роботах із актиноміцетами роду *Streptomyces* [4]. Проте процедури кон'югаційного схрещування з *E. coli*, розроблені для одних видів актиноміцетів (і навіть окремих штамів одного виду) часто неефективні для інших. Ми оптимізували методику перенесення плазмідних ДНК в кон'югаційних схрещуваннях *E. coli* з *A. teichomyceticus* за низкою параметрів.

З'ясовано, що найкращим донором для перенесення чужорідної ДНК є *E. coli* ET12567 (*dam-13::Tn9*, *dcm-6*, *hsdM*, *hsdS*), що містить плазмиду рUZ8002 – похідну RK2 з дефектним *oriT*, який унеможливує її власне кон'югаційне перенесення, проте за рахунок її *tra*-генів можуть переноситися корезидентні плазміди. Для проведення кон'югаційних схрещувань ми використали два середовища: більш багате – соєво-манітолове (СМ) і менш багате – вівсяне (ВС), на яких спостерігали значну різницю у частоті появи рSET152⁺-транскон'югантів. На середовищі СМ їх отримували з частотою $(2,9 \pm 0,2) \times 10^{-3}$, натомість на ВС – близько 1×10^{-6} . Однією з причин такої різниці могло бути значно краще спорювання *A. teichomyceticus* на СМ, ніж на ВС. Ми також встановили, що додавання до середовища іонів магнію в концентрації 20-40 мМ істотно підвищує частоту транскон'югантів. З літератури відомо, що частота кон'югаційного перенесення плазмід у схрещуваннях *E. coli* – *Streptomyces* зростає, якщо використовувати пророщенні спори актиноміцетів [3]. Їх проростання стимулюється короткочасною термічною обробкою. Однак з'ясувалося, що нагрівання спор *A. teichomyceticus* протягом 10 хв при 50 °С робить їх повністю нежиттєздатними. Тому термічна обробка спор є недоцільною для цього штаму.

Штам *A. teichomyceticus*, як і інші представники роду *Actinoplanes*, утворює спорангії з ланцюжками рухливих спор, які за природних умов розкриваються після занурення у воду. Ми встановили, що для достатньо повного розкривання спорангіїв і виходу з них спор свіжо-приготовану суспензію, зняту з газону культури *A. teichomyceticus*, слід витримувати в дистильованій воді не менше 15 хв. Це суттєво підвищує кількість клітин-реципієнтів і доступ до них донора та сприяє підвищенню ефективності кон'югаційного перенесення плазмід.

Оскільки існує потреба вносити в клітини *A. teichomyceticus* різну кількість додаткових копій досліджуваних генів, ми дослідили перенесення у цей штам двох типів човникових векторів: реплікативних та інтегративних. Вектори рSET152, рSOK804 і рRT801 здатні до інтеграції у хромосому актинобактерій, а сайти їх інтеграції в хромосомі у більшості випадків унікальні. Натомість вектори рКC1139, рКC1218E і рSOK101 реплікативні, оліго- чи мультикопійні. Усі вектори з високою ефективністю переносилися в клітини

A. teichomyceticus, за винятком pSOK101 [5]. Причиною цього може бути те, що реплікон pIJ101, на основі якого сконструйовано цей вектор, не функціонує в цьому штамі.

Отже, нам вдалося розробити ефективну методику кон'югаційного перенесення плазмід у штамі *A. teichomyceticus*, що дає можливість вносити в нього генетичний матеріал як у складі інтегративних малокопійних, так і в складі реплікативних багатокопійних плазмід.

Репортерна система для аналізу активності промоторів та експресії генів. Репортерні системи є хорошим генетичним інструментом для дослідження експресії генів, зокрема аналізу активності промоторів. Раніше для *Actinoplanes friuliensis* було застосовано репортерну систему на основі зеленого флуоресцентного білка EGFP [6]. Проте, ця система вимагає спеціального дорогого обладнання і є менш чутливою, ніж інші відомі репортери. Враховуючи вищесказане, ми відібрали для роботи два репортерні гени: *xylE* (катехолоксигенази) та *gusA* (глюкуронідази) [7]. Кожен із цих генів окремо злили з промотором *gylP1/P2* гліцеролового оперону *Streptomyces coelicolor* та перенесли в *A. teichomyceticus* у складі інтегративного вектора pSET152, що має лише один сайт інтеграції в хромосомі цього штаму. Отримані рекомбінантні штамі вирощували газonom і заливали катехолом, або 5-бром-4-хлор-3-індоліл-в-D-глюкоронідом (X-Gluc). Ми не виявили різниці у забарвленні міцелію між штамом дикого типу і штамом із геном катехолоксигенази після обробки катехолом, що унеможливує застосування *xylE* як репортера в *A. teichomyceticus*. У той же час репортерна система на основі гена *gusA* виявилась функціональною, оскільки штамі, що містив цей ген, набув яскраво-синього кольору вже через 5 хв після обробки X-Gluc, у той же час газон штаму дикого типу, на який був нанесений цей субстрат, не змінив свого забарвлення навіть протягом п'яти діб.

Застосування репортерного гена *gusA* в *A. teichomyceticus* дало змогу оцінити силу низки індукцибельних та конститутивних гетерологічних промоторів у цьому штамі і вибрати найбільш активні. Ми проаналізували активність 9 промоторів: гена *tipA* із *S. lividans*, експресія якого індуктується тіострептоном, гена стійкості до апраміцину *aac(3)IV* із *Klebsiella pneumoniae*, гена стійкості до еритроміцину *ermE* із *Saccharopolyspora erythraea*, гліцеролового оперону *gylP1/P2* із *S. coelicolor*, гена NDP-гексозо-епімерази *moeE5* із *S. ghanaensis*. Ми

також використали промотори регуляторних генів *cdaR*, *wblA* та *actII-R4 S. coelicolor*, а також синтетичний промотор P72. Серед них лише промотори гена стійкості до еритроміцину, апраміцину, а також P72 є конститутивними. Кожен із перелічених промоторів злили з репортерним геном *gusA* у складі інтегративного вектора pSET152 і перенесли в штамі дикого типу *A. teichomyceticus*. Оцінку сили промоторів здійснювали за глюкуронідазною активністю отриманих рекомбінантних штамів. Отримані дані свідчать про те, що промотор шлях-специфічного регуляторного гена *actII-R4* з кластеру генів біосинтезу актинородину є найсильнішим, тоді як промотори гліцеролового оперону та гена *moeE5* характеризуються середньою силою. Широковживані в клітинах стрептоміцетів промотори генів *tipA* та *ermE* в середньому в 2,5 рази слабші, ніж промотор гена *moeE5*. Найслабшим виявився синтетичний промотор P72 [8].

Створена нами репортерна система для *A. teichomyceticus* ефективна, проста в застосуванні, високочутлива і не потребує для аналізу складного обладнання. Охарактеризована бібліотека включає промотори різної сили, які можуть бути використанні з метою надекспресії певних генів. У свою чергу, слабкий промотор може застосовуватися для експресії генів, що кодують потенційно токсичні білки.

Використання генів-регуляторів і гетерологічних промоторів для конструювання штамів *A. teichomyceticus* – надпродуцентів тейкопланіну. До кластеру генів біосинтезу тейкопланіну (*tcp*-кластеру) входять гени, що контролюють етапи біосинтезу молекули антибіотика, гени стійкості до власного антибіотика, а також регуляторні гени. Ми виявили два потенційні шлях-специфічні регуляторні гени: *tcp28* і *tcp29*, що кодують білки родин StrR і LuxR, відповідно. За допомогою таких біоінформатичних методів як моделювання вторинної та третинної структури цих білків (HHPred), пошук гомологів і порівняння з ними (Blastp, delta-blast) ми з'ясували, що Tcp28 і Tcp29 містять потенційні ДНК-зв'язувальні, а також сигнальні домени. Ці дані свідчать про те, що Tcp28 і Tcp29 можуть брати участь у регуляції експресії генів *tcp*-кластера на транскрипційному рівні. Відомо, що у представників роду *Streptomyces* білки цих родин зазвичай задіяні в позитивній регуляції біосинтезу вторинних метаболітів. Уведення додаткових копій таких генів у штамі дикого

типу часто зумовлює зростання продукції антибіотиків, синтез яких вони контролюють [9]. Базуючись на цих даних, ми припустили, що продукти генів *tcp28* і *tcp29* є позитивними регуляторами продукції тейкопланіну, а маніпуляції з ними можуть впливати на його біосинтез.

Ми вирішили розробити нові підходи для отримання штамів *A. teichomyceticus* із підвищеним синтезом тейкопланіну, які б базувалися на методах генетичної інженерії. З цією метою ген *tcp28* злили з трьома різними гетерологічними промоторами, активність яких ми попередньо вивчали: *aac(3)IVp*, *moeE5p* та *actII-R4p*. Такі конструкти клонували в інтегративний вектор pSET152, що має один сайт інтеграції в хромосомі та вносить лише одну додаткову копію гена *tcp28*. Отримані плазмиди перенесли в клітини дикого типу і проаналізували біосинтез тейкопланіну рекомбінантними штамми. Виявилось, що штам, який містив ген *tcp28* під контролем апраміцинового промотора продукував у 8 разів більше тейкопланіну, ніж штам дикого типу. Натомість інші штамми, в яких цей самий ген був під контролем *moeE5p*, або *actII-R4p* синтезують у 1,6 та 2,8 рази більше антибіотика, відповідно, ніж дикий тип. Попри те, що *actII-R4p* є активнішим у штамі *A. teichomyceticus*, ніж *aac(3)IVp*, все ж злиття останнього із геном-регулятором має кращий ефект на рівень синтезу антибіотика. Це може бути пов'язано з тим, що злиття дуже сильного промотора з геном-регулятором може мати певний негативний вплив на клітину. Такі ефекти раніше описані для промотора гена стійкості до еритроміцину – одного із найсильніших стрептоміцетних промоторів. Підсумовуючи отримані дані, можна зробити висновок, що найкраще зливати досліджувані регуляторні гени з промотором гена стійкості до апраміцину *aac(3)IVp*. Ми спробували також провести транскрипційне злиття гена *tcp29* із цим промотором. Отриманий конструкт клонували в вектор pSET152 і експресували в *A. teichomyceticus*. Аналіз вторинних метаболітів

у рекомбінантному штамі виявив зростання синтезу в середньому в 10 разів у порівнянні з контролем.

Оскільки уведення лише однієї додаткової копії обох генів-регуляторів приводить до суттєвого зростання продукції тейкопланіну, ми вирішили вивчити вплив на продукцію антибіотика більшої кількості копій згаданих генів. З цією метою використано реплікативний олігокопійний вектор pKC1139. Гени *tcp28* і *tcp29* під контролем *aac(3)IVp* клонували в цей вектор та експресували в штамі *A. teichomyceticus*. Обидва рекомбінантні штамми характеризувалися зростанням продукції тейкопланіну від 30 до 40 разів порівняно з контрольним штамом, що містив лише вектор, або з штамом дикого типу. Таким чином, застосувавши опрацьований підхід, нам вдалося підняти синтез антибіотика від 100 мг л⁻¹ до 3–4 г л⁻¹. Ми припускаємо, що цей генетичний підхід може бути ефективним і для підняття рівня синтезу тейкопланіну у вже існуючих промислових штаммах-надпродуцентах. Наші дані доводять, що зміна експресії регуляторних генів шляхом заміни власних промоторів на більш оптимальні гетерологічні, а також підбір відповідних векторів – це перспективний підхід до отримання штамів із підвищеним рівнем синтезу тейкопланіну. Суттєве зростання рівня біосинтезу тейкопланіну було досягнуте внаслідок одноетапного експерименту, а не декількох послідовних етапів мутагенезу і відбору, як це відбувається при традиційній селекції. Окрім того, цей підхід не призводить до виникнення небажаних додаткових мутацій, що часто трапляється у ході індукованого мутагенезу, і дає більш передбачуваний результат.

Висновки

Використовуючи розроблені нами генно-інженерні підходи, сконструйовано низку штамів *A. teichomyceticus* із підвищеним рівнем продукції тейкопланіну.

Ця робота підтримана грантом МОН України Бз98Ф (для В.О. Федоренка) і грантом DAAD – A/13/03150 (для Л.О. Горбаль).

Література

1. Li T.L., Huang F., Haydock S.F., Mironenko T., Leadlay P.F., Spencer J.B. Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin: characterization of two glycosyltransferases and the key acyltransferase // Chem. Biol. – 2004. – N 11. – P. 107–119.
2. Sosio M., Kloosterman H., Bianchi A., de Vreugd P., Dijkhuizen L., Donadio S. Organization of the teicoplanin gene cluster in *Actinoplanes teichomyceticus* // Microbiology – 2004. – N 150. – P. 95–102.
3. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. – 2000.

4. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Gromyko O., Ostash B., Rebets Y., Bechthold A., Fedorenko V. IncP plasmids are most effective in mediating conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* // *Genetica*. – 2006. – N 42. – P. 595–601.
5. Horbal L., Ziburannyy N., Ostash B., Shulga S., Fedorenko V. Manipulating the regulatory genes for teicoplanin production in *Actinoplanes teichomyceticus* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2012. – N 28. – P. 2905–2100.
6. Wagner N., Osswald C., Biener R., Schwartz D. Comparative analysis of transcriptional activities of heterologous promoters in the rare actinomycete *Actinoplanes friuliensis* // *J. Biotechnol.* – 2009. – N 142. – P. 200–204.
7. Myronovskyy M., Welle E., Fedorenko V., Luzhetskyy A. β -Glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – N 77. – P. 5370–5383.
8. Horbal L., Kobylyanskyy A., Yushchuk O., Ziburannyy N., Luzhetskyy A., Ostash B., Marinelli F., Fedorenko V. Evaluation of heterologous promoters for genetic analysis of *Actinoplanes teichomyceticus*-Producer of teicoplanin, drug of last defense // *J. Biotechnol.* – 2013. – N 168. – P. 367–372.
9. van Wezel P.G., McDowall J.K. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances // *Nat. Prod. Rep.* – 2011. – N 28. – P. 1311–1333.

HORBAL L.O.¹, YUSHCHUK O.S.¹, ZABURANNYY N.¹, KOBLYANSKYI A.M.², OSTASH B.O.¹, MARINELLI F.², LUZHETSKYY A.M.³, FEDORENKO V.O.¹

¹ *Ivan Franko national university of Lviv,*

Ukraine, 79005, Lviv, Hrushevskogo str., 4, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

² *Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria,*

Varese, Italy

³ *Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland,*

Germany, Saarbrücken

GENE ENGINEERING METHODS FOR THE CONSTRUCTION OF THE ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS STRAINS WITH INCREASED LEVEL OF TEICOPLANIN PRODUCTION

Aims. Random mutagenesis and selection were extensively applied to teicoplanin producers, while the gene engineering methods were not used, because of the paucity of genetic tools for *A. teichomyceticus*. **Methods.** A set of microbiological, biochemical and genetic methods were used in the study. **Results.** We worked out an effective method of transfer of integrative and replicative vectors in *A. teichomyceticus* by means of conjugation. Successful adaptation of the *gusA* reporter for the use in this strain let us to estimate the strength of different heterologous promoters that might be used for gene expressions in it. Several strains with in average 30–40 times increased level of teicoplanin production in comparison to the wild type were obtained. **Conclusions.** Based on the obtained results we proposed a new approach for the improvement of teicoplanin production.

Key words: *Actinoplanes*, teicoplanin, conjugation, reporter system, overproducer.

УДК 577.21: 57.085.1:577.233.3:633.11

ГОРБАТЮК І.Р., БАВОЛ А.В., МОРГУН Б.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ *IN PLANTA* ПШЕНИЦІ ОЗИМОГО СОРТУ ПОДОЛЯНКА ТА ЯРОГО СОРТУ ВОВНІТЕ

На даний час у молекулярній біології рослин науковці значну увагу приділяють розвитку методів трансформації, що дозволяє запобігти довготривалим процедурам отримання культури тканин. Останні досягнення у сфері генетичної трансформації показали, що можливе отримання трансгенних рослин без будь-яких процедур *in vitro*. У 1998 р. Bechtold зі співавторами [1] запропонували новий метод

трансформації, названий трансформація *in planta*.

Однією із проблем трансформації *in vitro*, яка пов'язана з регенерацією, є химерність отриманих трансформантів і соматональна мінливість. Для однодольних рослин регенерація ускладнюється ще й низьким морфогенетичним потенціалом, що у деяких випадках не дозволяє отримати фертильні