

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., Kobylanskyy 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

рослини [2].

Технологія агробактеріальної трансформації *in planta* дозволяє подолати наведені вище труднощі під час отримання трансгенних рослин шляхом трансформації клітин інтактною рослини [3].

З огляду на зазначене вище, метою нашої роботи було провести агробактеріальну трансформацію пшениці озимого сорту Подолянка [4] та ярого сорту іноземної селекції Bobwhite в умовах *in planta*.

Матеріали і методи

Колоски рослин, які були вибрані для трансформації *in planta*, у довжину становили приблизно 6–7 см і ще не повністю вийшли з прапорцевого листка [5, 6]. Проводили каstrування, залишаючи по 12–14 колосочків. Після закінчення на кожний колосок вдягався індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу. Через 3 доби проводили інокуляцію суспензією агробактерії. Однодобову суспензійну культуру наносили на приймочки маточок та проводили запилення після повного висихання розчину.

У дослідженні використовувалася генетична конструкція p014 в *Agrobacterium tumefaciens* штамі AB1 (рис. 1). Бактерія нарощувалася у рідкому живильному середовищі Himedia M002 (аналог LB) з відповідними антибіотиками (спектиноміцин 50 мг/л та канаміцин 100 мг/л) [7] на шейкері протягом 16 годин. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 5000×g 10 хв. і ресуспендували у стерильній дистильованій воді до оптичної щільності OD₆₀₀ = 1,0 [3, 5–7]. До суспензії бактерій додавали 100 мкМ acetosyringone [5, 6] та 0,05 % Silvet L77, рН доводилося до 4,0 [2].

Отримане насіння, у випадку Bobwhite, обробляли протруйником Максим Стар 025 FS (Сінгента), пророщували на фільтрувальному папері [7]. Проростки були висаджені у вегетаційні посудини. У випадку озимого сорту Подолянка насіння висаджувалося

безпосередньо у посудини з ґрунтом і культивувалося у тепличних умовах.

Зелений матеріал аналізували полімеразною ланцюговою реакцією (ПЛР) на присутність трансгену *nptII*. Для цього використовувалися праймери: форвардний – 5'-CCT-GAA-TGA-ACT-CCA-GGA-CGA-GGC-A-3' та реверсний – 5'-GCT-CTA-GAT-CCA-GAG-TCC-CGC-TCA-GAA-G-3', очікуваний фрагмент становив 647 п.н. [8].

Результати та обговорення

Кастрували та обробляли агробактеріальною суспензією 12 колосків сорту Bobwhite. З них нами отримано 13 насінин із 72 можливих. Середня зав'язуваність становила 18,0 % (рис. 2). Одержане насіння було поміщене у чашки Петрі для проростання без періоду спокою. Приблизно через 3 тижні з'явилися проростки, які були перенесені у вегетаційні посудини об'ємом 0,65 л.

Після того, як рослини вкоренилися, частину одного з листків зрізали для виділення загальної ДНК та ПЛР аналізу.

Паралельно проводилася робота з озимим сортом Подолянка, наданим Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України. Загалом було кастровано 24 колоски, проведено обробку агробактерією і запилено власним пилком відповідно до зазначеної методики. Після завершення вегетаційного періоду отримано 293 насінини з 620 можливих. За нашими спостереженнями середня зав'язуваність насіння складала 46,4 % (табл.).

Отримане насіння відзначалося виповненістю і задовільним зовнішнім виглядом (рис. 3).

Зерна T₀ висаджувалися у вегетаційні посудини по 2 зернини, і культивувались в умовах теплиці за температури 22 °C і 16-годинного фотоперіоду. Після того, як рослини досягли фази двох листків, частину одного з них зрізали для проведення ПЛР-аналізу.



Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції p014. Показано кодуючі послідовності генів неоміцин фосфотрансферази (*nptII*) та зеленого флуоресцентного білку (GFP), підсилений промотор вірусу мозаїки цвітної капусти (P35e), термінатори нопалінсинтази (Tnos) і білку теплового шоку (Thsp), плечі Т-ДНК (RB, LB)

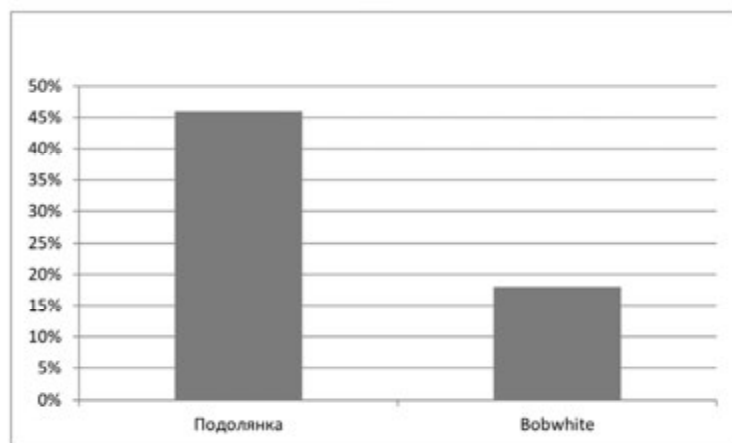


Рис. 2. Зав'язуваність насіння у досліджуваних сортів

Таблиця. Зведені дані мінімальної та максимальної кількості очікуваного і отриманого насіння, відсоток зав'язуваності

Кількість насінин			Зав'язуваність насіння, %
	всього отримано	максимально можлива	
	293	620	
min	1	18	3,6
max	23	30	88,5
Середнє значення % зав'язуваності			46,4
Середня довжина колоса, см			5,9

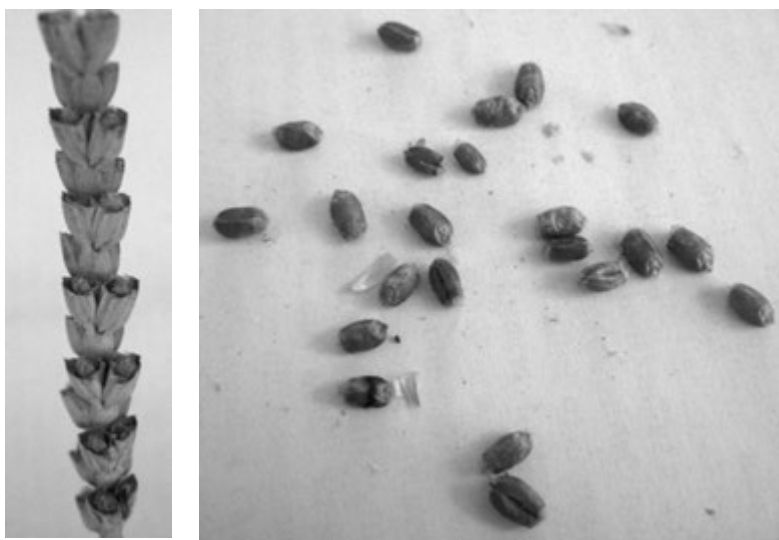


Рис. 3. Типовий колосок та насіння, отримане після обробки *in planta* агробактеріальною суспензією

За результатами ПЛР на присутність трансгену *nptII* із 12-ти протестованих проб сорту Bobwhite позитивних сигналів не виявлено.

Із 30 проб сорту Подольнка, тільки у чотирьох (48А, 51А, 56А, 57В) виявлено позитивний сигнал присутності *nptII* трансгену (рис. 4).

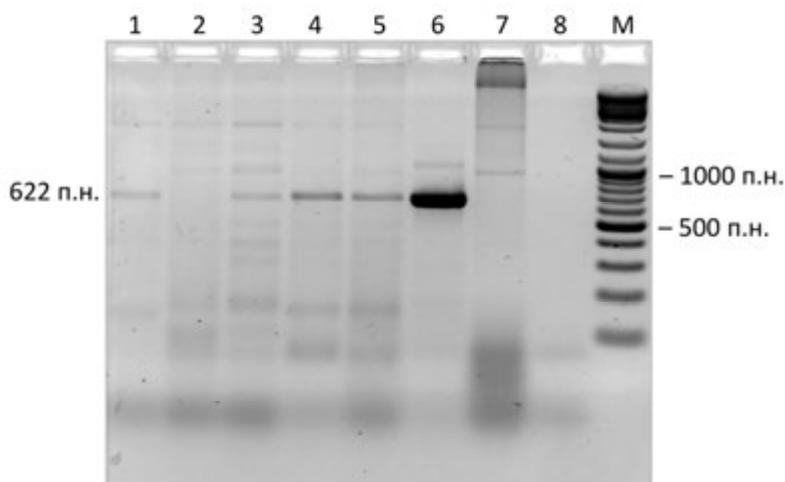


Рис. 4. Електрофореграма проб озимого сорту пшениці Подолянка на присутність послідовності трансгену *nptII*. Доріжки 1-5 – досліджувані проби 57В, 62В, 56А, 48А, 51А відповідно, 6 – позитивний контроль, *N. tabacum* трансформований конструкцією p014, 7 – нетрансформована пшениця сорту Подолянка у якості негативного контролю, 8 – негативний контроль (ТЕ буфер), М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

Слід зазначити, що температура навколишнього середовища може мати вирішальне значення на перебіг процесу трансформації і суттєво впливати на його ефективність. Не завжди можна ефективно контролювати цей параметр. Нами було помічено, що під час обробки колосків пшениці сорту Подолянка температура навколишнього середовища становила 17–18 °С, а в процесі обробки колосків пшениці ярого сорту іноземної селекції Bobwhite – 22–25 °С.

Таким чином, було проведено агробактеріальну трансформацію *in planta* озимого сорту Подолянка та ярого Bobwhite. Для ефективного перебігу трансформації та забезпечення життєдіяльності агробактерій важливо, щоб температура навколишнього середовища була нижчою 28 °С протягом

наступних 18 годин. У випадку сорту Подолянка було зібрано 293 насінини з 620 можливих, що становить 46,4 %. Аналіз отриманих форм за допомогою ПЛР дозволив виявити 4 чітких позитивних сигнали на присутність трансгена *nptII*, що становить 13,3 % від загальної кількості протестованого матеріалу. Разом з тим було отримано 13 насінин сорту Bobwhite із 72 можливих, що становить лише 18,0% зав'язуваності. Подальша перевірка рослинного матеріалу на присутність трансгенних послідовностей дала негативний результат. Ймовірно, що у даному випадку саме висока температура навколишнього середовища під час нанесення бактеріальної суспензії була критичним фактором і вчинила негативний вплив на процес агробактеріальної трансформації *in planta*.

Література

1. Bechtold N., Pelletier G. *In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis*. – 266.
2. Curtis I.S., Nam H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. Longipinnatus Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency // *Transgenic Research* – 2001. – 10. – P. 363–371.
3. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* // *Биотехнология*. – 2012. – № 1. – С. 8–20.
4. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів // *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць* – 2011. – 11. – С. 237–241.
5. Agarwal S., Loar S., Steber C.M., Zale J. Floral transformation of wheat // *Methods in Molecular Biology. Transgenic Wheat, Barley and Oats*. – 2009. – 478. – P. 105–113.
6. Zale J.M., Agarwal S., Loar S., Steber C.M. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell Rep.* – 2009. – N 28. – P. 903–913.
7. Supartana P., Shimizu Ts., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2006. – 102, N 3. – P. 162–170.

8. Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Shim D. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // J. of Biological Chemistry. – 2008. – 283 (23). – P. 15893–15902.

GORBATYUK I.R., BAVOL A.V., MORGUN B.V.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnoho str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

AGROBACTERIUM-MEDIATED *IN PLANTA* TRANSFORMATION OF WINTER WHEAT CV. PODOLYAKA AND SPRING WHEAT CV. BOBWHITE

Aims. *Triticum aestivum* L., being one of the world's most important staple crops, remains a challenge for genetic transformation. This paper describes the application of *in planta* method to obtain transformants by treating cells of intact plants with argobacterium. **Methods.** Analysis of the plant material for the presence of *nptII* transgene was carried out using polymerase chain reaction (PCR). **Results.** Fresh agrobacterium containing vector p014 was transferred into spikes of wheat. There were 13 seeds (18.0 %) collected of cv. Bobwhite out of 72 possible from 12 spikes and 293 seeds (46.4 %) of cv. Podolyanka out of 620 possible from 24 spikes. Based on the results of PCR for the presence of *nptII* transgene there were no positive signals found for the cv. Bobwhite. On the other hand there were 4 clear positive samples detected for cv. Podolyanka indicating the presence of *nptII* sequence. **Conclusions.** *Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation was conducted for winter cv. Podolanka and spring cv. Bobwhite. The ambient temperature below 28 °C during the next 18 hours after agrobacterium application was crucial. Tested probes of cv. Podolyanka (13.3 %) were positive for the presence of transgene *nptII*.

Key words: wheat, transformation, *nptII*, agrobacterium, GFP.

УДК 167.33:616.36-004+599.323.41

ГУЛЬКО Т.П.^{1,5}, ДРАГУЛЯН М.В.¹, ДЕРЯБИНА Е.Г.^{1,5}, КОРДИУМ В.А.¹, ЛЕВКИВ М.Ю.², БУБНОВ Р.В.^{3,4}

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,*

Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua

² *Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка,*

Украина, 01601, г. Киев, ул. Владимирская, 64/13

³ *Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,*

Украина, 03143, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 154

⁴ *Центр ультразвуковой диагностики и интервенционной сонографии Клинической больницы «Феофания» Государственного Управления делами,*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 21

⁵ *ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ»,*

Украина, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, 67

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ПОВРЕЖДЕНИЯ, КОМПЕНСАЦИИ И ПРИСПОСОБЛЕНИЯ В ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ CCl₄

Многие заболевания печени характеризуются наличием воспалительного процесса, при котором происходит интенсивное отмирание гепатоцитов, в результате чего орган теряет свои функции. Однако следует заметить, что многие авторы при комплексном лечении заболеваний печени рассматривают компенсаторно-приспособительные (адаптивные) реакции. К таким реакциям исследователи относят регенерацию, гипертрофию и перестройку тканей [1, 2]. В связи с этим,

актуальным представляется исследование повреждения печени на экспериментальной модели, индуцированной четыреххлористым углеродом (CCl₄), а также изучение регенеративной способности в измененной печени на протяжении 2 месяцев после окончания затравки токсином.

Материалы и методы

Исследования проведены на 20 мышцах-самцах линии ICR, которые в начале эксперимента были разделены на 3 группы.