

УДК 579.253.2 : 579.873.71 : 579.253.4

ВАРІАТИВНІСТЬ ФЕНОТИПОВИХ ОЗНАК ТРАНСФОРМАНТІВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-б/п

Л.В. ПОЛІЩУК, О.П. КОПЕЙКО, В.В. ЛУК'ЯНЧУК

Інститут мікробіології і вірусології НАН України

Україна, Київ МСП, Д03680, вул. Академіка Заболотного, 154

e-mail: polischuk@serv.imv.kiev.ua

Мета. Метою досліджень було визначення стабільності успадкування ряду ознак у 36 трансформантів, що містили гібридні плазмідні ДНК. **Методи.** Стабільність успадкування морфологічних ознак (споруляція та забарвлення) трансгенних культур вивчали візуально. Антибіотичну активність культур визначали, використовуючи мікробіологічні методи. Властивості метаболітів (антибіотиків та каротиноїдів) досліджували за допомогою тонкошарової хроматографії та спектрометрії. **Результати.** Реципієнтний штам *Streptomyces globisporus* 1912-б/п – це стабільна спорулююча незабарвлена культура, яка не продукує ні антибіотичних речовин, ні каротиноїдів. Виявлено одночасні зміни кількох фенотипових ознак реципієнта в 72% досліджених трансформантів. **Висновки.** Встановлено, що генам, які детермінують досліджувані фенотипові ознаки, властива підвищена мутабельність.

Ключові слова: *Streptomyces*, трансформант, фенотипова ознака, мутація, генетична нестабільність.

Вступ. Згідно з даними літератури, генетична нестабільність – це широко поширене явище серед мікроорганізмів [1]. Однак для представників роду *Streptomyces* характерна найбільша варіабельність хромосомної ДНК [1–5]. Встановлено, що рівень нестабільності геному пропорціональний рівню мінливості природних умов існування мікроорганізму [5]. Серед стрептоміцетів, у яких досліджувалася варіабельність генотипів, переважають штами-продуценти антибіотиків. Найбільшої уваги приділялося генам, що детермінують синтез антибіотика та стійкість до нього [5–8].

Крім того, зміни генетичного матеріалу мікроорганізмів можуть бути індуковані експериментально [5–7]. Як відомо, індукований мутагенез хромосомної ДНК клітин спричиняється дією хімічних, фізичних та біологічних мутагенів. Процедура отримання протопластів вважають фізичним фактором мутагенезу, в той час як введення плазмідної ДНК під час трансформації розглядають як біологічний мутагенез [6, 7]. Встановлено, що такі маніпуляції можуть призвести до появи як очікуваних генотипних і фенотипових змін регенованих та трансформованих клітин, так і до небажаних та неочікуваних мутацій [5–9].

Біотехнологія – це новий напрямок у діяльності людства, що дає змогу цілеспрямовано змінювати генотипи різних організмів (мікроорганізмів, рослин, тварин). Успіх роботи, що має на меті поліпшення властивостей організмів, гарантується стабільним успадкуванням усіх властивостей трансгенної

© Л.В. ПОЛІЩУК, О.П. КОПЕЙКО, В.В. ЛУК'ЯНЧУК, 2012

культури як набутих внаслідок генно-інженерних маніпуляцій, так і властивих організму реципієнта. Однак у процесі досліджень та практичного використання мають місце зміни фенотипічних і генотипних характеристик трансгенних організмів (наприклад, рослин, дріжджів чи стрептоміцетів) [10–15]. Таким чином, важливим та актуальним є вивчення таких змін. Встановлено, що причиною припинення експресії генів може бути їхнє замовкання, інтеграція гібридної конструкції в хромосому, її неточна ексцизія та ряд інших [10, 11]. Небажаним є також і поява нових незапланованих властивостей трансформованих організмів, які, наприклад, у мікроорганізму-продуцента біологічно активної сполуки можуть призвести до часткової або повної втрати біосинтетичної активності [7, 12–15].

Метою роботи було дослідження змін морфологічних, культуральних і біосинтетичних властивостей 36 трансформантів *Streptomyces globisporus* 1912-б/п, що містили гібридні плазмиди, побудовані на основі векторів pWHM4 та pAX5a.

Матеріали і методи

Штами стрептоміцетів, що були використані в роботі, подані у таблиці 1.

При виконанні роботи застосовували агаризовані середовища: картопляне, соєве, Гаузе 1 та Оканіші [16–18]. Середовище Оканіші, що містило антибіотик тіострептон у концентрації 50 мг/мл, використовували для збереження трансформантів, синтетичне середовище Гаузе 1 – при дослідженні антибіотичної активності.

Здатність продукувати антибіотичні речовини досліджували накладанням 5-денних блоків, що вирощували газонно на агаризованому соєвому середовищі, на свіжонанесені газони 7 тестерних культур стрептоміцетів: *S. griseus* 3934, *S. coelicolor* A3(2), *S. olivaceus* VKX, *S. griseus* Б6, *S. lividans* 1326, *S. levoris* 165, *S. globisporus* 1912-б/п (реципієнт) [19]. Дослідження складу комплексу синтезованих культурами стрептоміцетів метаболітів із антибіотичною активністю проводили згідно з описаними методиками [17, 20]. Склад комплексу метаболітів досліджували за допомогою ТШХ на пластинках Cromatofolhas AL TLC Silicagel 60F фірми «Merck». Спектри поглинання метаболітів визначали в УФ- та видимому світлі методом спектрофотометрії (Beckman DU-8B).

Таблиця 1. Культури стрептоміцетів, які було використано у дослідженнях

Культури стрептоміцетів	Характеристика культур	Джерело отримання
ТрS5, ТрS6, ТрS9, ТрS15, ТрS19, ТрS20, ТрS21, ТрS22, ТрS23, ТрS24, ТрS25, ТрS26, ТрS27, ТрS28, ТрS29, ТрS32, ТрS33, ТрS34, ТрS47, ТрS48, ТрS50, ТрS52, ТрS61	Трансформанти, що містять гібридні плазмиди, побудовані на базі вектора pAX5a	Отримано при виконанні комплексної програми ВБФМБ НАНУ, державний реєстраційний номер теми: 0107U011129.
ТрS7, ТрS8, ТрS11, ТрS13, ТрS16, ТрS18, ТрS30, ТрS38, ТрS43, ТрS44, ТрS45, ТрS51, ТрS60	Трансформанти, що містять гібридні плазмиди, на базі вектора pWHM4	Музей відділу генетики мікроорганізмів ІМБ НАНУ
<i>S. griseus</i> 3934, <i>S. coelicolor</i> A3(2), <i>S. olivaceus</i> VKX, <i>S. griseus</i> Б6, <i>S. levoris</i> 165, <i>S. lividans</i> 1326, <i>S. globisporus</i> 1912-б/п (реципієнт)	Тестерні культури	

Результати та обговорення

Штам *S. globisporus* 1912 виділено у 1970 році зі зразка ґрунту, відібраного в сільськогосподарських угіддях Вірменії [18]. Встановлено, що цей штам є продуцентом нового протиракового антибіотика ландоміцину Е. Спонтанно від вихідної культури було отримано ряд похідних, зокрема й безплазмідний споруючий варіант (*S. globisporus* 1912-б/п), що втратив здатність синтезувати антибіотик ландоміцин Е [16, 18].

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції ампліфіковано 1,1 тпн-фрагмент хромосоми *S. coelicolor* А3(2), що містить ген SCO1206, який кодує білки субодиниць ферменту полікетидсинтази ІІІ типу. Амплікони вбудовано в човникові вектори рWНМ4 та рАХ5а по сайтах HindIII та EcoRI, гібридними конструкціями трансформовано компетентні клітини *Escherichia coli* XL1 Blue. Деяких гібридних плазмід, що побудовані на базі як рWНМ4, так і рАХ5а, переклоновано у протопластах безплазмідного варіанта *S. globisporus* 1912-б/п [21]. Одразу після відбору всі тіострептонрезистентні трансгенні культури за фенотиповими ознаками були подібні до штаму-реципієнта. Однак при зберіганні трансформантів у селективних умовах спостерігали сегрегацію фенотипових ознак трансгенних культур. Після численних пересівів (до утворення візуально однорідних газонів культур) для подальших досліджень було відібрано 36 тіострептонрезистентних трансформантів *S. globisporus* 1912-б/п: із них 13 містили гібридні плазміди, побудовані на базі вектора рWНМ4, та 23 – сконструйовані на основі вектора рАХ5а. Визначено окремі фенотипові ознаки ряду трансформантів та музейних культур (табл. 2 та 3).

При визначенні максимумів поглинання комплексів метаболітів, що синтезувалися трансформантами, які містили плазміди, побудовані на базі різних векторів, також

було виявлено різницю в наявності піка в УФ частині спектра. Піки поглинання з максимумом 240 нм виявлено у трансформантів, що містили гібридні плазміди, побудовані на базі вектора рWНМ4.

Також встановлено, що деякі трансформанти (15 культур – 41,7%) отримали здатність пригнічувати тестерний штам *S. lividans* 1326, який не пригнічували ні донорний штам, ні реципієнтний, ні wild type штам *S. globisporus* 1912 (з якого було отримано останній) (табл. 2 та 3). Трансгенні культури, що утворювали стерильні зони на газоні *S. lividans* 1326, були виявлені як серед трансформантів, що містили плазміди, побудовані на базі вектора рАХ5а (12 культур – 52,2%), так і на базі рWНМ4 (3 культури – 23,1%). Зазначені культури були найактивнішими – їхні метаболіти пригнічували ріст від чотирьох до семи тест-культур стрептоміцетів. Хроматографічне розподілення екстрактів ряду трансформантів, побудованих на базі обох векторів, виявило ряд речовин (Rf 0,23 та 0,6), яких немає як у донорської, так і в реципієнтної культури.

Чотири трансформанти (TrS6, TrS8, TrS48, TrS50 – 11,1%), що не продукують пігментів, які б забарвлювали їх власний міцелій чи середовище, утворюють специфічні непрозорі зони на газонах окремих тест-культур. Одна із зазначених трансгенних культур містить плазмиду, яку сконструйовано на базі вектора рWНМ4 (TrS8).

При зберіганні трансформанту TrS16 виявлено розщеплення його фенотипу з утворенням чотирьох фенотипів: TrS16-Сс – синьо-червоні споруючі колонії; TrS16-Сн – синьо-червоні неспоруючі колонії; TrS16-Б – білі споруючі колонії, TrS16-Р – темно-рожеві неспоруючі колонії. Дослідження фізико-хімічними методами їхніх метаболітів дало змогу встановити, що синій пігмент, який синтезується TrS16-Сс та TrS16-Сн, – це ландоміцин Е; рожеві варіанти TrS16-Р1 та TrS16-Р2

Таблиця 2. Фенотипові ознаки трансформантів *S. globisporus* 1912-б/п, що містять гібридні плазмід-ди, побудовані на базі плазміди рАХ5а

Трансформанти	Досліджувані характеристики трансгенних культур		
	антибіотична активність	пігментація	споруляція
ТрS5	4/6* (1,2,4,5) **	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS6	4/7 (1,2,5,7)	Піг ⁻	Спо ⁺
ТрS9	7/7 (1-7)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS15	5/6 (2,4,5,6,7)	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS19	5/7 (2,3,4,5,7)	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS20	5/7 (2,3,4,5,7)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS21	6/6 (1,2, 4-7)	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS22	1/6 (4)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS23	6/6 (1,2, 4-7)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS24	7/7 (1-7)	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS25	7/7 (1-7)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS26	7/7 (1-7)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS27	0/7	Піг ⁻	Спо ⁺
ТрS28	7/7 (1-7)	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS29	6/7 (1,2,3,4,5,7)	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS32	5/7 (2,4,5,6,7)	Піг ⁺	Спо ⁻
ТрS33	4/7 (2,4,5,6)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS34	7/7 (1-7)	Піг ⁺	Спо ⁺
ТрS47	0/7	Піг ⁻	Спо ⁺
ТрS48	2/7 (1,2)	Піг ⁻	Спо ⁺
ТрS50	3/7 (1,3,4)	Піг ⁻	Спо ⁺
ТрS52	0/7	Піг ⁻	Спо ⁺
ТрS61	6/6 (1,2, 4-7)	Піг ⁺	Спо ⁺

Таблиця 3. Фенотипові характеристики використаних музейних культур

Штами стрептоміцетів	Досліджувані фенотипові ознаки музейних культур		
	антибіотична активність	пігментація	споруляція
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	5/7 (1,2,4,5,7)	Піг ⁺	Спо ⁺
<i>S. globisporus</i> 1912	6/7 (1,2,3,4,5,7)	Піг ⁺	Спо ⁺
<i>S. levoris</i> 165	0/7	Піг ⁻	Спо ⁺
<i>S. globisporus</i> 1912-б/п	0/7	Піг ⁻	Спо ⁺

П р и м і т к и до таблиць 2 та 3: * – активність культур стрептоміцетів (у чисельнику – кількість тестерних штамів стрептоміцетів, які пригнічуються стрептоміцетами; у знаменнику – кількість штамів стрептоміцетів, які використано як тестерні); ** – позначення тестерних штамів стрептоміцетів: 1 – *S. griseus* 3934, 2 – *S. globisporus* 1912-б/п (реципієнт), 3 – *S. coelicolor* A3(2), 4 – *S. olivaceus* VKX, 5 – *S. griseus* Б6, 6 – *S. lividans* 1326, 7 – *S. levoris* 165; Фенотипові ознаки: Спо⁺ – спорулююча та Спо⁻ – аспорогенна культури, Піг⁺ – забарвлення середовища та субстратного міцелію в синьо-червоний колір, Піг⁻ – відсутність пігменту.

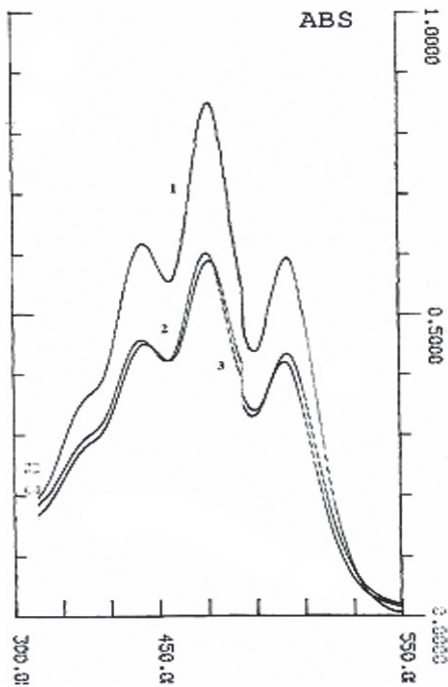


Рис. Спектри поглинання екстрактів варіантів *S. globisporus* (в ацетоні): 1 – 4Lcp; 2 – TpS16P-1; 3 – TpS16P-2. По осі абсцис – довжина хвилі, нм

синтезують суміш каротиноїдів, у якій лікопін є основним компонентом (див. рисунок).

Лікопінсинтезуючі варіанти (TpS16P-1, TpS16P-2) трансформанту TpS16 стабіль-

но підтримують отриманий фенотип (Lcp⁺ LndE⁻ Spo⁻) протягом 2 років.

Наведені вище результати досліджень ряду фенотипових ознак 36 трансформантів *S. globisporus* 1912-б/п (табл. 2 та 3) дали можливість розподілити їх на чотири групи (табл. 4).

Встановлено, що перша група є найбільшою групою – до неї віднесено третину всіх досліджених трансгенних культур 1912-б/п, а найменша кількість трансформантів входить до третьої групи (11,1%).

Крім того, серед трансформантів, що містили гібридні плазміди, побудовані на базі вектора pAX5a, переважали такі (86,9%), що продукували метаболіти з біоцидною активністю. Дев'ять із них утворювали прозорі стерильні зони на газонах усіх 7 використаних тест-культур стрептоміцетів.

Дослідження за допомогою фізико-хімічних методів (ТШХ та спектрофотометрія) екстрактів метаболітів ряду відібраних трансгенних культур дали змогу виявити різницю у складі синтезованих комплексів речовин: у культур з третьої та четвертої груп (14 трансформантів) не виявлено піків у видимій частині спектрів поглинання та встановлено наявність значно меншої кількості плям при розподіленні екстрактів за допомогою ТШХ. Максимум поглинання

Таблиця 4. Розподіл трансформантів *S. globisporus* 1912-б/п за їхніми фенотиповими характеристиками

№ групи	Фенотип культури	Номери трансформантів, що віднесені до груп	
		вектор pAX5a *	вектор pWHM4**
1	Спо ⁺ Піг ⁺ Ант ⁺ (33,3%)	TpS9, TpS20, TpS22, TpS23, TpS25, TpS26, TpS33, TpS34, TpS61	TpS11, TpS16, TpS60
2	Спо ⁺ Піг ⁺ Ант ⁺ (27,8%)	TpS5, TpS15, TpS19, TpS21, TpS24, TpS28, TpS29, TpS32	TpS7, TpS18
3	Спо ⁺ Піг ⁺ Ант ⁺ (11,1%)	TpS6, TpS48, TpS50	TpS8
4	Спо ⁺ Піг ⁻ Ант ⁻ (27,8%)	TpS27, TpS47, TpS52	TpS13, TpS30, TpS38, TpS43, TpS44, TpS45, TpS51

Примітки: Спо – споруляція; Піг – забарвлення середовища; Ант – антибіотична активність культур трансформантів; * – групи трансформантів, що містять гібридні плазміди, побудовані на базі вектора pAX5a; ** – групи трансформантів, що містять гібридні плазміди, побудовані на базі вектора pWHM4.

метаболітів 22 забарвлених трансформантів (1 та 2 групи) становив 458 нм.

Таке значення максимуму поглинання є близьким до максимуму поглинання антибіотика ландоміцину Е, який продукується вихідним штамом *S. globisporus* 1912. Як відомо, максимум поглинання антрациклінового антибіотика ландоміцину Е становить 456 нм, тоді як його похідних (окисленої та дегідратованої) форм – 440 та 502 нм [17].

Також встановлено, що більшість трансгенних культур з 1 та 2 груп (63,6%) отримали здатність пригнічувати ріст *S. lividans* 1326, який ні донор хромосомної ДНК (*S. coelicolor* A3(2)), ні реципієнт гібридних плазмід (*S. globisporus* 1912-б/п), ні вихідний штам *S. globisporus* 1912 не пригнічували.

Як відомо, такі експериментальні процедури, як отримання протопластів із клітин стрептоміцету та введення гетерогенної ДНК (плазмідної чи вірусної) – це маніпуляції, що найчастіше застосовуються при виконанні генно-інженерних та біотехнологічних робіт. Виявлено, що як протопластування, так і трансформація є причинами варіабельності генетичної інформації регенерованих клітин. Наслідком протопластування можуть бути не тільки зміни наявних у вихідній культурі властивостей, однак і виникнення нових [7]. Так, серед регенерантів штаму *S. galbus* (*F*) *subsp. achromogenes* 695 виявлено культури зі значними змінами у рівні синтезу та складі комплексу синтезованих антибіотичних речовин [6]. Також повідомляється, що внаслідок протопластування у штаму *S. setonii* ISP5395, який не продукував каротиноїди, було отримано мутант, що набув такої здатності [22].

Відомо, що як індуковані, так і спонтанні мутації призводять до змін здебільш у одних і тих же генах клітин мікроорганізмів [2, 4].

Як видно з наведених вище даних (табл. 2 – 4), спостерігали одночасні зміни двох чи трьох фенотипових ознак у відібраних ті-острептонрезистентних трансформантів: антибіотичній активності, споруутворенні та пігментації колоній. При зберіганні одного з трансформантів (TrS16) додатково виявлено темно-рожеві неспорулюючі колонії (TrS16-P). При дослідженні фізико-хімічними методами метаболітів трансформантів встановлено, що синій пігмент, який синтезується трансгенними культурами, – це ландоміцин Е; варіанти TrS16-P синтезують лікопін. Необхідно зазначити, що наші багаторічні дослідження реципієнтного штаму *S. globisporus* 1912-б/п не виявляли змін у його забарвленні, споруляції чи синтезі метаболітів з антибіотичною активністю, чи каротиноїдів.

Раніше нами виявлено та досліджено мутанти *S. globisporus* 1912, які набули здатності синтезувати каротиноїди в результаті як спонтанних, так і індукованих мутацій. Нашими попередніми дослідженнями показано, що кількість лікопіну, синтезованого мутантами (наприклад, 4Lcp), може сягати 80% від суми всіх каротиноїдів синтезованих ними при вирощуванні на повноцінних середовищах [20].

Ми вважаємо, що описані вище відмінності морфологічних характеристик і біосинтетичних можливостей трансформантів є проявом мутаційних змін генотипів трансгенних культур. Мутагенними факторами, на нашу думку, могли бути процеси отримання протопластів *S. globisporus*, їхня трансформація та не виключена можливість не пов'язаних із зазначеними генно-молекулярними маніпуляціями спонтанних мутацій.

Встановлено, що мутації хромосомної ДНК у одного й того ж штаму мікроорганізму, незалежно від способу їхнього отримання, змінюють одні й ті самі гени. Однак, якщо спонтанні зміни виявляються у 0,1% спор, то індуковані зміни – виявлені більш

ніж у 25% клітин [2, 4]. Крім того, показано, що внаслідок мутагенезу можуть бути зміни двох чи більше генів мікроорганізмів одночасно [3, 4].

У відділі генетики мікроорганізмів ІМБ НАНУ накопичено велику колекцію мутантів *S. globisporus* 1912 як індукованих, так і спонтанних, у яких виявлено зміни рівня синтезу антибіотика ландоміцину Е, втрату споруутворення та появу синтезу каротиноїдів. Як визначено, мутації часто призводять до одночасних змін кількох ознак *S. globisporus* 1912. Так, мутант 1912/3-1 внаслідок спонтанних мутацій почав синтезувати антибіотик ландоміцин Е в 10–15 разів більше, ніж вихідна культура, та втратив здатність до споруутворення. Інші ж неспорулюючі мутанти (В2, В1 та А2) втратили здатність синтезувати антибіотик. Також відібрано ряд мутантів *S. globisporus* 1912, що набули здатність синтезувати каротиноїди й одночасно втратили здатність утворювати спори (4Crt, 6Crt, 7Crt, 3R) [16 – 18, 20, 23].

Однак не виявлено прямого зв'язку між синтезом антибіотичних речовин та каротиноїдів. Наприклад, мутант 7Crt продукує одночасно і антибіотик ландоміцин, і каротиноїди лікопін та бета-каротин [20, 23], тоді як інші (4Crt) не продукують антибіотик. Необхідно зазначити, що всі варіанти *S. globisporus* 1912, що синтезують каротиноїди, незалежно від способу їхнього отримання, є неспорулюючими культурами.

Є необхідність подальших досліджень зв'язку втрати здатності до споруутворення та синтезом каротиноїдів, бо, крім можливого впливу на дані фенотипові характеристики мутацій певних генів, є вірогідність впливу на процес цитодиференціації змін будови поверхневих структур повітряного міцелію стрептоміцету внаслідок накопичення каротиноїдів.

Іншими дослідниками виявлено одночасну втрату мутантами таких фенотипо-

вих ознак, як споруутворення та синтез певних метаболітів у деяких стрептоміцетів (*S. griseus*, *S. coelicolor* А3(2) та *S. bikiniensis*). Наприклад, у *S. griseus* повідомлялося про одночасну втрату мутантами споруляції та здатності продукувати антибіотик стрептоміцин, а неспорулюючий мутант *S. coelicolor* А3(2) не синтезує антибіотиків актинородину та продигіозину [8, 9].

Висновки

Встановлено, що у більшості отриманих трансформантів (72,2%) при зберіганні під селективним тиском мали місце одночасні зміни двох чи більше фенотипових ознак реципієнта *S. globisporus* 1912-б/п: споруутворення, синтезу каротиноїдів та антибактеріальної активності. Узагальнюючи отримані дані, можна зробити висновок, що фрагмент хромосоми штаму *S. globisporus* 1912, на якому локалізовані гени, які детермінують досліджувані фенотипові ознаки, характеризується підвищеною мутабельністю.

Перелік літератури

1. Fischer G., Kyriacou A., Decaris B., Leblond P. Genetic instability and its possible evolutionary implications in the chromosomal structure of *Streptomyces* // Biochimie. – 1997. – Vol. 79, № 9–10. – P. 555 – 558.
2. Birch A., Hausler A., Hutter R. Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172, № 8. – P. 4138 – 4142.
3. Dharmalingam K., Cullum J. Genetic instability in *Streptomyces* // J. Biosciences. – 1996. – Vol. 21, № 3. – P. 433 – 444.
4. Voff J.-N., Altenbuchner J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome // Mol. Microbiol. – 1996. – Vol. 27, № 2. – P. 239 – 246.
5. Voff J.-N., Vandewiele D., Decaris B. Stimulation of genetic instability and associated large genomic rearrangements in *Streptomyces ambofaciens* by three fluoroquinolones // Antimicrob. Agents Chemother. – 1994. – Vol. 38, № 9. – P. 1984 – 1990.
6. Йочева Л.Д., Антонова-Николова С.К. Влияние протопластирования на антибиотическую

- активність і склад актиномицинового комплексу штамма *Streptomyces galbus* (F) *subsp. achromogenes* 695 і його активних варіантів // Антибіотики і хіміотерапія. – 2000. – Т.5, № 4. – С.10 – 13.
7. Baltz R.H. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Trends Microbiol. – 1998. – Vol. 6, №2. – P.76 – 83.
 8. Hara O., Horinouchi S., Uozumi T., Beppu T. Genetic analysis of A-factor synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus* // J. Gen. Microbiol. – 1983. – Vol. 129, №9. – P.2939 – 2944.
 9. Horinouchi S., Hara O., Beppu T. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans* // J. Bacteriol. – 1983. – Vol. 155, №3. – P.1238 – 1248.
 10. Дейнеко Е.В., Новоселя Т.В., Загорская А.А. и др. Инактивирование чужеродных генов у трансгенных растений табака (обзор) // Изучение генома и генетическая трансформация растений. – Новосибирск: Наука, 2001. – С. 132 – 142.
 11. Юзбашев Т.В., Соболевская Т.И., Тихонова Е.Ю. и др. Интегративный вектор Random-URA3-RPT для последовательного введения множественных копий генетических элементов в дрожжи *Yarrowia lipolytica*. Патент РФ №2376376. Дата приоритета 16.11.2006 г.
 12. Schumann G., Nurnberger H., Sandman G., Krugel H. Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus* // Mol. Gen. Genet. – 1996. – 252. – P.658 – 666.
 13. Kieser T., Bibb M. J., Chater K. F. *et al.* Practical Streptomyces genetics: a laboratory manual. – Norwich (United Kingdom): John Innes Foundation, 2000. – 424 p.
 14. Baltz R.H. Genetics and biochemistry of tylosin productin: A model for genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces* // Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Eds: Hollaender A., DeMoss R.D., Kaplan S. et al) // Pro. Symp.Chempaian. Urbana. – New-York, London: Plenum Press, 1982. – P.431 – 444.
 15. Wang M., Yang H., Gao Jun-lian., Ma Rong-cai. Breeding of high-yield lycopen producing strains of *Streptomyces rimosus* and studies on its flask culture conditions // China Biotechnology. – 2009. – № 12. – P.013.
 16. Мацелюх Б.П., Лутченко В.А., Полищук Л.В. Синтез каротиноидів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2003. – Т. 65, № 6. – С. 24–30.
 17. Мацелюх Б.П., Тимчик О.В., Мацелюх А.Б. Вплив умов вирощування *Streptomyces globisporus* 3–1 на продукування ландоміцину Е // Мікробіол. журн. – 2005. – Т. 67, № 4. – С. 44 – 51.
 18. Полищук Л.В., Полевода Б.В., Заверуха В.Б., Мацелюх Б.П. Изучение стабильности наследования плазмиды pSG1912 клетками *Streptomyces globisporus* 1912 и гетерологичных штаммов стрептомицетов // Микробиол. журн. – 1992. – Т. 54, №3. – С.9 – 14.
 19. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – Москва: Высш. школа, 1985. – 448 с.
 20. Голембієвська С.Л., Мацелюх Б.П. Продукування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – Т. 70, № 4. – С.45 – 50.
 21. Лук'яничук В.В., Полищук Л.В. Клонування ПЛР-копій нуклеотидної послідовності гена SCO1206 *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Мікроб. журн. – Т.72, № 3. – С.46 – 51.
 22. Kato F., Hino T., Nakaji A., Tanaka M., Koyama Y. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene crtS, whose product is similar to a sigma factor // Mol. Gen. Genet. – 1995. – Vol. 247, №10. – P. 387 – 390.
 23. Полищук Л.В., Голембієвська С.Л., Мацелюх Б.П., Лук'яничук В.В. Спадкова мінливість ознаки синтезу каротиноїдів у *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2013 (у друці).

Представлено Т.Ю. Горб
Надійшла 26.10.2012

ВАРИАТИВНОСТЬ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ТРАНСФОРМАНТОВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-б/п

Л.В. Полищук, Е.П. Копейко, В.В. Лукьяничук

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
Украина, Киев МСП, Д03680, ул. Академика Заболотного, 154
e-mail: polischuk@serv.imv.kiev.ua

Цель. Целью исследований было определение стабильности наследования ряда признаков у 36 трансформантов, содержащих гибридные плазмидные ДНК. **Методы.** Стабильность наследования морфологических признаков (споруляция и морфментация) трансгенных культур определяли визуально. Антибиотическую активность культур изучали микробиологическими методами. Свойства метаболитов (антибиотиков и каротиноидов) исследовали с помощью

тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. **Результаты.** Реципиентный штамм *Streptomyces globisporus* 1912-б/п – это стабильная спорулирующая непигментированная культура, которая не синтезирует ни антибиотических веществ, ни каротиноидов. Выявлено одновременные изменения нескольких фенотипических признаков реципиента у 72% исследованных трансформантов. **Выводы.** Установлена повышенная мутабельность генов, детерминирующих исследованные фенотипические признаки.

Ключевые слова: *Streptomyces*, трансформант, фенотипический признак, мутация, генетическая нестабильность.

PHENOTYPIC TRAITS VARIABILITY IN *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-б/п TRANSFORMANTS

L.V. Polishchuk, O.P. Kopeyko, V.V. Lukyanchuk

Zabolotny Institute of microbiology and virology of NAS of Ukraine

Ukraine, D 03680, Kyiv, Zabolotny str., 154
e-mail: polischuk@serv.imv.kiev.ua

Aim. The aim was to determine inheritance stability of some traits in 36 transformants carrying hybrid plasmid DNAs. **Methods.** Stability of morphological traits inheritance (sporulation and pigmentation) for transgenic cultures was examined visually. Antibiotic activity of cultures was determined by microbiological methods. Metabolite properties (antibiotics and carotenoids) were investigated by thin layer chromatography and spectrophotometry. **Results.** Recipient strain *Streptomyces globisporus* 1912-б/п is a stable sporulated unpigmented culture, which does not synthesize neither antibiotic nor carotenoids. Simultaneous changes of some recipient phenotypic traits in 72% of examined transformants were revealed. **Conclusions.** These results suggest that the genes that determine the studied phenotypic traits are characterized by the increased mutability.

Key words: *Streptomyces*, transformants, phenotypic trait, mutation, genetic instability.