

ма статевими типами – матіркою і плоскінню у співвідношенні 1:1. Двудомність, як апогей адаптації рослин в процесі еволюції, з боку господарського використання культури потребує значних витрат на вилучення чоловічих особин. Перші сорти однодомних конопель виявились нестабільними за ознакою однодомності. В результаті систематичних цілеспрямованих селекційно-насінницьких досліджень розроблена система заходів обмеження дії перехресного запилення між різними статевими типами і звуження гетерозиготності родин до потенційної здатності відновлення в потомстві рослин звичайної плосконі.

Со времен сознательного земледелия конопля посевная известна как двудомная культура с двумя половыми типами – матеркой и посконою в соотношении 1:1. Двудомность, как апогей адаптации в процессе эволюции, со стороны хозяйственного использования культуры влечет за собою значительные затраты на выборку мужских особей. Первые сорта однодомной конопли оказались нестабильными за признаком однодомности. В результате систематических целенаправленных селекционно-семеноводческих исследований разработана система мероприятий ограничения действия перекрестного опыления между различными половыми типами и сужения гетерозиготности семей относительно потенциальной способности к восстановлению в потомстве растений обычной поскони.

From conscious farming hemp is known as a dioecious crop with two sexual types – pistillate hemp and staminate hemp 1:1 respectively. Dioeciousness as a method of adaptation of plants in the process of evolution on the side of economic use of the crop needs significant expenses for the exception of masculine individuals. The first varieties of monoecious hemp appeared to be unstable for the sign of monoeciousness. As a result of systematic directed selective seed research the system of measures of limitation of influence on cross pollination between different sexual types and the narrowing of heterozygosity of families to potential ability of renewal the ordinary staminate hemp in plant progeny is developed.

ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., ОСТАПЧУК А.М., МАЦЕЛЮХ Б.П.

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДОЗ3680, Україна
E-mail: GolembiovskaSofia@gmail.com*

БІОСИНТЕЗ КАРОТИНОЇДІВ ПРЕДСТАВНИКАМИ РОДУ *STREPTOMYCES*

Синтез каротиноїдів нефотосинтезуючими мікроорганізмами, до яких відносяться стрептоміцети, основні продуценти антибіотиків та інших біологічно активних речовин, був помічений в 70-х роках минулого століття. Вони утворюють прості С40 – каротиноїди, такі як лікопін, β - каротин, зеаксантин, астаксантин та інші. Біосинтез цих пігментів у багатьох стрептоміцетів індукується синім світлом ($\lambda = 450-550\text{nm}$). Показано, що цю ознаку продуценти з такими криптичними кластерами можуть повністю втрачати. На сьогодні вивчено кілька сотень видів стрептоміцетів, п'ята частина з яких здатна до фотоіндукції [1, 10]. З іншої сторони зростає кількість видів стрептоміцетів, у яких одержані мутації, що приводять до розблокування криптичних *crt* – кластерів [3].

Японські дослідники в 1995 році показали, що в *S. setonii* ISP5395, який в нормі не утворює каротиноїди, після регенерації протопластів можна отримати каротинсинтезуючі мутанти з частотою 10^{-4} та 10^{-5} . У одного з мутантів автори виявили стресчутливий регуляторний ген *crtS*. Сиквенс аналіз даного гену показав його спорідненість до тих генів, що кодують стрес чутливі сигма фактори в *Bacillus subtilis*[6].

У 2001 році Лі [7] з співавторами клонували у *S. griseus* фрагмент ДНК, що має кластер генів біосинтезу каротиноїдів. Клонований фрагмент складався з двох конвергентних

оперонів: *crtE-I-B-V* та *crtY-T-U*. На основі висококопійної плазміди були створені гібридні плазміди з генами каротиногенезу. Вони вносилися в *S. griseus* IFO13350 і приводили до утворення каротиноїдів. Була також дослідження дія стресчутливого регуляторного гену *crtS*. Розміщений на плазміді ген *crtS* розблокував роботу власного кластера генів біосинтезу каротиноїдів у *S. griseus*. Отже, синтез каротиноїдів в *S. griseus*, аналогічно *S. setonii*, контролюється *crtS* геном, продуктом якого є сигма фактор, що ініціює транскрипцію генів каротиногенезу. На сьогоднішній день в секвенованому геномі *S. griseus* знайдено три копії кластера генів каротиногенезу [9]. Але, до сих пір, у *S. griseus* IFO13350 не вдається одержати індуковані каротинсинтезуючі мутанти.

У *S. coelicolor* A3(2) [11] та *S. avermitilis* [5] гени каротиногенезу містять також два оперони, що складаються з семи генів протяжністю по 9 т.п.н. Для *S. coelicolor* A3(2) оперони каротиногенезу є конвергентними, фланковані регуляторними ділянками, що містять два дивергентні оперони – *litR – Q*, *litS – A – B* (*lit* - light-induced transcription). Холофермент РНК полімерази містить σ^{LitS} протеїн, що активує транскрипцію генів біосинтезу каротиноїдів *in vitro*. Надекспресія гену *litS* є передумовою конститутивного утворення каротиноїдів в штамі дикого типу. Ці результати показують, що σ^{LitS} діє як світло чутливий сигма фактор, який активує транскрипцію біосинтезу *crt* генів. Геном *S. avermitilis* має кластер з семи генів каротиногенезу з двох дивергентних оперонів. Але здатність синтезувати каротиноїди цим штамом не зафіксована.

Кластери криптичних генів досліджених стрептоміцетів містяться на кінці лінійної хромосоми, для якої характерні TIR повтори. Ця ділянка стрептоміцетів зазнає високої генетичної нестабільності і частота спонтанних мутацій у деяких видів досягає 10^{-3} . TIR у стрептоміцетів є продуктом різних механізмів еволюції в порівнянні з рештою хромосом, які виявляють філогенетичну спорідненість і високу консервацію розташування генів [7].

У *Streptomyces globisporus* 1912 (відділ генетики мікроорганізмів ІМВ НАНУ) були отримані спонтанні та індуковані нітрозогунідином мутанти, які конститутивно синтезують каротиноїди на різних типах повноцінних та мінімальних середовищах без індукції синім світлом: рожеві - *4Lcp*, *R3Lcp* і червоні - *4Crt*, *6Crt*, *7Crt*, *RV Crt*, *R3Crt* мутанти. За допомогою методів тонкошарової хроматографії та спектрофотометрії попередньо визначено, що рожеві мутанти синтезують один основний каротиноїд – лікопін, а червоні, крім лікопіну, синтезують бета – каротин[2].

Застосований нами метод високоефективної рідинної хроматографії дозволив зробити оцінку кількісному складу синтезованих каротиноїдів у двох різних за кольором мутантів *4Lcp* та *4Crt*.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були два каротинсинтезуючі штами *S. globisporus* 1912: *4Crt* з темно – червоним кольором колоній та, отриманий від нього червоно-рожевий спонтанний мутант - *4Lcp*. Культури стрептоміцетів вирощували на агаризованому соєво – кукурудзяному середовищі протягом 5 діб. Поверхневий міцелій зшкрібали скальпелем з поверхні агару. Сиру біомасу вносили в фарфорову ступку, обезвожували в 5 об'ємах етилового спирту, центрифугували при 5тис об/хв та розтирали з кварцевим піском. Каротиноїди екстрагували хлороформом, центрифугували та фільтрували через бактеріальний фільтр з порами 0,2мм. Ідентифікацію каротиноїдів проводили за допомогою хроматографа Agilent 1200 колонка C_{18} , елюент ацетонітрил : метанол : тетрагідрофуран (58 : 35 : 7), 2мл/хв [10]. Абсорбцію спектрів поглинання визначали при довжині хвилі 450 нм. Для контролю використовували екстракцію з плодів томатів для ідентифікації і міцелію мукорового гриба *Blakeslea trispora* – продуцента бета - каротину.

Результати та їх обговорення

Аналіз каротиноїдів у різних за забарвленням мутантів *4Crt* та *4Lcp* методом високоефективної рідинної хроматографії підтвердив попередні результати тонкошарової хроматографії та спектрометрії [2]. Червоний мутант *4Crt* синтезує два основних каротиної-

ди: лікопін та бета – каротин. Рожевий мутант *4Lcp* продукує один основний пігмент – лікопін.

Як видно з графіка на рисунку 1 червоний штам *4Crt* у великих кількостях синтезує два каротиноїди (№1 та №2). Найвищий пік №1 належить каротиноїду з часом затримки 7,614 хв і становить 47% від кількості інших каротиноїдів, що утворює мутант. Аналогічний час виходу каротиноїду лікопіну було показано методом ВЕРХ для плодів томатів. Другий каротиноїд пік №2 з часом затримки 14,598 хв і площею піка 22% ми ідентифікували як бета - каротин. Бета – каротин, синтезований мукоровим грибом мав аналогічний час затримки при аналізі ВЕРХ. Синтез інших сполук мутантом *4Crt*, що мали максимуми поглинання при хвилі 450 нм не перевищував 30%. Ці речовини можуть бути попередниками даних каротиноїдів або їх ізомерами.

Крім того, на хроматографі Agilent було досліджено максимуми спектрів поглинання каротиноїдів №1 та №2. Максимуми поглинання каротиноїду №1 з Rt 7,614хв становили 446, 472, 502 нм і співпадають з літературними даними стандартного лікопіну (*all-trans* ізомери). Відповідно, каротиноїд №2 з Rt = 14,598 - бета - каротин характеризувався максимумами поглинання 456 та 476 нм [4].

Як видно з графіка на рисунку 2 рожевий штам *4Lcp*, на відміну від його попередника *4Crt* не синтезує бета – каротину, а накопичує попередник бета – каротину - лікопін в значно більшій кількості. Штам *4Lcp* утворює 80% лікопіну від суми всіх інших каротиноїдів, що синтезуються мутантом. Накопичення лікопіну в культурі продуцента *4Lcp* становить 2,11 мг/г сухої біомаси і 30 мг/л соєво – кукурудзяного середовища. Результати накопичення лікопіну є перспективними для подальшого дослідження мутанта *4Lcp*.

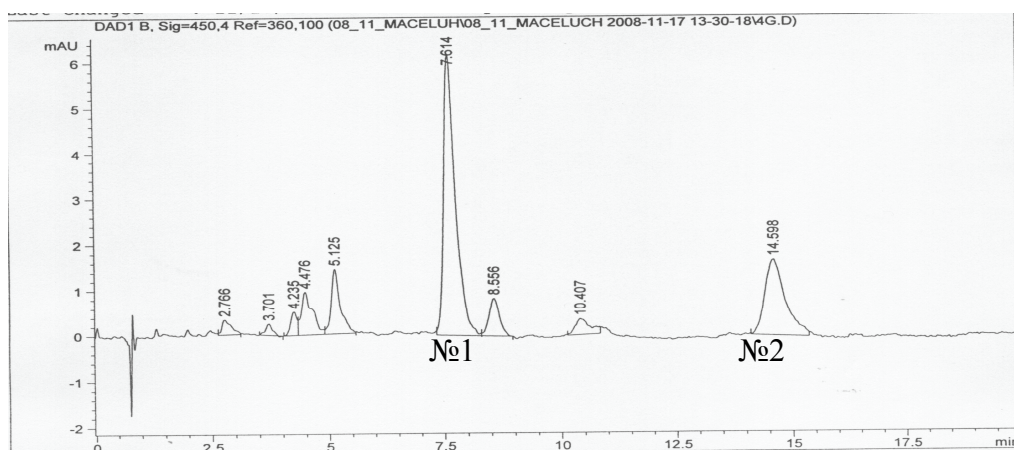


Рис 1. Хроматографічний профіль каротиноїдів при довжині хвилі 450 нм мутанта *4Crt*

Оцінюючи літературні дані, ми можемо припустити, що рожеві мутанти мають генетичний блок гену *crt Y*, що кодує лікопінциклазу. Дана мутація блокує перетворення лікопіну в бета - каротин. Це, можливо, привело до підвищеного накопичення даного каротиноїду в міцелії штаму *4Lcp*. Мутація *4Lcp* є досить стабільною (10^{-3}), що робить штам перспективним об'єктом для розробки біотехнологічного одержання і дослідження генетичного контролю біосинтезу лікопіну.

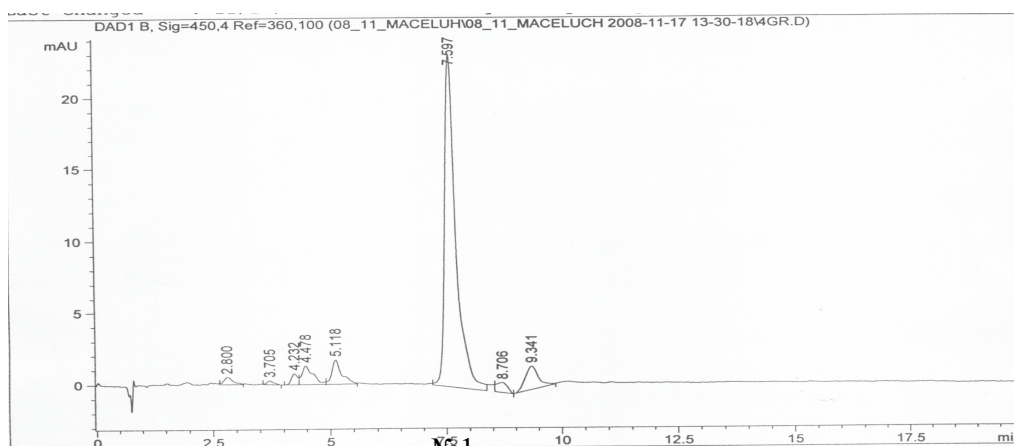


Рис 2. Хроматографічний профіль каротиноїдів при довжині хвилі 450 нм мутанта 4Lcp.

Висновки

Методом ВЕРХ визначено, що штам 4 *Crt*, темно – червоного кольору, синтезує лікопін і бета – каротин у кількості 48% і 22%, відповідно. Рожевий мутант 4Lcp не синтезує бета – каротину, а лікопін накопичує у більшій кількості 80%, що робить його перспективним об’єктом дослідження біотехнологічної галузі.

Література

1. Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. Стрептомицеты рода *Streptomyces*. – Киев, Наукова думка - 2003. - 647 с.
2. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продукування каротину і лікопину мутантами *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – **70**, № 4. – С. 45-50
3. Мацелюх Б.П., Лутченко В.А., Полищук Л.В. Синтез каротиноїдів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. - 2003. - **65**, № 6. - С. 24-30.
4. Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. - V. 111. Steroids and Isoprenoids. Part B. / Ed. J.H. Law, H.C. Rilling. - Orlando, San Diego etc.: Academ. Press. - 1985. - P. 113-149.
5. Ikeda, H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., and Omura S.. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*.// Nat. Biotechnol. - 2003. - **21**. P. 526-531
6. 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. – **247**. №10. – P. 387-390.
7. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., and Hopwood D. A.. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. 2000. – 370p.
8. Lee H. S., Ohnishi Y., and Horinouchi S.. A sigmaB-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2001. - **3**. - P. 95-101.
9. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., J Bacteriol. Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M., Horinouchi S. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 † // American Society for Microbiology - 2008. – **190**. № 11. – P. 4050–4060.
10. Takaichi, S. Characterization of carotenes in a combination of a C18 HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode – array detector // Photosynthesis Research. – 2000. - **65**. – P. 93 – 99.
11. Takano H., Asker D., Beppu T., Ueda K. Genetic control for light – induced carotenoid production in non – phototrophic bacteria // J Ind Microbiol Biotechnol. - 2006. - **33**. – P. 88 – 93.
12. Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs

photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster // J. Bacteriol. - 2005. - 187, N 5. - P. 1825-1832.

Резюме

Каротинсинтезуючі мутанти 4Crt і 4Lcp *S.globisporus* 1912 здатні до конститутивного синтезу каротиноїдів. Методом ВЕРХ показано, що мутант 4 Crt синтезує лікопін 47% та бета – каротин 22%. Мутант 4Lcp не синтезує бета – каротину, натомість продукує більшу кількість лікопіну – 80%.

4Crt, 4Lcp mutants biosynthesis carotenoids of *S.globisporus* 1912 should synthesize carotenoids constitutively. HPLC has demonstrated, that mutant 4 Crt synthesizes lycopene 47% and 22% β – carotene. 4Lcp mutant has not synthesized β – carotene, though it has synthesized lycopene the most - 80%.

ГОРШКОВА Л.М.

*Глухівський державний педагогічний університет імені Олександра Довженка
Україна, 41400 вул. Києво-Московська, 24 м. Глухів Сумської обл.,
e-mail: gdpu__bio @ bk. ru*

ВЗАЄМОЗАЛЕЖНІСТЬ МІЖ МОРФОЛОГІЧНИМИ ОЗНАКАМИ ЗАЛОЗИСТИХ І НЕЗАЛОЗИСТИХ ВОЛОСКІВ ТА ВМІСТОМ КАННАБІНОЇДНИХ СПОЛУК У CANNABIS SATIVA L.

Вивчення морфологічних ознак залозистих волосків та місце локалізації каннабіноїдних сполук, які міцно пов'язані із залозами, має науковий і практичний інтерес для селекційної роботи. Відомо, що нові сорти конопель були отримані, в основному, методами гібридизації південних та середньо-руських сортів, що змінило їх природу, так як середньо-руські сорти містили невелику кількість залозистих волосків, а південні навпаки були густо опушені, тому для практичної селекції виявлення цих ознак відіграє значну роль

G. Briozzi та F. Tognini [1] дають перші уявлення про секреторну функцію залоз, що вкривають листки трихом та інші органи конопель. Вивчення залозистих трихом було викликано, перш за все, незаконним використанням конопель, як галюциногену.

M.J.Monan Rana Ravindrahabh [5] встановили, що спочатку будь-яка клітина епідермісу на долях оцвітини конопель може виконувати функцію залозистого волоска. Цитоплазма її стає щільною, клітина видовжується і ділиться, як правило, поперечним і рідше продольним поділом. Нижня клітина ділиться у поперечному напрямку, а кінцева просто збільшується... незалозисті волоски утворюються в результаті подовження епідермальної клітини оцвітини.

На вегетативних та генеративних органах конопель містяться різноманітні типи залозистих і незалозистих епідермальних відростків. Залозисті трихоми на відміну від незалозистих містять терпеноферольні сполуки, що отримали назву каннабіноїдів.

Матеріали і методи

Для вирішення поставлених питань були використані сорти дводомних та одностомних конопель Глухівські-10 та ЮСО-29. Відібрані сорти контрастно відрізнялись за вмістом каннабіноїдних сполук за морфологічними, біологічними та генетичними ознаками. Напівкількісний метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) дозволяв проводити досить повну ідентифікацію каннабіноїдних сполук на пластинах типу Silufol ® uv – 24 [1]

Кількісне визначення каннабіноїдних речовин проводили за допомогою газорідного хроматографу (ГРХ) марки Hewlett Packard 5830A обладнаного водневим пламенево-іонізуючим детектором. У якості газу-носія використовували азот. Швидкість потоку азоту та водню 30 мм/хв, повітря – 300 мм/хв. Температура впускного отвору та детектору була відповідно 240 та 300°C. Скляні колонки заповнювались 5% OV-101 на