

УДК 577.222.7:581.1

І.П. Копотун<sup>1</sup>, Н.Л. Щербак<sup>2</sup><sup>1</sup>Національний технічний університет України “КПІ”, Київ, Україна<sup>2</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

## ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН САЛАТУ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН СОЛОДКОГО БІЛКА ТАУМАТИНУ II

**Background.** At the present, the main direction of genetic engineering research is improving qualities of the crops. The transgenic crops expressing *thauII* gene successfully combined both the better taste and increasing resistance to fungal pathogens.

**Objective.** In this study, the recombinant gene of sweet-tasting protein thaumatin II driven by the CaMV 35S promoter was introduced into lettuce (*Lactuca sativa*) plants.

**Methods.** The transformation of cotyledonary explants was achieved via *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. The plasmid vectors used in gene integration experiments also contained selective genes of neomycin phosphotransferase II (*nptII*) or phosphinotricin acetyl transferase (*bar*).

**Results.** The influence of 0,05 % polyvinylpyrrolidone (10000) on the selective concentration of kanamycin and phosphinotricin in the culture medium were investigated. The optimal concentrations of selective agents for stable transgenic plants selection were used.

**Conclusions.** Availability of the thaumatin II as well as selective *nptII* or *bar* genes was verified by the polymerase chain reaction (PCR). An organoleptic analysis of transgenic lettuce plants did not reveal significant changes in the taste quality. The leaf extracts of these plants will be further tested for antifungal activity.

**Keywords:** transgenic lettuce; thaumatin II; polyvinylpyrrolidone; kanamycin; phosphinotricin.

### Вступ

На сучасному етапі розвитку генетичної інженерії основним напрямом роботи залишається удосконалення властивостей культурних рослин відповідно до викликів сучасного світу: врожайність, поживні та харчові якості, стійкість до різноманітних хвороб і абіотичних стресів. Завдяки методам генетичної інженерії нові форми рослин можуть бути створені значно швидше, ніж методами традиційної селекції, а в деяких випадках перенесений ген дає можливість сформувати кілька нових ознак. Солодкий білок тауматин був виділений із плодів західноафриканської рослини *Thaumatococcus daniellii* Benth і вже більше 10 років використовується як перспективний цукрозамінник [1]. Тауматин у тисячі разів є солодшим за сахарозу і має потенціал замінити цукор, виступаючи як природний та низькокалорійний підсолоджувач. Оскільки для отримання цього білка з природних джерел існують певні обмеження, то методами генетичної інженерії був створений рекомбінантний ген, що кодує тауматин. Таким чином, його синтез був налагоджений у бактеріальних системах [2, 3]. Також було отримано трансгенні корені тютюну *Nicotiana tabacum*, що продукують тауматин, і виявлено, що додавання в середовище полівінілпіролідону (ПВП) підвищує продукцію солодкого білка [4]. Крім того, рекомбінантний ген тауматину був

використаний для отримання трансгенних рослин огірка [5], суниці [6], томату [7], моркви [8], у яких підтверджена експресія цього гена. Крім покращених смакових якостей і аромату плодів, трансгенні рослини показали підвищену стійкість до дії таких фітопатогенів, як *Pseudoperonospora cubensis*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora* та *Fusarium culmorum*. Багато тауматинподібних білків, виділених із різних рослин, показали антигрибкову активність *in vitro* [9].

Салат латук (*Lactuca sativa*) – корисна та поживна огорожня культура, що є джерелом вітамінів (B1, B2, B6, PP і E), каротину та фолієвої кислоти, також у листках салату містяться мінеральні солі калію, кальцію, заліза, фосфору, органічні кислоти, клітковина, мікроелементи [10]. Сорт Одеський кучерявець – один із найпоширеніших в Україні, має гіркуватий присмак, що особливо не подобається дітям та ускладнює споживання в їжу цієї надзвичайно корисної рослини. Мікроскопічний гриб *Botrytis cinerea* викликає сіру гниль рослин салату і є причиною загибелі молодих сіянців, особливо в теплицях. Оскільки стійкість до цього фітопатогену збільшилась у трансгенних рослин садової суниці [6], в нашій роботі ми розраховуємо отримати рослини салату, які будуть характеризуватись кращими смаковими і ароматичними якостями, а також підвищеною стійкістю до захворювань.

## Постановка задачі

Метою роботи є: отримання трансгенних рослин салату (*Lactuca sativa*), у яких проходить експресія гена білка тауматину, оптимізація умов регенерації та селекції трансгенних рослин за наявності в середовищі полівінілпіролідону, а також проведення молекулярно-біологічного аналізу отриманих рослин.

## Матеріали і методи дослідження

**Поверхнева стерилізація насіння й умови культивування рослин.** Насіння салату поверхнево стерилізували послідовною обробкою 70 %-вим етиловим спиртом (1 хв), 40 %-вим водним розчином комерційного препарату "Domestos" протягом 15 хв. Стерилізоване насіння пророщували у чашках Петрі на агаризованому поживному середовищі MS [11] при 24 °C на розсіяному світлі.

### Векторні конструкції та бактеріальні штами.

Для генетичної трансформації були використані вектори pCB169 і pCB171, що містять рекомбінантний ген тауматину II (*thauII*) під контролем CaMV 35S промотора. Для пластидного тагертингу ген тауматину був зшитий із транзитним пептидом малої субодиниці рибуллозобіфосфаткарбоксилази петунії (рис. 1). Для створення бінарного вектора pCB169 за основу був взятий вектор pICBV19, що містить ген фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*-ген). Вектор pCB171 був створений на основі pICBV16 і містить ген неоміцинофосфотрансферази (*nptII*).

Трансформацію *Agrobacterium tumefaciens*, штам GV3101, бінарними векторами pCB169 і pCB171 проводили методом електропорації відповідно до рекомендацій, що запропоновані в супровідних документах до приладу MicroPulser Electroporator (BioRad).

Для трансформації рослин використовували нічну культуру агробактерії, вирощену в рідкому середовищі LB при 24 °C на ротаційному шейкері (200 об/хв).

**Генетична трансформація рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*.** Агробактеріальну трансформацію проводили за методикою, описаною в праці [12]. Регенерацію рослин салату проводили на середовищі B5R (середовище B5 [13], доповненому 3 мг/л кінетину, 0,4 мг/л нафтилоцтової кислоти, 500 мг/л полівінілпіролідону (ПВП), 500 мг/л цефотаксиму).

**Аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).** Для доведення наявності трансгенів у трансформованих рослинах аналізували сумарну рослинну ДНК, екстраговану ЦТАБ-методом [14]. Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували плазмідну ДНК векторів. Реакцію ампліфікації проводили з використанням праймерів, специфічних до генів *thauII*, *nptII* та *bar*-генів (табл. 1). Реакційна суміш містила 100 нг сумарної рослинної ДНК, сольовий буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 0,01 % Тритон X-100), по 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, по 0,2 мкМ кожного з праймерів та 1 одиницю Taq-полімерази. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл.

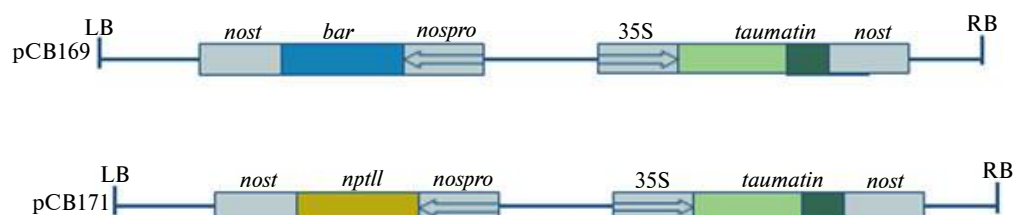


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів pCB169 і pCB171: 35S – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *nospro* – промотор нопалін синтази; *nost* – термінатор нопалін синтази; *thauatin* – ген солодкого білка тауматину II; *bar* – ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази; *nptII* – ген неоміцинофосфотрансферази II

Таблиця 1. Праймери, які були використані в роботі для проведення ПЛР

Ген	Послідовність праймерів	Температура реасоціації, °C	Продукт ампліфікації, п.н.
<i>thauII</i>	5'-GCATGCCACCTTCGAGATCG-3' 5'-GCTTGCATGCCTCTAGACTGCAGTT -3'	68	645
<i>bar gen</i>	5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAAC-3' 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'	65	463
<i>nptII</i>	5'-CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA-3' 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3'	62	622

### Результати і їх обговорення

У роботі регенерація рослин салату відбувалась на середовищі B5R, до складу якого входив полівінілпіролідон (10000) у концентрації 500 мг/л. Полівінілпіролідон – водорозчинний полімер, який, згідно з опублікованими даними [15], адсорбує фенольні сполуки, що виділяються деякими рослинами при регенерації в культурі *in vitro*. Завдяки цим властивостям ПВП сприяє зменшенню потемніння середовища та підвищує ефективність регенерації рослин в умовах *in vitro* [16]. Окремі дослідження свідчать про вплив ПВП на продукцію рекомбінантних білків трансгенними рослинами, зокрема, показано, що полівінілпіролідон підвищує продукцію білка тауматину в трансгенних коренях тютюну *Nicotiana tabacum* [4, 17]. При цьому ми не зустрічали публікацій, у яких описано можливу взаємодію ПВП із селективними агентами, які є необхідною складовою регенераційного середовища після трансформації рослин.

Однією з умов вдалого проведення експериментів з генетичної трансформації рослин є використання оптимальної концентрації селективних агентів для відбору трансформованих клітин. Оскільки досить невелика кількість клітин рослинного експланту після співкульту-

вання з агробактерією містить перенесену чужорідну ДНК, то важливо створити умови, за яких трансформована клітина має переваги над рештою клітин експланту. Відтворити такі умови стає можливим завдяки використанню селективних маркерних генів. Експресія цих генів у трансгенних клітинах надає переваги в умовах селективного тиску над рештою клітин експланту, завдяки чому вони проліферують і дають початок трансформованим рослинам.

Векторні конструкції, які були використані в роботі, містять ген солодкого білка тауматину II, а також селективні гени *bar* (pCB169) та *nptII* (pCB171), які обумовлюють стійкість рослин до гербіциду фосфінотрицину й антибіотика канаміцину відповідно.

Саме тому першим етапом роботи було визначення оптимальної концентрації селективних агентів та можливого впливу ПВП на чутливість салату до селективного агента. З цією метою використовували середовище для регенерації з трьома різними концентраціями канаміцину (5, 12,5 і 25 мг/л) і двома концентраціями фосфінотрицину (2,5 і 5 мг/л). Кожне із середовищ мало два варіанти: один містив 0,05 % ПВП (10000), інший – без нього. При використанні селективного агента канаміцину на основі якісного (рис. 2) та кількісного (табл. 2) аналізу



Рис. 2. Вплив ПВП на регенерацію салату на селективному середовищі з різною концентрацією канаміцину: а, б, в – середовище, що містить 5, 12,5 і 25 мг/л канаміцину відповідно без додавання ПВП; г, д, е – середовище, що містить 5, 12,5 і 25 мг/л канаміцину та 500 мг/л ПВП



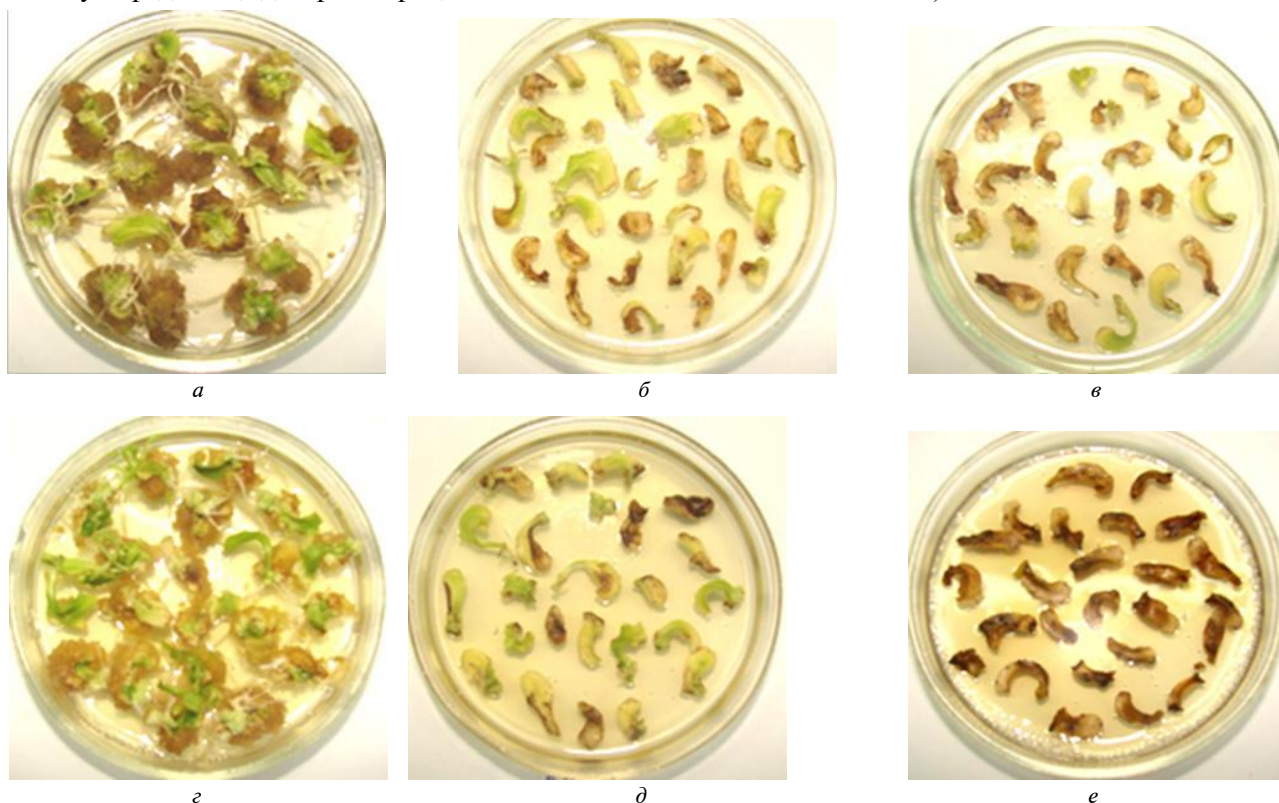
**Таблиця 2.** Ефективність регенерації рослин й утворення калюсу на селективному середовищі з різними концентраціями канаміцину (Км)

Варіант	Ефективність регенерації рослин та утворення калюсу (у відсотках) на кожному з експериментальних середовищ					
	5 мг/л Км	5 мг/л Км + 500 мг/л ПВП	12,5 мг/л Км	12,5 мг/л Км + 500 мг/л ПВП	25 мг/л Км	25 мг/л Км + 500 мг/л ПВП
Калюс	85,8 ± 1,8	100,0	24,7 ± 4,7	85,5 ± 0,9	11,8 ± 1,8	15,6 ± 1,8
Регенерація	5,5 ± 1,7	61,4 ± 2,6	0	16,8 ± 1,4	0	0

ефективності регенерації можна стверджувати про зменшення селективного тиску в середовищі, що містило ПВП. Це може бути пов'язано зі здатністю ПВП частково зв'язувати антибіотики і таким чином зменшувати їх вплив на селекцію трансформантів [18]. Як видно з рис. 2 і табл. 2, якщо не використовувати у середовищі ПВП, то селективною для канаміцину є концентрація 5 мг/л: ефективність регенерації становить усього 5,5 %, тоді як при додаванні ПВП у середовище для регенерації вона збільшується до 61,4 %. Такий високий відсоток регенерації (без трансформації) унеможливорює ефективну селекцію трансгенних рослин. Тобто за наявності у середовищі для регенерації ПВП селек-

тивна концентрація канаміцину повинна бути збільшена до 12,5 або навіть до 25 мг/л. Оптимальною, в наших експериментах, виявилась концентрація канаміцину 20 мг/л.

У випадку, коли середовище для селекції трансформованих рослин містило фосфінотрицин, ефект зменшення селективного тиску не спостерігався: на всіх досліджених варіантах селективного середовища майже всі експланти гинули, і лише на декількох експлантах при концентрації фосфінотрицину 2,5 мг/л спостерігались утворення калюсу та початкова стадія регенерації, але формування рослин так і не відбувалося (рис. 3). Якщо ж оцінювати якісний стан експлантів, то потемніння експлантів



**Рис. 3.** Вплив ПВП на регенерацію салату на середовищі з різною концентрацією фосфінотрицину: *a* – середовище B5R-3 без фосфінотрицину та ПВП; *б, в* – селективне середовище, що містить 2,5 і 5 мг/л фосфінотрицину відповідно без додавання ПВП; *г* – середовище B5R-3, що містить 500 мг/л ПВП без фосфінотрицину; *д, е* – селективне середовище, що містить 2,5 і 5 мг/л та 500 мг/л ПВП

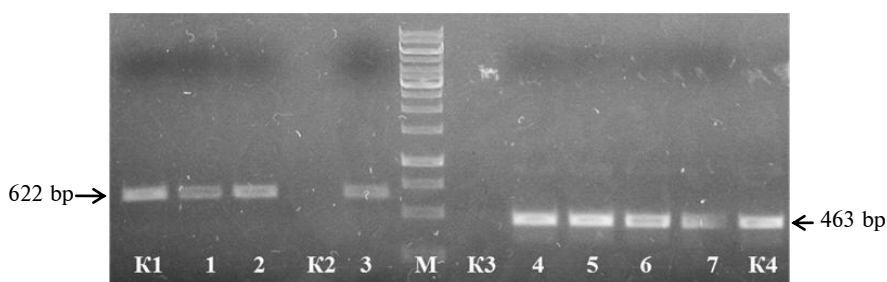


Рис. 4. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу тотальної ДНК рослин салату, відібраних на селективному середовищі з використанням праймерів до *bar* і *nptII* генів: М – маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); К2, К3 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини салату з праймерами до *nptII* і *bar* генів відповідно; К4 – позитивний контроль для *bar*-гена, ДНК плазміди рІСН169; К1 – позитивний контроль для *nptII* гена, ДНК плазміди рІСН171; 1–7 – ДНК рослин-регенерантів салату, стійких до канаміцину, з праймерами до *nptII*-гена (1–3) та стійких до фосфінотрицину, з праймерами до *bar*-гена (4–7)

було більш вираженим для середовищ, які, крім фосфінотрицину, містили 0,05% ПВП (10000). Тобто можна навіть казати про дещо протилежний вплив ПВП, ніж у варіанті з канаміцином. Крім цього, хотілося б відзначити, що за відсутності селективних агентів, наявність ПВП у середовищі позитивно впливає на ефективність регенерації салату, зменшує потемніння утвореного калюсу та середовища (рис. 3, з).

Встановлені оптимальні концентрації селективних агентів: 2,5 мг/л для фосфінотрицину та 20 мг/л для канаміцину надалі були використані в експериментах з генетичної трансформації рослин салату. В результаті проведених експеримен-

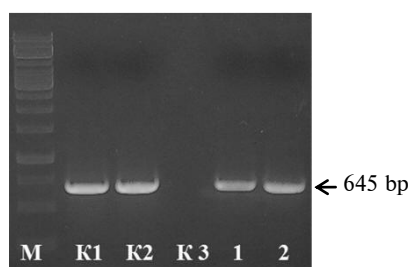


Рис. 5. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу тотальної ДНК рослин салату, відібраних на селективному середовищі з використанням праймерів до гена тауматину: М – маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); К3 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини салату; К1, К2 – позитивний контроль, ДНК плазміди рІСН169 і рІСН171 відповідно; 1, 2 – ДНК клонів салату, трансформованих векторами рІСН169 і рІСН171 відповідно

тів були відібрані рослини, стійкі до відповідних селективних агентів. Аналіз сумарної ДНК рослин, що регенерували на селективному середовищі з фосфінотрицином та канаміцином, проводили за допомогою ПЛР із використанням праймерів до *bar* та *nptII* генів відповідно. Аналіз за допомогою ПЛР підтвердив наявність гена *nptII* для 3 ліній та гена *bar* для 4 ліній салату Одеський кучерявець (рис. 4).

Також було проведено аналіз ДНК рослин салату, відібраних на селективному середовищі, за допомогою ПЛР з використанням праймерів до гена тауматину. ДНК 2 ліній рослин салату містила послідовність, що відповідає гену солодкого білка (рис. 5).

Трансгенні рослини салату були висаджені в ґрунт в умовах теплиці. Органолептичний аналіз цих рослин не виявив значних змін смакових якостей.

## Висновки

Отримано трансгенні рослини салату (*Lactuca sativa*) сорту Одеський кучерявець з геном солодкого білка тауматину під контролем САМV 35S промотору. Аналіз за допомогою ПЛР підтвердив наявність селективних генів і гена *thauII* в геномі отриманих рослин.

Встановлено, що наявність у середовищі для регенерації ПВП по-різному впливає на вибір концентрації селективних агентів, використаних у роботі. У випадку середовища з канаміцином ПВП зменшує селективний тиск антибіотика, тому оптимальною у проведених експериментах виявилась концентрація канаміцину 20 мг/л. Для середовища з фосфінотрицином спостерігався дещо протилежний ефект, також встановлена оптимальна концентрація цього селективного агента – 2,5 мг/л.

Надалі ми плануємо провести аналіз антифунгальної активності екстрактів трансгенних рослин салату.

## Список літератури

1. Masuda T., Kitabatake N. Developments in biotechnological production of sweet proteins // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. – **102**, № 5. – P. 375–389.
2. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli* / L. Edens, L. Heslinga, R. Klok et al. // *Gene*. – 1982. – **18**. – P. 1–12.
3. Illingworth Ch., Larson G., Hellekant G. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Streptomyces lividans* // *J. Industrial Microbiol.* – 1989. – **4**. – P. 37–42.
4. Pham N.B., Schöfer H., Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures // *Biotechnol. J.* – 2012. – **7**. – P. 537–545.
5. Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii* / M. Szwacka, M. Krzymowska, A. Osuch et al. // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2002. – **24**, № 2. – P. 173–185.
6. Schestibratov K.A., Dolgov S.V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea* // *Sci. Hortic.* – 2005. – **106**. – P. 177–189.
7. Expression of PR-5 protein thaumatin II for improving disease resistance and fruit quality of tomato / I.V. Korneeva, K.A. Shestibratov, N.V. Lavrova et al. // *Rev. de Cyt. et Biol. Vegetales-Le Bot.* – 2005. – **28**. – P. 260–267.
8. Luchakivska Y., Komarnitskii I.K., Kuchuk M.V. Obtaining of Transgenic Carrot (*Daucus carota* L.) and Celery (*Apium graveolens* L.) Plants Expressing the Recombinant Gene of Thaumatin II Protein // *In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. – 2012. – **48**. – P. 80–80.
9. A molecular basis for the endo- $\alpha$ 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits / L. Menu-Bouaouiche, C. Vriet, W.J. Peumans et al. // *Biochimie*. – 2003. – **85**, № 1-2. – P. 123–131.
10. Матвеева Н. А. Салат-латук (*Lactuca sativa* L.) як об'єкт біотехнологічних досліджень та продуцент рекомбінантних протеїнів // *Біотехнологія*. – 2010. – **3**, №1. – С. 9–17.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – **15**. – P. 473–497.
12. Створення трансгенних рослин салату, що містять ген зшитого білка антигенів Esat6:Ag85b з *Mycobacterium tuberculosis* / А.В. Кузьменко, Л.В. Маринченко, Н.Л. Щербак та ін. // *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. – 2013. – № 3. – С. 65–69.
13. Gamborg O., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* – 1968. – **50**. – P. 151–158.
14. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus*. – 1990. – **12**. – P. 13–15.
15. Fukushima A., Hase H., Saito K. Further studies on the adsorption of plant phenols by synthetic polymers // *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. – 1989. – **58**, № 4. – P. 583–592.
16. Optimization of a plant regeneration and genetic transformation protocol for Eucalyptus clonal genotypes / R. Deepika, A. Veale, C. Ma et al. // *BMC Proc.* – 2011. – **5**, № 47. – P. 1–3.
17. W. LaCount, An G., Lee J.M. The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures // *Biotechnol. Lett.* – 1997. – **19**, № 1. – P. 93–96.
18. Lopez de Sa T.G., Garrido Fernández L.M., Allende Riaco J.L. Interaction between polyvinylpyrrolidone and surfactant from viscosimetric data // *British Polymer J.* – 1988. – **20**. – P. 39–42.

## References

1. T. Masuda and N. Kitabatake, "Developments in biotechnological production of sweet proteins", *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 102, no. 5, pp. 375–389, 2006.
2. L. Edens et al., "Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*", *Gene*, vol. 18, pp. 1–12, 1982.
3. Ch. Illingworth et al., "Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Streptomyces lividans*", *J. Industrial Microbiol.*, vol. 4, pp. 37–42, 1989.
4. N.B. Pham et al., "Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures", *Biotechnol. J.*, vol. 7, pp. 537–545, 2012.
5. M. Szwacka et al., "Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*", *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. 24, no. 2, pp. 173–185, 2002.
6. K.A. Schestibratov and S.V. Dolgov, "Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*", *Sci. Hortic.*, vol. 106, pp. 177–89, 2005.
7. I.V. Korneeva et al., "Expression of PR-5 protein thaumatin II for improving disease resistance and fruit quality of tomato", *Rev. de Cyt. et Biol. Vegetales-Le Bot.*, vol. 28, pp. 260–267, 2005.

8. Y. Luchakivska *et al.*, “Obtaining of Transgenic Carrot (*Daucus carota* L.) and Celery (*Apium graveolens* L.) Plants Expressing the Recombinant Gene of Thaumatin II Protein”, *In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, vol. 48, pp. 80–80, 2012.
9. L. Menu-Bouaouiche *et al.*, “A molecular basis for the endo- $\alpha$ 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits”, *Biochimie*, vol. 85, no. 1-2, pp. 123–131, 2003.
10. N.A. Matveeva, “Lettuce (*Lactuca sativa* L) as the object of biotechnology research and producer of recombinant proteins”, *Biotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 9–17, 2010 (in Ukrainian).
11. T. Murashige and F. Skoog, “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture”, *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473–497, 1962.
12. A.V. Kuz'menko *et al.*, “Creating transgenic lettuce plants containing cross-linked gene protein antigens Esat6:Ag85b with *Mycobacterium tuberculosis*”, *Naukovi Visti NTUU KPI*, no. 3, pp. 65–69, 2013 (in Ukrainian).
13. O. Gamborg *et al.*, “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells”, *Exp. Cell Res.*, vol. 50, pp. 151–158, 1968.
14. J.J. Doyle and J.L. Doyle, “Isolation of plant DNA from fresh tissue”, *Focus*, vol. 12, pp. 13–15, 1990.
15. A. Fukushima *et al.*, “Further studies on the adsorption of plant phenols by synthetic polymers”, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, vol. 58, no. 4, pp. 583–592, 1989.
16. R. Deepika *et al.*, “Optimization of a plant regeneration and genetic transformation protocol for *Eucalyptus* clonal genotypes”, *BMC Proc.*, vol. 5, no. 47, pp. 1–3, 2011.
17. W. LaCount *et al.*, “The effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on the heavy chain monoclonal antibody production from plant suspension cultures”, *Biotechnol. Lett.*, vol. 19, no. 1, pp. 93–96, 1997.
18. T.G. Lopez de Sa *et al.*, “Interaction between Polyvinylpyrrolidone and Surfactant from Viscosimetric Data”, *British Polymer J.*, vol. 20, pp. 39–42, 1988.

І.П. Копотун, Н.Л. Щербак

#### ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН САЛАТУ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН СОЛОДКОГО БІЛКА ТАУМАТИНУ II

**Проблематика.** На сьогодні основним завданням генетичної інженерії залишається удосконалення властивостей культурних рослин. Трансгенні рослини, в яких проходить експресія гена *thaulI*, успішно поєднують кращі смакові якості та стійкість до грибкових захворювань.

**Мета дослідження.** У дослідженнях рекомбінантний ген солодкого білка тауматину, під контролем CaMV 35S промотора, був використаний для отримання трансгенних рослин салату (*Lactuca sativa*).

**Методика реалізації.** Трансформація сім'ядольних експлантів була проведена за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Плазмідні вектори, які були використані для трансформації, також містили селективні гени неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) або фосфінотрицинацетилтрансферази (*bar*).

**Результати дослідження.** Було досліджено вплив 0,05 % полівінілпіролідону (10000) у середовищі для регенерації на селективну концентрацію канамицину та фосфінотрицину. Визначено оптимальні концентрації селективних агентів, які надалі були використані при отриманні стабільно трансформованих рослин салату.

**Висновки.** Наявність гена тауматину та селективних генів у геномі рослин було підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Органолептичний аналіз не виявив значних змін смакових якостей цих рослин. Надалі ми плануємо провести аналіз антифунгальної активності екстрактів листків трансгенного салату.

**Ключові слова:** трансгенний салат; тауматин II; полівінілпіролідон; канамицин; фосфінотрицин.

І.П. Копотун, Н.Л. Щербак

#### ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ САЛАТА С ГЕНОМ СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II

**Проблематика.** В настоящее время основной задачей генетической инженерии остается совершенствование свойств культурных растений. Трансгенные растения, в которых проходит экспрессия гена *thaulI*, успешно сочетают лучшие вкусовые качества и устойчивость к грибковым заболеваниям.

**Цель исследования.** В исследованиях рекомбинантный ген сладкого белка тауматина, под контролем CaMV 35S промотора, был использован для получения трансгенных растений салата (*Lactuca sativa*).

**Методика реализации.** Трансформация семядольных эксплантов была проведена с помощью *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Плазмидные векторы, которые были использованы для трансформации, также содержали селективные гены неоміцинфосфотрансферазы II (*nptII*) или фосфінотрицинацетилтрансферазы (*bar*).

**Результаты исследования.** Было исследовано влияние 0,05 % поливинилпирролидона (10000) в среде для регенерации на селективную концентрацию канамицина и фосфінотрицина. Определены оптимальные концентрации селективных агентов, которые в дальнейшем были использованы при получении стабильно трансформированных растений салата.

**Выводы.** Наличие гена тауматина и селективных генів в геноме растений было подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции (ПЛР). Органолептический анализ не выявил значительных изменений вкусовых качеств этих растений. В дальнейшем мы планируем провести анализ антифунгальной активности экстрактов листьев трансгенного салата.

**Ключевые слова:** трансгенный салат; тауматин II; поливинилпирролидон; канамицин; фосфінотрицин.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції  
23 березня 2015 року

