

2. Собко Т.А., Хохлов А.Н. Изучение селекционной ценности пшенично-ржаной транслокации 1AL-1RS сорта озимой мягкой пшеницы Amigo // Тез. докл. межд. конф. «Агробиотехнология растений и животных». – Киев, 1997. – С. 71–72.
3. Graybosch R.A., Peterson C.J., Hansen L.E., Worrall D., Shelton D.R. Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS and 1AL-1RS wheat-rye translocation lines // J. Cereal Sci. – 1993. – Vol. 17. – P. 95–106.
4. Лобанова К.І., Шестопап О.Л., Ігнатова С.О. Абсцизова кислота як екзогенний фактор підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харків. націон. аграрного ун-ту. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 102-110.
5. Пат. 21988 України МПК (2006) А01Н1/06 Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці / Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л.; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. – № у 200611658; заявка 6.11.06 ; опубл. 10.04.07, Бюл. № 4.
6. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І., Шестопап О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації / Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.
7. Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, №1. – С. 52-57.
8. Martinez Garcia C., Martin Sanchez J.A., Sin Casas E. Plant regeneration from anther culture in six hexaploid triticales varieties and their F₁ hybrids // In: Livre des Resume de Posters. Book of Poster Abstracts. XIIIth EUCARPIA Congress. – Angers-France, 1992. – P. 189–190.
9. Chu C.C., Hill R.D. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryooids in *Triticum aestivum* L. // Plant Sci. – 1988. – Vol. 55. – P. 175–181.
10. Ігнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*: [монография] – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.

SHESTOPAL O.L., ZAMBRIBORSHCH I.S., TOPAL N.N., LYTVINENKO N.A., IGNATOVA S.O.
Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road 3, e-mail: oksana_shestopal@mail.ru

INVESTIGATION OF HAPLOID PRODUCTION ABILITY OF SOFT WHEAT WITH WHEAT-RYE TRANSLOCATION

Aims. Testing haploproduction ability of soft winter wheat and obtaining their lines by *in vitro* anther culture. **Methods.** Obtaining of wheat double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical methods. **Results.** The 333 pcs. green plant-regenerants were obtained by anther culture from 27 F₁ hybrid populations and 9 varieties of winter wheat which were granted the Department of selection and seed wheat of Plant Breeding & Genetics Institute. **Conclusions.** In these experimental conditions, sensitivity to androgenesis in 33 among 36 wheat genotypes have been detected. The lower figures of haploid production of wheat hybrids than these figures in parental varieties that are potential "donors haploid production" was obtained. This fact confirms the need for obligatory testing properties "donor" in certain combinations of crosses.
Key words: soft wheat with wheat-rye translocation, anther culture *in vitro*, double haploid, hybrids.

ЩЕРБАК Н.Л.¹, КУРЧЕНКО И.Н.², ЮРЬЕВА Е.М.², КУЧУК Н.В.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*
Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: natasha@iicb.kiev.ua

²*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины*
Украина, Д 03680, Киев, ГСП, ул. Академика Заболотного, 154

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ И САЛАТА, НЕСУЩИХ ГЕН СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II

В течение долгого времени было принято считать, что сладкий вкус для человека ассоциируется с присутствием сахаров, так как рецепторы сладкого вкуса реагируют на присутствие моносахаров (глюкозы), дисахаров (сахарозы),

хотя подобные вкусовые ощущения вызывают также заменители сахара сахарин и аспартам, а так же полиолы – сорбит, ксилит. В то же время относительно недавно были открыты белковые молекулы, которые благодаря взаимодействию с

вкусовыми рецепторами высших приматов, вызывают ощущение сладкого вкуса. К этим белкам относятся бразеллин, куркулин, монеллин, тауматин и др. [1, 2]. В современном мире искажение привычек питания с избыточным потреблением сладких углеводов приводит к формированию различного рода болезней и натуральные сахарозамещающие препараты – это разумный компромисс при желании снизить калорийность рациона, а потребление сладкого уже рефлекторно закреплено, или же если употребление сахаров должно быть ограничено по медицинским показаниям. Сладкий белок тауматин был получен из кожуры плодов Западноафриканского растения *Thaumatococcus daniellii* [3] и уже более десяти лет используется в странах Европы и США как пищевая добавка. Известно по крайней мере пять очень сладких форм этого белка: тауматин I, тауматин II, а также тауматин a, b и c. В пищевых продуктах тауматин используется для подслащивания, а также усиления ароматических качеств. Поскольку для получения этого белка из естественных источников имеются определенные ограничения, продукция рекомбинантного тауматина методами современной биотехнологии не теряет своей актуальности. налажен синтез этого белка в бактериальных системах [4, 5] и дрожжах [6], а также получены трансгенные растения нескольких съедобных видов, в которых подтверждена экспрессия гена тауматина. В результате трансформации растений *Agrobacterium rhizogenes* были получены линии трансгенных корней картофеля [7] и табака [8], в которых наблюдали продукцию тауматина. Рекомбинантный ген, кодирующий непосредственно сладкий белок (тауматин II), был

Материалы и методы

Растительный материал. Для работы были использованы асептические растения салата, полученные из семян, после их последовательной стерилизации в 70% этиловом спирте (1 мин.) и 40% растворе промышленного отбеливателя «Domestos» (10 мин.). Введение в культуру *in vitro* земляники садовой «Альбион» проводили методом стерилизации побегов (усов) тепличных растений в тех же условиях. **Векторные конструкции и бактериальные штаммы.** В нашей работе для генетической трансформации растений использовали вектора pCB169 и pCB171, содержащие рекомбинантный ген тауматина II под контролем CaMV 35S промотора, для пластидного таггертинга шитый с транзитным пептидом малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксылазы петунии. Для создания би-

использован для генетической трансформации таких видов овощных культур как томаты [9] и огурец [10], что привело к улучшению вкусовых качеств и аромата плодов этих растений. Кроме того, в работе по генетической трансформации садовой земляники этим геном [11], также было показано, что полученные трансгенные растения обладают повышенной устойчивостью к фитопатогенному грибу *Botrytis cinerea*.

Целью нашей работы было получение трансгенных растений ремонтантной садовой земляники (*Fragaria x ananassa*) (к которой часто применяют традиционное название клубника) сорта «Альбион», а также растений салата (*Lactuca sativa*) сортов «Одесский кучерявец» и «Гранд Рапидс». Ремонтантный сорт садовой земляники для наших экспериментов был отобран в связи с тем, что он имеет несколько волн плодоношения с мая по октябрь. И хотя изначально сорт характеризуется насыщенным вкусом, ягоды, собранные в осенний период, менее сладкие, также в этот период погодные условия способствуют поражению ягод гнилью. Микроскопический гриб *Botrytis cinerea*, поражающий растения садовой земляники, вызывает также серую гниль растений салата и является причиной гибели молодых сеянцев, особенно в теплицах. Этот факт и послужил причиной выбора второго объекта наших исследований. Поскольку устойчивость к этому фитопатогену возросла у трансгенных растений садовой земляники [11], в нашей работе мы рассчитываем получить растения салата, которые будут характеризоваться новыми вкусовыми и ароматическими качествами, а также повышенной устойчивостью к заболеваниям.

нарного вектора pCB169 за основу был взят вектор pICBV19, содержащий ген фосфинотрицин-ацетилтрансферазы (*bar* ген). Вектор pCB171 был создан на основе вектора pICBV16 и содержит ген неомецинфосфотрансферазы (*nptII*). Также, в нашей работе был использован вектор pICH16350 любезно предоставленный компанией Icon Genetics GmbH (г. Халле, Германия). В этом векторе ген тауматина II содержит сигнальную последовательность, направляющую белок в эндоплазматический ретикулум. Бинарные вектора переносили в *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101 путем электропорации с использованием MicroPulser Electroporator (BioRad). Для трансформации растений использовали ночную культуру агробактерии, выращенную на жидкой среде LB при 24 °C на рота-

ционном шейкере (200 об./мин.). Генетическая трансформация растений с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Для трансформации растений салата использовали семядоли семидневных проростков, сокультивацию которых с ночной культурой агробактерии проводили в течение суток, после чего экспланты переносили на среду для регенерации. Регенерация растений салата проводилась на среде B5R-3 (среда B5, дополненная 3 мг/л кинетина, 0,4 мг/л НУК, 400 мг/л поливинилпиралидона, 500 мг/л цефотаксима, а также 5 мг/л фосфинотрицина или 100 мг/л канамицина для селекции). Для трансформации земляники в качестве эксплантов использовали листья и черешки асептических растений, которые предварительно культивировали

тауматина: 5'GCATGCCCCACCTTCGAGATCG3'
 5'GCTTGCATGCCTCTAGACTGCAGTT3';
nptII гену: 5'CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA3'
 5'GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG3'
bar гену: 5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAAC-3'
 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'

Анализ антифунгальной активности. Определение антифунгальной активности растительных экстрактов проводили с использованием штамма фитопатогенного гриба *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. из коллекции микроскопических грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Для этого 1 мл инокулюма гриба (суспензии конидий в концентрации 1×10^6 /мл) размешивали в 100 мл охлажденной до 30°C агаризованной среды (картофельно-глюкозного агара). Такой подход позволяет соз-

дать условия для равномерного роста патогена на поверхности среды [14]. Для тестирования экстрактов на чашках Петри с агаризованной средой были сформированы лунки 1,0 см в диаметре. Экстракты листьев растений (100 мкл) вносили в лунки, контролем служил экстракционный буфер. Чашки Петри с экстрактами и буфером сначала инкубировали 24 часа при 4°C, затем – при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов. По истечении этого времени оценивали наличие и величину зон угнетения роста грибного мицелия.

Анализ с помощью полимеразной цепной реакции. Наличие трансгенов в трансформированных растениях подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции. Суммарную растительную ДНК экстрагировали СТАБ-методом [13]. Как положительный контроль для реакции амплификации использовали плазмидную ДНК векторов, с помощью которых проводили генетическую трансформацию растений. Реакцию амплификации проводили с использованием праймеров специфичных к гену

дать условия для равномерного роста патогена на поверхности среды [14]. Для тестирования экстрактов на чашках Петри с агаризованной средой были сформированы лунки 1,0 см в диаметре. Экстракты листьев растений (100 мкл) вносили в лунки, контролем служил экстракционный буфер. Чашки Петри с экстрактами и буфером сначала инкубировали 24 часа при 4°C, затем – при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов. По истечении этого времени оценивали наличие и величину зон угнетения роста грибного мицелия.

Результаты и обсуждение

Рекомбинантный ген, кодирующий сладкий белок (тауматин II), был использован для генетической трансформации нескольких видов овощных [2, 7, 9, 10] и ягодных [11] культур, что приводило к улучшению их вкусовых и ароматических свойств, кроме того, такие растения характеризовались повышенной устойчивостью к грибным инфекциям. Однако в литературе мы не встречали данных о трансгенных растениях салата с геном тауматина.

Векторные конструкции, которые были использованы в нашей работе, содержат ген сладкого бека тауматина II, а также селективные гены *bar* (pCB169) и ген *nptII* (pCB171 и pICH16350), которые обуславливают устойчивость растений к гербициду фосфинотрицину и антибиотику канамицину соответственно. Рече-

нерация растений происходила на среде, которая содержала селективные агенты: канамицин, в концентрации 25 мг/л для растений салатов и 50 мг/л для растений земляники, или фосфинотрицин, в концентрации 5 мг/л (Рис.1 А, В). В результате проведенных экспериментов были отобраны растения устойчивые к соответствующим селективным агентам. Анализ с помощью ПЦР подтвердил наличие селективного гена и гена тауматина у двух линий земляники, 14 линий салата «Гранд Рапидс» и 9 линий салата «Одесский кучурявец» (рис.1 С, D).

Трансгенные растения земляники культивируются *in vitro*, в дальнейшем мы планируем высадку в почву и изучение свойств полученных растений. Трансгенные растения салата были высажены в почву в условиях теплицы. Тести-

рование этих растений органолептически не выявило значительных изменений вкусовых качеств, хотя у двух линий можно было отметить слабое сладкое послевкусие. Был проведен анализ антифунгальной активности растительных экстрактов салата (трансформированных векторами pCB169 и pCB171) с использованием

штамма фитопатогенного гриба *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. В наших экспериментах подавления роста грибного мицелия *in vitro* отмечено не было. Мы планируем продолжить тестирование антифунгальной активности растительных экстрактов полученных трансгенных линий с другими видами фитопатогенных грибов.

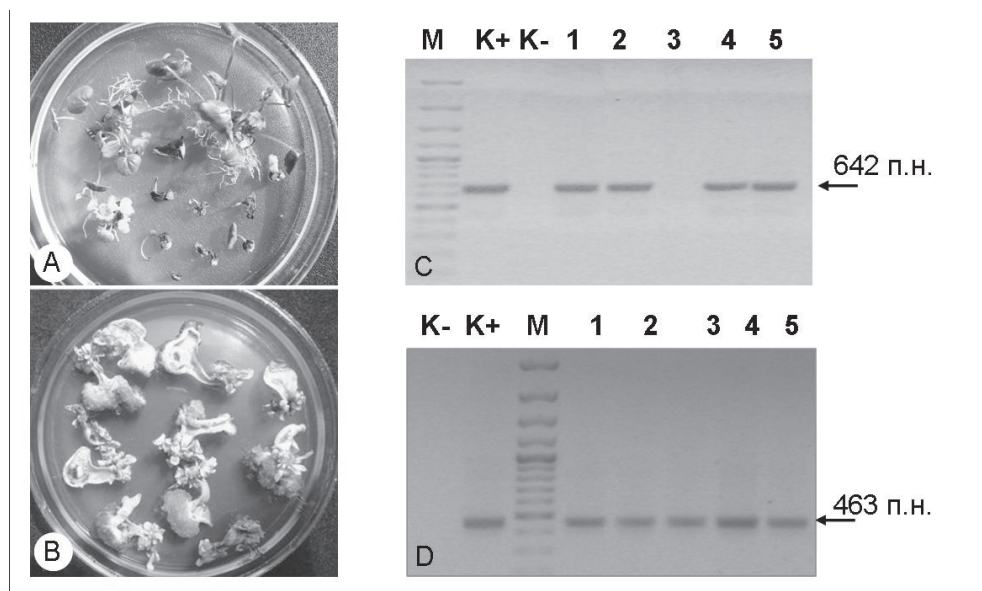


Рис. 1. Получение трансгенных растений салата и земляники:

А, В – регенерация растений земляники (А) салата (В) на селективной среде; С, D – электрофоретическая диаграмма результатов ПЦР с использованием праймеров к гену тауматина (С) и к гену *bar* (D): М – ДНК маркер, O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder («Fermentas»), К- – негативный контроль, ДНК нетрансформированного растения салата; К+ – позитивный контроль, плазмидная ДНК pCB169, 1-5 – ДНК растений, которые регенерировали на селективной среде после трансформации вектором pCB169

Выводы

Получены трансгенные растения салата *Lactuca sativa* сортов «Одесский кучерявец» и «Гранд Рапидс», а также земляники садовой (*Fragaria x ananassa*) сорта «Альбион» с геном сладкого белка тауматина под контролем CaMV 35S промотора. Анализ с помощью ПЦР под-

твердил наличие селективных генов и гена тауматина II в геноме растений. Растительный экстракт из листьев трансгенных растений салата не показал угнетения роста грибного мицелия *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. в условиях *in vitro*.

Литература

1. Temussi PA. Natural sweet macromolecules: how sweet proteins work // *Cell Mol Life Sci* – 2006. – Vol. 63. – P. 1876–1888.
2. Szwacka M., Burza W., Zawirska-Wojtasiak R., Gośliński M., Twardowska A., Gajc-Wolska J., Kosieradzka I, Kielkiewicz M. Genetically modified crops expressing 35S-thaumatin II transgene: sensory properties and food safety aspects // *Food Science and Food Safety*. – 2012. – Vol. 11. – P. 174–186.
3. Van der Wel H., Loeve K. Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth // *Eur. J. Biochem.* – 1972. – Vol. 31. – P. 221–225.
4. Faus I., Patiño C., Río J.L., del Moral C., Barroso H.S., Rubio V. Expression of a synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in *Escherichia coli* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996 – Vol. 229. – P. 121–127.
5. Illingworth C., Larson G., Hellekant G. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Streptomyces lividans* // *J. Ind. Microbiol.* – 1989. – Vol. 4. - P 37–42.
6. Edens L., Bom I., Ledebouer A.M., Maat J., Toonen M.Y., Visser C., Verrips C.T. Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast // *Cell.* – 1984. – Vol. 37. – P. 629–633.

7. Witty M., Harvery W.J. Sensory evaluation of transgenic *Solanum tuberosum* producing rthaumat II. NZ. J. Crop Hort. Sci. – 1990. – Vol. 18. – P. 77-80.
8. Pham N.B., Schäfer H., Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures // Biotechnol J. – 2012. – Vol. 7. – P. 537-545.
9. Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth // Plant Breeding. – 2003. – Vol. 122. – P. 347-351.
10. Szwacka, M., Krzymowska M., Osuch A., Kowalczyk M. E., Malepszy S. Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. // Acta Physiol. Plant. – 2002. – Vol. 24. – P. 173-185.
11. Schestibratov K.A., Dolgov S.V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea* // Sci Hortic. – 2005. – Vol. 106. – P. 177-189.
12. Hanhineva K., Kokko H., Siljanen H., Rogachev I., Aharoni A., Karenlampi S.O. Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria ananassa*) // J. Exp. Botany. – 2009. – Vol. 60. – P. 2093-2106.
13. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – Vol. 12. – P. 13-15.
14. Klochenko P.D., Elanskaya I.A., Shevchenko T.F., Sokolova E.V. Antifungal activity of freshwater cyanobacteria // Algological Studies. – 2001. – Vol. 103. – P. 143-149.

SHCHERBAK N.L.¹, KURCHENKO I.N.², YURIEVA E.M.², KUCHUK M.V.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str. 148, e-mail: natasha@icb.kiev.ua*

²*D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho St. 154*

OBTEINING OF LETTUCE AND STRAWBERRY TRANSGENIC PLANTS CARRYING SWEET-TASTE PROTEIN THAUMATIN II

Aim. According to the published data protein thaumatin II of *Thaumatococcus daniellii* is capable to induced sweet taste and antifungal resistant phenotype. A possible application of thaumatin II properties is to produce transgenic disease resistant crop plants with modified fruit taste. **Methods.** Transgenic plants were obtained via *Agrobacterium* mediated transformation method. Presence of the target and selective genes was confirmed by PCR analysis. Antifungal activity of the extracts from green-house grown lettuce plants was tested. **Results.** We report here the development of transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants with thaumatin II gene under control of CaMV 35S promoter. **Conclusion.** The leaf extract from transgenic lettuce plants carrying thaumatin II gene had no inhibiting effect on mycelium growth *in vitro* of the plant pathogenic fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Key words: thaumatin II, *Lactuca sativa*, *Fragaria x ananassa*, transgenic plants.

ЯМСКОВА В.П.¹, КРАСНОВ М.С.², РЫБАКОВА Е.Ю.¹, КУЛИКОВА О.Г.², ИЛЬИНА А.П.², ЯМСКОВ И.А.²

¹*ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: yamskova-vp@yandex.ru*

²*ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 28, e-mail: embmsk@mail.ru*

НОВАЯ ГРУППА МЕМБРАНОТРОПНЫХ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

В середине прошлого века были сформулированы следующие положения: в основе пространственной организации ткани лежит позиционное положение формирующих ее клеток; строго фиксированное пространственное расположение каждой клетки обусловлено разнообра-

зием морфогенетических реакций ее поверхности, среди которых определяющими являются контактные и адгезионные взаимодействия; точная адгезия играет принципиальную роль в регуляции таких жизненно важных биологических процессов, как миграция, пролиферация и