

УДК 575.222.7:581.1

САЛАТ-ЛАТУК (*Lactuca sativa* L.) ЯК ОБ'ЄКТ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ



Н. А. МАТВЄЄВА

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: joyna56@gmail.com

В огляді висвітлено основні досягнення в біотехнології цінної агрономічної культури — салату. Розглянуто такі напрями досліджень, як оптимізація умов культивування *in vitro*, розроблення методів виділення ізольованих протопластів, соматичної гібридизації, регенерації рослин. Подано результати експериментів з генетичної трансформації з метою створення трансгенних рослин, стійких до біотичних та абіотичних факторів, а також рослин — продуцентів рекомбінантних протеїнів.

Ключові слова: *Lactuca sativa*, біотехнологія, соматична гібридизація, генетична трансформація, рекомбінантні протеїни.

Салат-латук (*Lactuca sativa* L., родина *Compositae*) вважається найдавнішим з видів салату, що культивується. Його батьківщиною є Середземномор'я, в Україні вирощується із XVII ст. Розрізняють різновиди салату — листовий (*Lactuca sativa* L. var. *crispa* L.), головчастий (*L. sativa* L. var. *capitata* L.) та салат-ромен (*L. sativa* L. var. *longifolia* Lam). Листя салату містить вітаміни групи В, РР, К, Е, каротин, фолієву кислоту. Ця культура багата на солі кальцію, калію, заліза, органічні кислоти, цукри, клітковину, мікроелементи — мідь, бор, йод; отже, салат є цінною харчовою культурою [1].

Численні експерименти з культивування салату *in vitro* було спрямовано на розроблення методик мікророзмноження, що передбачали вивчення процесу калусоутворення та регенерації, оптимізації умов виділення та культивування ізольованих протопластів, соматичної гібридизації, генетичної трансформації. Перші роботи, що були розпочаті в 70-х роках минулого століття, стосувалися визначення складу живильних



середовищ, впливу регуляторів росту на утворення калусної тканини та регенерації рослин з різних експлантів. Так, було досліджено вплив етилену на формування калусної тканини та трахеїд [2]; вивчено вплив різних регуляторів росту (2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота, феноксибутанолова та феноксипропанолова кислоти) на соматичний ембріогенез [3], вплив кокосового молока на органогенез із калюсу [4].

Оптимізація умов регенерації рослин завжди становить інтерес, адже наявність ефективних методів отримання рослин з калусної та суспензійної культур або з різних типів рослинних експлантів (листіків, стебел, коренів) дає можливість упродовж короткого терміну одержувати велику кількість рослин, мультиплікувати рослини з цінним генотипом. Досліджено процеси утворення соматичних ембріодів [5], регенерації рослин із суспензійної культури [6]. Наприклад, ефективну методику прямої регенерації рослин із суспензійної культури запропонували Teng et al. [7]. На середовищі, що містило макроелементи середовища SH (Schenk and Hilderbrandt), 0,44 μM бензиладеніну та 0,54 μM α -нафтилоцтової кислоти, автори отримали регеновані рослини салату вже за 2 тижні.

Встановлено, що генотип має суттєвий вплив на утворення калюсної тканини та регенерації. Зокрема, Zhang et al. вивчали регенерацію рослин різних сортів салату (Greenfields, Summer Gem, Bronze Mignonette, Green Mignonette, Salad Bowl, Cos, Green) на середовищі SH з 0,1 мг/л індолілоцтової кислоти, 0,5 мг/л кінетину та 0,05 мг/л зеатину і виявили сортозалежність частоти регенерації [8]. 22 сорти салату було перевірено на можливість регенерації рослин з використанням фітогормонів зеатину, кінетину та індолілоцтової кислоти, виявлено високу регенераційну здатність сортів Bambino, Iceberg, Cobham Green, Sweet Butter, Simpson Elite, Rosalita, Paris White [9]. Нами досліджено здатність до регенерації рослин салату восьми сортів і показано суттєві відмінності частоти регенерації (від 98% для сорту Гренада до 5% для сорту Майская королева) за однакових умов культивування [10].

Регенерованим з калюсу рослинам притаманна генетична варіабельність, яка виражається в альбінізмі, зменшеному вмісті хлорофілу та інших ознаках [11].

Дикі види роду *Lactuca*, наприклад *L. saligna*, *L. virosa*, мають природну стійкість до хвороб, що їх спричинюють *Stemphylium botryosum* [12], *Bremia lactucae* [13], *Nasonovia ribis nigri* [14]. Отже, ці рослини є потенційними донорами генів стійкості і їх можна використовувати в селекції салату, хоча отримання гібридів між *L. sativa* та дикими видами цього роду не завжди можливе через статеву несумісність [15]. Разом з тим перенесення генів стійкості до хвороб може бути здійснено шляхом злиття протопластів. У зв'язку з цим було проведено експерименти з оптимізації методу культивування ізольованих протопластів салату, виділених з різних експлантів (стебел, коренів, котиледонів) і соматичної гібридизації [16–18] та отримано соматичні гібриди між видами салату *L. sativa* та *L. perennis*, *L. tatarica*, *L. virosa* [19, 20].

Генетична трансформація салату

Розроблення методів культивування тканин та регенерації рослин *in vitro*, які базуються на феномені тотипотентності рослинних клітин, відкрило широкі перспективи для розвитку нового напрямку біотехнології — генетичної трансформації. Якщо 40 років тому єдиним шляхом створення нових сортів салату з поліпшеними властивостями були методи традиційної селекції, то завдяки значним успіхам генетичної інженерії нині стало можливим спрямоване конструювання в культурі *in vitro* рослин з потрібними оз-

наками. Ще 1987 р. було здійснено експерименти з трансформації салату-латуку за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* Ti-плазмідом з геном стійкості до канаміцину [21].

Процес трансформації генома салату складається з інтродукції трансформуючого вектора в геномну або хлоропластну ДНК, селекції клітин, що мають трансформований геном, та регенерації рослин у селективних умовах. Трансформацію рослин здійснюють методами, які відрізняються за способом уведення чужорідних генів до клітин. *Agrobacterium tumefaciens* — опосередкована трансформація; пряме введення ДНК до протопластів із застосуванням осмотичного або електричного впливу; внесення ДНК шляхом бомбардування рослинних експлантів мікрочастками. Трансгени можуть бути вбудовані як у ядерну, так і в хлоропластну ДНК.

Частота трансформації залежить від низки чинників: генотипу рослин, які трансформують; типу експланта; використовуваної конструкції; методики трансформації. Залежність частоти трансформації від генотипу пов'язана з різною здатністю сортів салату до регенерації: чим більша здатність до регенерації, тим більшою є вірогідність отримання трансформованих рослин. Експериментально доведено, що вибір об'єкта (сорту) суттєво впливає на результат — одержання трансформованих рослин [10, 21, 22]. Разом з тим, незважаючи на виявлену сортозалежність, показано, що за певної оптимізації методики можна отримувати трансгенні рослини різних сортів салату [10, 22].

Оскільки різні експланти (листки, стебла, сім'ядолі, калюс та ін.) відрізняються за здатністю до регенерації рослин, під час трансформації важливим є також вибір типу експланта. Застосування методу прямої регенерації пагонів із сім'ядольних листків салату дозволяє підвищити ефективність трансформації та значно скоротити час, що необхідний для одержання трансформованих рослин. Такий підхід було застосовано, зокрема, Enomoto et al. [23], причому ефективність трансформації при застосуванні прямої регенерації пагонів з котиледонів виявилася вищою порівняно з регенерацією з калюсної тканини. Шляхом прямої регенерації рослин із сім'ядоль салату ми отримали трансгенні рослини з частотою 18–62% [10].

Такі умови здійснення агробактеріальної трансформації, як концентрація бактерій, час кокультивування з агробактерією, термін росту на середовищі без антибіотика, концентрація селективного агента також

впливають на кількість трансформованих рослин. Зокрема, вивчали оптимальні умови для трансформації рослин салату сорту Kaiser із застосуванням *A. tumefaciens* [23]. Показано, що збільшення часу культивування експлантів після трансформації на середовищі без селективного тиску з двох до чотирьох днів призводить до зменшення кількості зелених пагонів та регенерації значної кількості білих. Водночас, за дводенного росту на безгормональному середовищі білі пагони були відсутні. Досліджуючи оптимальну селективну концентрацію канаміцину, виявили, що такою є концентрація 25–50 мг/л.

Спостерігаються відмінності частоти регенерації трансформованих рослин у разі введення до клітин різних генів. Наприклад, методом агробактеріальної трансформації векторами з генами *gus* та *etr1* отримано рослини салату двох сортів [24]. Ефективність трансформації конструкцією з *gus*-геном становила 85%, тимчасом як з використанням гена *etr1* відсоток калюсних клонів з регенованими пагонами дорівнював лише 2,86, оскільки ген *etr1* інгібував процес формування пагонів та стимулював ріст коренів.

З'ясовано, що трансгени в рослинах салату успадковуються як домінуюча ознака [21]. У поколінні T_1 відбувається розщеплення за ознакою, яка кодується внесеним геном, у співвідношенні 3:1. Це свідчить про те, що трансген міститься в одній хромосомі [25]. Разом з тим при вбудовуванні гена у декілька хромосом розщеплення може бути іншим [25]. Можливим також є успадкування трансгена всіма рослинами поколінь T_1 та T_2 [10] (відсутність розщеплення), що може відбуватись у результаті отримання гомозиготних трансформованих ліній або унаслідок явища апоміксису, характерного для салату.

Трансгенні рослини не відрізняються за зовнішнім виглядом, швидкістю росту, утворенням насіння від вихідних рослин. Так, детальне вивчення таких ознак, як фертильність та розмір пилку, зав'язування насіння, дозрівання, ріст проростків при різній температурі, склад екстрактів з листків не виявило суттєвих відмінностей у трансгенних та нетрансформованих рослин [26]. Винятком є рослини з генами, що впливають на ріст рослин та змінюють фенотип [27, 28, 29].

Генетична трансформація як метод створення рослин салату з корисними ознаками

Використання методів генетичної інженерії відкриває перспективи цілеспрямованого перенесення генів, що дає можливість

поліпшувати сільськогосподарські рослини. Головною метою експериментів з трансформування генома будь-яких рослин є створення таких, яким притаманні певні корисні ознаки, зокрема стійкість до абіотичних чинників (температура, сольовий стрес), гербіцидів, бактеріальних і вірусних хвороб, синтезування протеїнів медичного призначення тощо.

Одним з напрямів практичного застосування генетичної інженерії рослин є створення рослин, стійких до гербіцидів. Потреба в таких рослинах зумовлена збільшенням використання гербіцидів, зокрема гліфосату (Roundup) та фосфіотрицину (BASTA), для боротьби з бур'янами. Така практика вимагає створення біотехнологічними методами сортів сільськогосподарських культур, які є стійкими до так званих гербіцидів суцільної дії, що дасть можливість значно скоротити використання шкідливих для довкілля сполук. Так, методом агробактеріальної трансформації отримано трансгенні рослини салату, стійкі до гербіцидів [30–32]. Трансформацію здійснювали за допомогою *A. tumefaciens* конструкцією з генами *bar* та *nptII*. Селекцію трансформованих рослин проводили на середовищі з канаміцином, було отримано трансгенні рослини, що виявилися стійкими до гербіциду в концентрації 5 мг/л [32], а ознака гербіцидрезистентності успадковувалася в наступних поколіннях.

Низка досліджень стосувалася створення рослин салату, що є стійкими до таких абіотичних факторів, як водний дефіцит, знижені температури. Методом агробактеріальної трансформації одержано рослини салату сорту Chongchima, стійкі до холодного стресу [25]; ефективність трансформації була високою і становила 10,8%. Під час дослідження покоління T_1 у 8 трансгенних рослин із 10 спостерігали розщеплення 3:1. Автори вважають, що ці лінії мали по одній копії трансгена. Для однієї з тестованих рослин розщеплення ознаки становило 1:1, що, на думку авторів, може бути наслідком інтеграції більш ніж однієї копії гена в геном.

Після агробактеріальної трансформації отримано рослини салату, що мали підвищену стійкість до сольового стресу та дефіциту вологи [27]. Трансгенні рослини в разі культивування в гідропонній культурі зі 100 мМ NaCl у 10 разів перевищували контрольні рослини за висотою та масою.

Створювати рослину з підвищеною загальною продуктивністю можна, зокрема, вбудовуючи в рослинний геном гени фітохромів, гени, які контролюють синтез фітогормонів, та ін. Для отримання рослин, що

відзначаються кращим ростом, було трансформовано салат сорту Cortina геном *asnA*, який кодує синтез аспарагінсинтетази А з *E. coli*. Трансформовані рослини мали більшу кількість листків зі збільшеною площею і масою, причому ці ознаки зберігались і в наступних поколіннях [28]. Агробактеріальну трансформацію було використано для одержання рослин салату, що синтезують протеїн феритин [33]. Трансформовані рослини вже на ранній стадії розвитку швидше росли, їхня маса перевищувала масу контрольних на 27–42%. Разом з тим шляхом трансформації можна отримати й карликові рослини. Салат зі зниженим синтезом гіберелінів GA₁ та GA₄ одержали після трансформації геном гіберелін-20-оксидази гарбуза. У трансформованих рослин покоління Т₂ спостерігалося розщеплення за ознакою карликовості у співвідношенні 3:1 [29].

Інтродукція в геном салату гена *ipt* істотно затримувала старіння листків, причому трансгенні рослини мали нормальну морфологію й не відрізнялися від контрольних за розміром і масою голівок [34].

Уведення чужорідних генів до генома рослин салату може збільшувати синтез природних для салату вторинних метаболітів або сприяти утворенню таких метаболітів, що не властиві для салату (наприклад, для поліпшення смакових якостей). Зокрема, виявилось, що в листках трансгенного салату з геном аспарагінсинтетази А концентрацію інуліну було збільшено у 30 разів [35]. Такі рослини становлять інтерес як продуценти коротколанцюгового інуліну та як селекційний матеріал. Створено трансгенний салат, який продукує глікопротеїд міракулін (модифікатор смаку) [36] та протеїн монелін (замінник цукру) [37].

Методи генетичної інженерії можуть бути застосовані для створення рослин салату, які не вражаються вірусними хворобами та шкідниками. За допомогою кокультивування листових експлантів з *A. tumefaciens* в рослини салату було інтродуковано ген стійкості до вірусу мозаїки салату (LMV) [38], отримано трансгенні рослини, стійкі до вірусу MiLV [26]. Той факт, що рослини поколінь Т₁–Т₅ зберігали стійкість до вірусів, дає підстави вважати, що створені рослини можуть становити інтерес як для культивування в сільському господарстві, так і в селекції салату. Ahmed et al. [39] шляхом агробактеріальної трансформації отримали рослини з геном *pta*, що надає рослинам стійкості до ушкодження попелицями.

Трансгенні рослини салату — продуценти фармацевтичних речовин

Останнім часом зростає інтерес до створення трансформованих рослин — біопродуктивних протеїнів медичного призначення. Оскільки салат вживають у їжу без термообробки, цю рослину можна використовувати для створення так званих їстівних вакцин — трансгенних рослин, що синтезують антигени бактеріальних та вірусних патогенів. Відомо, що гени, які кодують такі антигени, експресуються в клітинах рослин, при цьому протеїни зберігають свої імуномодулюючі властивості. Отже, трансгенні рослини можуть слугувати лікувальними та профілактичними засобами для людей і тварин, вони є потенційними продуцентами фармакологічно активних протеїнів, включаючи антитіла, вакцини, гормони [40]. Фармацевтичні препарати рослинного походження мають низку переваг. Їх виготовлення та зберігання має відносно невисоку вартість, вони придатні для масового виробництва. Використання їстівних рослин для продукування біовакцин є економічно вигідною альтернативою ензиматичному синтезу імуногенних протеїнів. Дослідження на тваринах і людях показали, що вживання трансгенних рослин, які містять вакцинні білки, викликає імунну відповідь, спричинює утворення антигенспецифічних антитіл у сироватці крові та секреті слизової оболонки [41].

Створено трансгенні рослини салату, що можуть бути використані як їстівні вакцини проти вірусу гепатиту В [42, 43], для лікування ентеритів [44, 45], як протихолерні вакцини [46]. Продемонстровано можливість транз'єнтної експресії гена інтерферону в рослинах салату [47, 48]. Отримано трансгенні рослини салату з геном *ifn-a2b*, що кодує синтез інтерферону (Матвеева Н., неопубліковані результати).

Шляхом трансформування за допомогою *A. tumefaciens* одержано салат із генами *esxA* та *esxB* — *fbpBΔTMD* туберкульозних антигенів ESAT6 і ESAT6:Ag85B(-TMD) [10]. Частота трансформації сім'ядольних експлантів з рослин сорту Єралаш становила 62% у разі трансформації агробактерією з генетичною конструкцією pCB063 (ген *esxA*) і 44% — при трансформації конструкцією pCB064 (ген *esxA* — *fbpBΔTMD*). Для сортів Рубінове мереживо та Сніжинка, що їх трансформували конструкцією pCB064, ці показники дорівнювали відповідно 32% і 18%. Отримані рослини не відрізнялися від контрольних, регенерували та укорінювалися на середовищі з канаміцином.

Аналіз зворотних транскриптів виявив, що транскрипція гена *nptII* здійснювалась у всіх аналізованих рослинах незалежно від сорту та використовуваної для трансформації конструкції. Водночас у деяких рослин зворотні транскрипти гена *esxA* не детектувались, хоча в геномній ДНК ген був присутній. Таким чином, у деяких випадках спостерігалася відсутність експресії за наявності трансгена в рослинах. Це явище, що має назву «мовчання генів», трапляється під час ядерної трансформації і може виникнути у разі присутності в рослинному геномі послідовності ДНК, гомологічної гену, що переноситься, при вбудовуванні великої кількості копій гена на геном, метилюванні перенесеної послідовності ДНК, утворенні ДНК-дуплекса повторюваних генів [49, 50]. Явище мовчання генів у деяких трансформованих рослин салату з геном *pta* спостерігали Ahmed et al. [39]. Із 29 рослин, що мали цей ген, ЗТ-ПЛР-позитивними виявилися 22, в інших синтез м-РНК був відсутній.

Часто використовуваним геном при створенні салату з генами бактеріальних і вірусних антигенів є ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) [10, 42, 43, 46]. Утім, становить інтерес отримання трансгенних рослин, вільних від генів стійкості до антибіотиків. Використання селективного гена *bar* є перспективним шляхом одержання рослин — продуцентів фармакологічних протеїнів, причому такі рослини також матимуть стійкість до гербіциду фосфінотрицину [51].

Трансформація пластома рослин салату

Наведені вище дослідження стосувалися створення рослин салату з трансформованою ядерною ДНК. Разом з тим трансформація хлоропластної ДНК, здійснювана шляхом гомологічної рекомбінації, має низку переваг [52]. Строга специфічність за місцем вбудовування гена, що переноситься, дає можливість уникнути впливу так званого неконтрольованого ефекту положення або явища мовчання перенесених генів, яке може мати місце в рослинах з трансформованою ядерною ДНК [53] і спостерігалось у наведених експериментах [10, 39]. Поліцистронний тип експресії під час трансформації хлоропластів завдяки прокаріотичній організації пластид дозволяє вводити в клітину декілька генів одночасно [54].

Кількість видів рослин з трансформованим пластомом є досить обмеженою. До них належать *Nicotiana tabacum* [55, 56], *Lycopersicon esculentum* [57, 58], *Glycine max* [59], *Solanum tuberosum* [60, 61] та деякі інші.

Салат є першим і досі єдиним видом рослин родини складноцвітих, щодо якого здійснено трансформування хлоропластної ДНК. Транспластомні рослини салату створено із застосуванням двох методів — ПЕГ-індукованої трансформації та бомбардування. Так, Lelivelt et al. [62], які використали метод ПЕГ-індукованої трансформації пластидної ДНК, отримали фертильні гомопластомні лінії салату-латуку сорту Flora. Трансформуючий вектор здійснював встроювання



Трансгенний салат сорту Рубінове мереживо з геном, що кодує синтез туберкульозного антигена ESAT6:
1 — регенерація рослин;
2 — трансформована рослина в ґрунті

генів у ділянці *trnA-trnL* хлоропластного генома салату і мав селективний ген *aadA*.

Транспластомні рослини салату-латуку також було одержано методом бомбардування [63]. Трансформуюча ДНК містила ген стійкості до спектиноміцину та стрептоміцину *aadA* під контролем хлоропластного промотора салату, фланкованого двома прилеглими послідовностями пластидного генома салату. Це забезпечувало вбудовування гена *aadA* в ділянці хлоропластної ДНК між генами *rbcL* та *accD*. У середньому було отримано одну трансформовану рослину на один постріл. Усі транспластомні рослини T₀ були фертильними, а рослини покоління T₁ стабільно мали трансген у хлоропластному геномі.

Хоча в наведених роботах [62, 63] при трансформації хлоропластного генома салату використовували лише селективний ген *aadA*, успішно здійснене вбудовування чужорідного гена у хлоропластну ДНК дає підстави сподіватися, що незабаром буде створено транспластомні рослини салату з «корисними» генами.

Отже, основними напрямками досліджень є розроблення методів культивування салату-латуку *in vitro*, соматичної гібридизації,

оптимізація методів генетичної трансформації. Генетично модифіковані рослини салату можуть бути створені як методом агробактеріальної трансформації, так і з використанням ПЕГ-індукованого або біолістичного методу. Розроблено методики трансформування ядерної і хлоропластної ДНК. Створено генетично модифіковані рослини салату із властивостями, що становлять практичний інтерес, зокрема з генами стійкості до гербіцидів, такі, що не хворіють на вірусні хвороби, не вражаються комахами. Отримано рослини салату, стійкі до негативного впливу абіотичних чинників, наприклад такі, що мають підвищену стійкість до сольового стресу та дефіциту вологи. Продемонстровано можливість створення генетично модифікованих рослин салату, що можуть бути біовакцинами проти холери, гепатиту В, туберкульозу, продуцентами інтерферону. *Lactuca sativa* є перспективним об'єктом для біотехнологічних досліджень, зокрема для використання як продуцент рекомбінантних протеїнів, оскільки цей вид характеризується швидким приростом біомаси, для нього оптимізовано умови культивування *in vitro*, а за регенераційною здатністю деякі сорти салату не відрізняється від модельного об'єкта біотехнологій — тютюну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Michelmore R. W. Eash Handbook of Plant Cell Culture. Lettuce. — New York: Macmillan, 1985. — P. 512–551.
2. Zobel R. W., Roberts L. W. Effects of low concentrations of ethylene on cell division and cytodifferentiation in lettuce pith explants // *Canad. J. Bot.* — 1978. — V. 56, N 8. — P. 987–990.
3. Stuart D. A., McCall C. M. Induction of somatic embryogenesis using side chain and ring modified forms of phenoxy acid growth regulators // *Plant Physiol.* — 1992. — V. 99, N 1. — P. 111–118.
4. Taniguchi T., Sanada Y, Maeda E. Effect of coconut water and coconut cream on organ development in calli of rice and lettuce // *Report of the Tokai Branch of the Crop Science Society of Japan.* — 1987. — N 103. — P. 25–29.
5. Xiaoli Z., Yang H., Wenjie Y., Ti X. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledons // *Ann. Bot.* — 1992. — V. 69, N 2. — P. 97–100.
6. Alconero R. Regeneration of plants from cell suspensions of *Lactuca saligna*, *Lactuca sativa* and *Lactuca serriola* // *Hort Science.* — 1983. — V. 18, N 3. — P. 305–307.
7. Teng W. L., Liu Y. J., Soong T. S. Rapid regeneration of lettuce from suspension culture // *Ibid.* — 1992. — V. 27, N 9. — P. 1030–1032.
8. Zhang X. R., Conner A. J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons // *J. Genet. Breed.* — 1992. — V. 46, N 3. — P. 287–290.
9. Ampomah Dwamena C., Conner A. J., Fautrier A. G. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration *in vitro* // *Sci. Hortic.* — 1997. — V. 71, N 3–4. — P. 137–145.
10. Матвеева Н. А., Василенко М. Ю., Шаховский А. М., Кучук Н. В. Агробактериальная трансформация салата *Lactuca sativa* L. конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* // *Цитология и генетика.* — 2009. — Т. 43, № 2. — С. 27–32.
11. Brown C., Lucas J. A., Crute I. R. et al. An assessment of genetic variability in somacloned lettuce plants (*Lactuca sativa*) and their offspring // *Ann. Appl. Biol.* — 1986. — V. 109, N 2. — P. 391–407.
12. Netzer D., Globerson D., Weintal C., Elyassi R. Sources and inheritance of resistance to

- Stemphylium leaf spot of lettuce // *Euphytica*. — 1985. — V. 34, N 2. — P. 393–396.
13. Gustafsson I. Potential sources of resistance to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) in different *Lactuca* species // *Ibid.* — 1989. — V. 40, N 3. — P. 227–232.
 14. Eenink A. H., Groenwold R., Dieleman F. L. Resistance of lettuce (*Lactuca*) to the leaf aphid *Nasonovia ribis nigri*. 1. Transfer of resistance from *L. virosa* to *L. sativa* by interspecific crosses and selection of resistant breeding lines // *Ibid.* — 1982. — V. 31, N 2. — P. 291–299.
 15. Vries I. M. de, De Vries I. M. Crossing experiments of lettuce cultivars and species (*Lactuca* sect. *Lactua*, *Compositae*) // *Plant System. and Evol.* — 1990. — V. 171, N 1–4. — P. 233–248.
 16. Berry S. F., Lu D. Y., Pental D., Cocking E. C. Regeneration of plants from protoplasts of *Lactuca sativa* L. // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1982. — V. 108, N 1. — P. 31–38.
 17. Webb C. L., Davey M. R., Lucas J. A., Power J. B. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Lactuca perennis* // *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* — 1994. — V. 38, N 1. — P. 77–79.
 18. Brown C., Lucas J. A., Power J. B. Plant regeneration from protoplasts of a wild lettuce species (*Lactuca saligna* L.) // *Plant Cell Rep.* — 1987. — V. 6, N 3. — P. 180–182.
 19. Maisonneuve B., Chupeau M. C., Bellec Y. et al. Sexual and somatic hybridization in the genus *Lactuca* // *Euphytica*. — 1995. — V. 85, N 1–3. — P. 281–285.
 20. Matsumoto E. Interspecific somatic hybridization between lettuce (*Lactuca sativa*) and wild species *L. virosa* // *Plant Cell Rep.* — 1991. — V. 9, N 10. — P. 531–534.
 21. Michelmore R. W., Marsh E., Seely S. et al. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Ibid.* — 1987. — V. 6, N 6. — P. 439–442.
 22. Curtis I. S., Power J. B., Blackhall N. W. et al. Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Experim. Bot.* — 1994. — V. 45, N 279. — P. 1441–1449.
 23. Enomoto Sueo, Hirota Itoh, Masahiro Ohshima, Yuko Ohashi. Induced expression of a chimeric gene construct in transgenic lettuce plants using tobacco pathogenesis-related protein gene promoter region // *Plant Cell Rep.* — 1990. — V. 9, N 1. — P. 6–9.
 24. Jong Hee Kim, Botella J. R. Etr1-1 gene expression alters regeneration patterns in transgenic lettuce stimulating root formation // *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* — 2004. — V. 78, N 1. — P. 69–73.
 25. Enkhchimeg Vanjildorj, Tae-Woong Bae, Key-Zung Riu et al. Overexpression of Arabidopsis ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) // *Ibid.* — 2005. — V. 83, N 1. — P. 41–50.
 26. Kawazu Y., Fujiyama R., Noguchi Y. Transgenic resistance to Mirafiori lettuce virus in lettuce carrying inverted repeats of the viral coat protein gene. // *Transgen. Res.* — 2009. — V. 18, N 1. — P. 113–120.
 27. Byong Jin Park, Zaochang Liu, Akira Kanno, Toshiaki Kameya. Plant growth regulation increased tolerance to salt- and water-deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA // *Plant Grow. Reg.* — 2005. — V. 45, N 2. — P. 165–171.
 28. Giannino D., Nicolodi C., Testone G. et al. The overexpression of asparagine synthetase A from *E. coli* affects the nitrogen status in leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and enhances vegetative growth // *Euphytica*. — 2008. — V. 162, N 1. — P. 11–22.
 29. Niki T., Nishijima T., Nakayama M et al. Production of dwarf lettuce by overexpressing a pumpkin gibberellin 20-oxidase gene // *Plant Physiol.* — 2001. — V. 126, N 3. — P. 965–972.
 30. Torres A. C., Nagata R. T., Ferl R. J. et al. In vitro assay selection of glyphosate resistance in lettuce // *J. Amer. Hort. Sci.* — 1999. — V. 124, N 1. — P. 86–89.
 31. Nagata R. T., Dusky J. A., Ferl R. J. et al. Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce // *Ibid.* — 2000. — V. 125, N 6. — P. 669–672.
 32. Mohapatra U., McCabe M. S., Power J. B. et al. Expression of the Bar Gene confers herbicide resistance in transgenic lettuce // *Transgen. Res.* — 1999. — V. 8, N 1. — P. 33–44.
 33. Goto F., Yoshihara T., Saiki H. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — V. 100, N 5. — P. 658–664.
 34. McCabe M. S., Garratt L. C., Schepers F. et al. Effects of P(SAG12)-IPT gene expression on development and senescence in transgenic lettuce // *Plant Physiol.* — 2001. — V. 127, N 2. — P. 505–516.
 35. Sobolev A. P., Segre A. L., Giannino D. et al. Strong increase of foliar inulin occurs in transgenic lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) overexpressing the Asparagine Synthetase A gene from *Escherichia coli* // *J. Agric. Food Chem.* — 2007. — V. 55, N 26. — P. 10827–31.
 36. Sun H. J., Cui M. L., Ma B., Ezura H. Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce // *FEBS Lett.* — 2006. — V. 580, N 2. — P. 620–626.

37. *Penarrubia L., Kim R., Giovannoni J. et al.* Production of the sweet protein monellin in transgenic plants // *Biotechnology*. — 1992. — V. 10. — P. 561–563.
38. *Dinant S., Maisonneuve B., Albouy J. et al.* Coat protein gene-mediated protection in *Lactuca sativa* against lettuce mosaic potyvirus strains // *Mol. Breeding*. — 1997. — V. 3, N 1. — P. 75–86.
39. *Ahmed M. B., Akhter M. S., Hossain M. et al.* An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, *pta* (*Pinella ternana* agglutinin) // *Middle-east J. Scient. Res.* — 2007. — V. 2, N 2. — P. 155–160.
40. *Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K.* Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // *Trends Plant Sci.* — 2001. — V. 6, N 5. — P. 219–226.
41. *Mason H. S., Warzecha H., Mor T. et al.* Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine // *Trends Mol. Med.* — 2002. — V. 8, N 7. — P. 324–329.
42. *Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M. et al.* A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // *FASEB J.* — 1999. — V. 13, N 13. — P. 1796–1799.
43. *Marcondes J., Hansen E.* Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HBsAg // *Braz. J. Infect. Dis.* — 2008. — V. 12, N 6. — P. 469–471.
44. *Kim T. G., Kim M. Y., Kim B. G. et al.* Synthesis and assembly of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) // *Prot. Expr. Purif.* — 2007. — V. 51, N 1. — P. 22–27.
45. *Matsui T., Asao H., Ki M. et al.* Transgenic Lettuce Producing a Candidate Protein for Vaccine against Edema Disease // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2009. — V. 73, N 7. — P. 1628–1634.
46. *Young Sook Kim, Bang Geul Kim, Tae Geum Kim et al.* Yang Expression of a cholera toxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium*-mediated transformation system // *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* — 2006. — V. 87, N 2. — P. 203–210.
47. *Jing Lia, Min Chena, Xian-Wei Liua et al.* Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce // *Sci. Horticult.* — 2007. — V. 112, N 3. — P. 258–265.
48. *Song L., Zhao D. G., Wu Y. J., Li Y. B.* Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce // *J. Zhejiang Univ. Sci.* — 2008. — V. 9, N 5. — P. 351–355.
49. *Assaad F., Tucker K. L., Signer E. R.* Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis* // *Plant. Mol. Biol.* — 1993. — V. 22, N 6. — P. 1067–1085.
50. *Matzke M. A., Matzke A. J. M.* How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? // *Plant Physiol.* — 1995. — V. 107, N 3. — P. 679–685.
51. *Kishchenko E., Shcherbak N., Kyrychuk Yu., Kuchuk N.* Construction of transgenic plants expressing immunogenic tuberculosis-specific proteins // *Збірник тез 2-го з'їзду Українського товариства клітинної біології, 23–26 жовтня 2007 р., Київ.* — С. 32.
52. *Staub J. M., Maliga P.* Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation // *Plant Cell.* — 1992. — V. 4, N 1. — P. 39–45.
53. *Kooter J. M., Matzke M. A., Meyer P.* Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control // *Trends Plant Sci.* — 1999. — V. 4, N 9. — P. 340–347.
54. *Staub J. M., Maliga P.* Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids // *Plant J.* — 1995. — V. 7, N 5. — P. 845–848.
55. *Golds T., Maliga P., Koop H.-U.* Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* // *Biotechnology.* — 1993. — V. 11, N 1. — P. 95–97.
56. *Koop H. U., Steinmuller K., Wagner H. et al.* Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation // *Planta.* — 1996. — V. 199, N 2. — P. 193–201.
57. *Ruf S., Hermann M., Berger I. J. et al.* Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // *Nat. Biotechnol.* — 2001. — V. 19, N 9. — P. 870–875.
58. *Nugent G. D., Nave M., Gulic A. et al.* Plastid transformants of tomato selected using mutations affecting ribosome structure // *Plant Cell Rep.* — 2005. — V. 24, N 6. — P. 341–349.
59. *Duformantel N., Pelissier B., Garson F. et al.* Generation of fertile transplastome soybean // *Plant Mol. Biol.* — 2004. — V. 55, N 4. — P. 479–480.
60. *Sidorov V. A., Kasten D., Pang S. Z. et al.* Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // *Plant J.* — 1999. — V. 19, N 2. — P. 209–216.
61. *Tnanh Thi Nguen, Nugent G., Card T., Dix P. J.* Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Plant Sci.* — 2005. — V. 168, N 6. — P. 1495–1500.
62. *Lelivelt C. L. C., McCabe M. S., Newell C. A. et al.* Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — V. 58, N 6. — P. 763–774.
63. *Kamamoto H., Yamashita A., Asao H. et al.* Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids // *Transgen. Res.* — 2006. — V. 15, N 2. — P. 205–217.

**САЛАТ-ЛАТУК (*Lactuca sativa* L.) КАК
ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ И ПРОДУЦЕНТ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ПРОТЕИНОВ***Н. А. Матвеева*

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

E-mail: joyna56@gmail.com

В обзоре освещены основные достижения в биотехнологии салата. Рассмотрены такие направления исследований, как оптимизация условий культивирования *in vitro*, разработка методики выделения изолированных протопластов, соматической гибридизации, регенерации растений. Описаны достижения в области генетической трансформации салата по созданию трансгенных растений, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам, а также растений — продуцентов рекомбинантных протеинов.

Ключевые слова: *Lactuca sativa*, биотехнология, соматическая гибридизация, генетическая трансформация, рекомбинантные протеины.

**LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)
AS AN OBJECT OF BIOTECHNOLOGY
AND PRODUCER OF RECOMBINANT
PROTEINS***N. A. Matvieieva*

Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: joyna56@gmail.com

In the review the basic achievements in biotechnology of lettuce are cited. Such areas as lettuce cultivation *in vitro*, development of protoplast isolation technique, somatic hybridization, regeneration of plants are considered. Achievements in the area of genetic transformation of lettuce and production of the resistant to biotic and abiotic factors transgenic plants and the plants — producers of recombinant proteins are described.

Key words: *Lactuca sativa*, biotechnology, somatic hybridization, genetic transformation, recombinant proteins.