

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2026.01.074>

УДК 577.21:633.11:615.281

**Н.Л. Щербак**, <https://orcid.org/0000-0002-2478-8408>

**В.А. Галкіна**, <https://orcid.org/0000-0002-3231-4085>

**М.В. Кучук**, <https://orcid.org/0000-0001-7365-7474>

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

E-mail: natalia@icbge.org.ua

## Успадкування гена, що кодує антибактеріальний білок коліцин М, у нащадків трансгенних рослин салату

Представлена членом-кореспондентом НАН України Б.В. Моргуном

У зв'язку зі зростанням антибіотикорезистентності бактеріальних патогенів та періодичними спалахами харчових інфекцій, спричинених ентерогеморагічними штамами *Escherichia coli*, постала потреба в пошуку альтернативних засобів профілактики інфекційних захворювань і контролю патогенних штамів. Одним із перспективних підходів є використання бактеріоцинів — антимікробних білків бактеріального походження, які успішно синтезують у біотехнологічних рослинах. Раніше нами було продемонстровано створення трансгенних рослин салату (*Lactuca sativa* L.) з експресією одного з бактеріоцинів — коліцину М і підтверджено антибактеріальну активність екстрактів цих рослин проти різних штамів *E. coli*, в тому числі й патогенних серотипів, таких як O157:H7. У роботі наведено результати дослідження успадкування трансгена у нащадків цих трансгенних рослин, визначення ліній потенційно з однією трансгенною вставкою та отримання стабільних гомозиготних трансгенних ліній салату з геном коліцину М. Наявність експресії коліцину М у нащадків трансгенних рослин салату оцінювали за антибактеріальною активністю рослинних екстрактів проти лабораторних штамів *E. coli*. Отримані результати підтверджують перспективність створення біотехнологічних рослин, здатних синтезувати антимікробні білки для боротьби з бактеріальними патогенами.

**Ключові слова:** бактеріоцини, коліцин М, трансгенний салат, патогенна *Escherichia coli*, антибіотикорезистентність, успадкування трансгенів.

**Вступ.** Зростання антибіотикорезистентності серед бактеріальних патогенів становить глобальну загрозу здоров'ю, з якою зіткнулося людство останніми роками. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (WHO), у 2023 р. приблизно одна з шести бактеріальних інфекцій у світі була нечутливою до стандартних антибіотиків [1]. Поширення

Цит у а н н я: Щербак Н.Л., Галкіна В.А., Кучук М.В. Успадкування гена, що кодує антибактеріальний білок коліцин М, у нащадків трансгенних рослин салату. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2026. № 1. С. 74—83. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2026.01.074>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2026. Стаття опублікована за умовами відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

резистентних до карбапенемів ентеробактерій набуло таких масштабів, що Європейський центр з профілактики та контролю захворювань (ECDC) та WHO відносять їх до переліку пріоритетних патогенів, що загрожують людству [2, 3]. На фоні цих загроз постійно збільшується кількість кишкових інфекцій, спалахи яких зумовлені патогенними штамми *E. coli*. За даними ECDC, у 2023 р. у країнах ЄС було зареєстровано рекордну кількість інфекцій (10 901), спричинених *Escherichia coli*, що продукує шига-токсин (STEC), що на 22 % більше, ніж у попередньому році (ECDC, 2025) [4]. Ентерогеморагічні штами *E. coli* (EHEC), які належать до STEC, регулярно спричиняють спалахи тяжких харчових отруєнь [5, 6]. Нещодавно, у травні—червні 2024 р., у Великій Британії мав місце спалах STEC серотипу O145, пов'язаний зі вживанням фасованих сендвічів із листям салату, який спричинив 288 підтверджених випадків захворювання [7]. Листова зелень, зокрема салат, вже неодноразово ставала джерелом кишкових інфекцій: так, у США в 2018—2019 рр., за даними Центру контролю та профілактики захворювань (<https://www.cdc.gov/ecoli/>), декілька великих спалахів *E. coli* O157, пов'язаних із салатом ромен, призвели сумарно до 439 випадків захворювання і 5 летальних наслідків. Попри вдосконалення санітарного контролю, контамінація сирих овочів залишається серйозною проблемою харчової безпеки. Крім того, розвиток резистентності до антибіотиків призводить до перетворення навіть коменсальних штамів *E. coli* на небезпечні патогени, а інфекції, спричинені ними, все важче піддаються лікуванню [8]. Усе це свідчить про нагальну потребу в зменшенні використання антибіотиків у тваринництві та харчовій промисловості, а також у необхідності впровадження нових профілактичних підходів для стримування патогенних штамів *E. coli*, особливо тих, що вже набули стійкості до антибіотиків.

Одним із перспективних рішень є використання бактеріоцинів — антимікробних пептидів бактеріального походження. Бактеріоцини мають вужчий, ніж антибіотики, спектр дії, націлений переважно на близькоспоріднені бактерії, що дає змогу вибірково знищувати патогени, не завдаючи шкоди корисній мікрофлорі. Коліцини — бактеріоцини, які природно продукуються деякими штамми *E. coli*, вважаються безпечними для людини і декілька рекомбінантних коліцинів вже визнані FDA як GRAS (загальноновизнані як безпечні) для застосування у харчовій промисловості. Серед них особливу увагу привертає коліцин М — єдиний коліцин, що пригнічує біосинтез пептидоглікану — компоненту клітинної стінки бактерій. Через націленість на такий життєво важливий компонент коліцин М потенційно здатний діяти на широкий спектр грамнегативних бактерій. У попередніх дослідженнях показано, що коліцин М дійсно має надзвичайно широку активність проти патогенних штамів *E. coli*, зокрема семи основних серотипів EHEC (у тому числі O157:H7) [9, 10], а також проти деяких інших грамнегативних збудників, таких як *Klebsiella pneumoniae* [11].

Сучасні біотехнологічні підходи дають змогу продукувати рекомбінантний коліцин у різних експресійних системах, зокрема і в рослинах. Так, рекомбінантний коліцин М було отримано методом транз'єнтної експресії в рослинах австралійського тютюну *Nicotiana benthamiana* [10] і трансгенних рослинах звичайного тютюну (*Nicotiana tabacum*) [11]. Синтезований у такий спосіб у рослинах антибактеріальний білок потребує виділення та очищення перед використанням. Уникнути цього дороговартісного етапу під час створення кінцевого продукту з антибактеріальною активністю можливо, якщо для експресії бактеріоцину використовувати їстівні або кормові рослини. Так, трансгенні листові овочі, що накопичують антибактеріальний білок, можуть бути використані безпосередньо в

їжу, або як антибактеріальна добавка у вигляді порошку з висушеної біомаси. Салат та мізуна були першими трансгенними їстівними рослинами, в яких підтверджено експресію гена коліцину М і відповідну антибактеріальну активність [12]. Екстракти трансгенних рослин пригнічували ріст як лабораторних штамів *E. coli*, так і небезпечних патогенних серотипів (O157:H7, O104:H4), а висушена біомаса трансгенних рослин зберігала антимікробну активність протягом багатьох місяців. Водночас у роботі було відзначено певну варіабельність експресії коліцину М у потомстві трансгенних рослин. Зокрема, в окремих рослин покоління Т1 антибактеріальна активність була знижена або відсутня, тоді як інші лінії мали високий рівень експресії [12]. Втрата антибактеріальної активності могла бути пов'язана із сегрегацією трансгена (у гетерозиготних рослинах) або епігенетичним сайленсингом (замовчуванням) трансгена. Для практичного застосування запропонованої технології необхідно отримати однорідні за генотипом лінії, що характеризуються стійкою антибактеріальною активністю та є передбачуваними за успадкуванням цієї ознаки.

**Мета роботи** — дослідження успадкування гена коліцину М у нащадків трансгенних рослин салату, визначення ліній потенційно з однією трансгенною вставкою та отримання стабільних гомозиготних трансгенних ліній салату. Ми прагнули відібрати лінії, що характеризуються стійкою експресією коліцину М, аби надалі їх можна було використовувати як джерело антимікробного білка або створювати на їх основі функціональні харчові або кормові добавки для профілактики ЕНЕС-інфекцій.

**Матеріали і методи.** *Рослинний матеріал.* У дослідженні використано насіння (Т1) різних трансгенних ліній салату посівного (*Lactuca sativa* L., сорт Одеський кучерявець), що формувалося після самозапилення трансгенних рослин (Т0) в умовах теплиці. Трансгенні рослини салату з геном коліцину М отримано методом агробактеріальної трансформації [12]. Бінарний вектор для генетичної трансформації рослин містив ген *ста*, що кодує коліцин М, під контролем промотору 35S CaMV, а також селекційний ген *bar* (фосфінотрицин-ацетилтрансфераза) під контролем промотору *nos*. Первинні трансгенні рослини (покоління Т0) перевірено на наявність трансгена за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до генів *ста* та *bar*. Трансгенні рослини салату (покоління Т0—Т2) та контрольні нетрансгенні рослини вирощували в закритому ґрунті в контрольованих умовах (теплиця, 24 °С, 16-годинний фотоперіод). З рослин віком п'ять—шість тижнів збирали листя для аналізу.

*Підготовка рослинних екстрактів.* Зразки (0,1 г свіжих листків) розтирали в ступці та екстрагували з п'ятьма об'ємами екстракційного буфера (50 мМ НЕРЕС рН 7,0, 10 мМ ацетату К, 5 мМ ацетату Mg, 0,05 % Tween-20, 300 мМ NaCl). Після інкубації протягом 20 хв на льоду та центрифугування протягом 15 хв за обертової частоти 13000 об/хв і температури 4 °С супернатант був використаний для визначення антимікробної активності.

*Тестування антибактеріальної активності.* Антибактеріальну активність рослинних екстрактів оцінювали *in vitro* методом дифузії в м'якому агарі (soft agar overlay assay). Як тестові мішені використовували непатогенні лабораторні штами *E. coli*: XL1-blue, DB3.1, DH5 $\alpha$ , Neb turbo та BL 1. Культури *E. coli* вирощували на середовищі Лурія—Бертані (LB) [13] за температури 37 °С протягом ночі. Чашки з агаризованим (1,5 %) LB готували заздалегідь, наливаючи ~25 мл розтопленого агаризованого середовища LB у стерильні чашки Петрі. М'яке агаризоване середовище LB (0,7 %) розплавляли, розподіляли по 25 мл у пробірки Falcon об'ємом 50 мл і інкубували за температури 50 °С. Бактеріальну культуру, вирощену протягом ночі, розводили до OD<sub>600</sub> = 1,0. Кожну аліквоту м'якого агаризова-



**Рис. 1.** Рослини (а) та суцвіття (б) трансгенних рослин салату з геном коліцину М в умовах теплиці

ного середовища LB (~45 °С) доповнювали 250 мкл бактеріальної культури з  $OD_{600} = 1,0$ , змішували і негайно виливали верхнім шаром на чашку з агаризованим (1,5 %) LB. Після застигання на верхній шар агару наносили 10 мкл рослинного екстракту. Як негативний контроль використовували екстракт з нетрансгенного салату. Чашки інкубували в термостаті за температури 37 °С протягом 18—24 год.

*Аналіз рослинної ДНК за допомогою ПЛР.* Геномну ДНК виділяли з листків салату за протоколом, що базується на використанні СТАВ для виділення ДНК з рослинних тканин [14]. ПЛР проводили в реакційному об'ємі 20 мл, що містив 50 нг тотальної рослинної ДНК, по 200 мМ прямого та зворотного праймерів, 200 мМ dNTP та 1 од. Тақ ДНК-полімерази (“Thermo Scientific”, США). Ампліфікацію проводили на приладі Mastercycler® personal (“Eppendorf”, США). Послідовності використаних праймерів для гена коліцину М (ста) були такими:

colM\_fwd 5'-ATGGAAACCCTTACTGTGCACGCTC-3';

colM\_rev 'CCTCTTACCAGACTCTTTGATGTG-3'.

Продукт ампліфікації (1006 п. н.) детектували після електрофорезу суміші ПЛР в 1 % агарозному гелі.

**Результати та обговорення.** У трансгенних рослин, які були отримані раніше [12], а також їх нащадків, що накопичують рекомбінантний антибактеріальний білок коліцин М, ми не спостерігали фенотипових відмінностей та морфологічних змін у розмірі, формі чи структурі листя, стебел або кореневої системи. Також ми не виявили впливу експресії трансгена на розвиток суцвіть та насіння і змін репродуктивної здатності рослин. Суцвіття не відрізнялися морфологічно від рослин дикого типу, а насіння зав'язувалося в результаті самозапилення у великій кількості (рис. 1).

Для дослідження успадкування трансгена у нащадків з вихідних трансгенних рослин збирали насіння, що формувалося після самозапилення. Після цього здійснювали аналіз сегрегації трансгена у потомстві. Кожну лінію вирощували в умовах теплиці і проводили тест на антибактеріальну активність.

Успадкування трансгенів визначали, використовуючи антибактеріальну активність рослинних екстрактів — ознаку, яка є наслідком експресії гена коліцину М. Чутливість лабораторних штамів *E. coli* до коліцину М дала нам змогу створити простий та ефективний тест для дослідження успадкування цього трансгена. Крім двох штамів *E. coli*, використа-

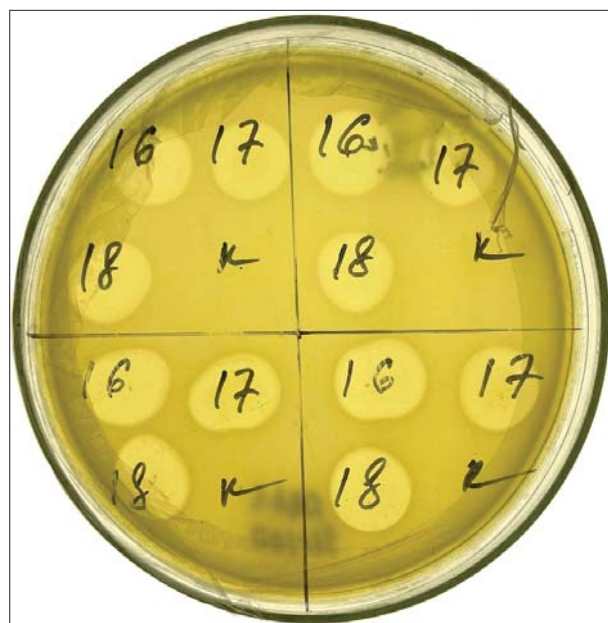


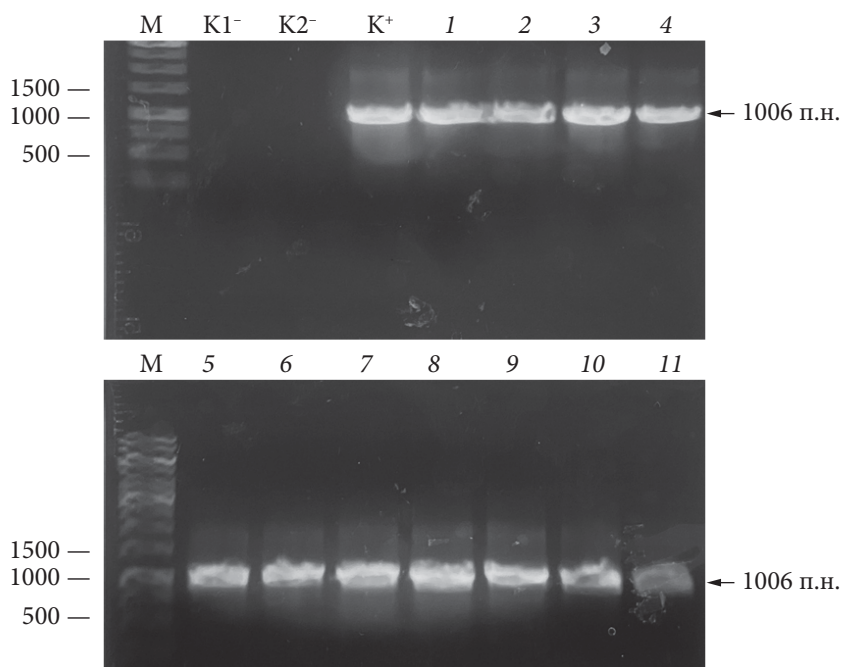
Рис. 2. Результат антибактеріального тесту для рослин наступного покоління (Т1) трансгенних ліній салату проти *E. coli* XL1-Blue. Цифрами позначені трансгенні рослини; К — екстракт контрольної (нетрансгенної) рослини

Таблиця 1. Чутливість лабораторних штамів *E. coli* до колицинівмісних екстрактів трансгенних рослин

| Штам <i>E. coli</i> | Чутливість до колицину М |
|---------------------|--------------------------|
| XL1-Blue            | Чутливий                 |
| DH10B               | Чутливий                 |
| DB3.1               | Чутливий                 |
| DH5alpha            | Чутливий                 |
| DB3.1               | Резистентний             |
| DH5alpha            | Резистентний             |

Таблиця 2. Результати аналізу антибактеріальної активності нащадків трансгенних ліній салату, в яких відбувається експресія гена колицину М

| Трансгенна лінія | Всього проаналізовано рослин | Виявлено антибактеріальну активність | Не виявлено антибактеріальної активності | Розщеплення |
|------------------|------------------------------|--------------------------------------|--|-------------|
| LS\colM_1        | 60                           | 60                                   | 0  | Відсутнє    |
| LS\colM_28       | 34                           | 26                                   | 8  | 3 : 1       |
| LS\colM_281      | 60                           | 43                                   | 17                                       | 3 : 1       |
| LS\colM_282      | 23                           | 20                                   | 3  | 7 : 1       |
| LS\colM_30       | 60                           | 60                                   | 0  | Відсутнє    |
| LS\colM_8        | 2                            | 2                                    | 0  | Відсутнє    |
| LS\colM_21       | 24                           | 6                                    | 18                                       | 1 : 3       |
| LS\colM_26       | 19                           | 13                                   | 6  | 2 : 1       |



**Рис. 3.** Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК в агарозному гелі після ПЛР з використанням праймерів, специфічних до гена колицину М: М — ДНК маркер (п. н.) O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder ("Thermo Scientific"); K<sup>+</sup> — позитивний контроль, продукти ампліфікації на матриці плазмідного вектора рNMD46772; K1<sup>-</sup> — негативний контроль, ПЛР без матриці; K2<sup>-</sup> — негативний контроль, ДНК нетрансгенної рослини салату; 1–11 — ПЛР фрагмент гена колицину М у складі геномної ДНК трансгенних ліній салату

них раніше (DH10B та XL1-Blue), ми додатково перевірили ще чотири штами на чутливість до колицину М. На підставі результатів аналізу різних лабораторних штамів *E. coli* на чутливість до екстрактів трансгенних рослин салату, що містять рекомбінантний колицин М, було підтверджено чутливість ще двох лабораторних штамів *E. coli* (DB3.1, DH5αра) до колицину М та резистентність двох інших штамів (Neb turbo та BL 1). Узагальнені результати щодо чутливості різних лабораторних штамів *E. coli* до колицину М наведено в табл. 1.

Екстракти, отримані з листків трансгенних рослин, виявляли виражену антибактеріальну активність проти чутливих штамів *E. coli*. На живильному середовищі з індикаторною культурою *E. coli* навколо нанесеного екстракту нащадків трансгенних рослин (Т1) у більшості зразків утворювалися чіткі зони затримки росту, тоді як екстракт з нетрансгенного салату не спричиняв жодного пригнічення (рис.2). Це свідчить про те, що трансген був успадкований, а концентрація синтезованого у листі колицину М була достатня, аби пригнічувати ріст *E. coli*.

Однак не всі досліджені рослини покоління Т1 виявляли антибактеріальну активність. Узагальнені результати експериментів з визначення антибактеріальної активності наведено в табл. 2. З вісьмох вихідних трансгенних ліній салату (Т0) тільки у двох ліній спостерігалось менделівське розщеплення трансгена в потомстві — приблизно 3 : 1 (трансгенні : нетрансгенні) — один домінуючий локус у гетерозиготі. На нашу думку, таке розщеплення з високою вірогідністю може свідчити про інтеграцію одичної вставки трансгена. Ще

в трьох ліній — 100 %, тобто всі перевірені нащадки мали антибактеріальну активність та успадкували ген коліцину М. Такий результат, найімовірніше, свідчить про наявність декількох вставок у геномі вихідної трансгенної рослини, що і зумовлює відсутність розщеплення у нащадків Т1. Ще три лінії показали різне співвідношення наявності та відсутності антибактеріальної активності у нащадків. Такі цифри, на нашу думку, можуть свідчити про множинні вставки та / або сайленсинг трансгенів внаслідок наявності гомології або впливу місця інтеграції трансгена [15, 16].

Для подальшої роботи ми відібрали лінії LS\colM\_28 та LS\colM\_281, в яких спостерігалось розщеплення приблизно 3 : 1 (75 % стійких рослин) і які розцінювалися як гемізиготні (трансген інтегрований в один локус гетерозиготно). Такі лінії додатково перевіряли методом ПЛР на наявність гена *ста* у випадково вибраних рослин потомства, аби підтвердити відсутність нетрансгенних варіантів (рис. 3). Серед рослин, які демонстрували антибактеріальну активність, нетрансгенних варіантів методом ПЛР не виявлено. У всіх рослин за умов проведення ПЛР з праймерами до гена *ста* ампліфікувався фрагмент очікуваної довжини — 1006 п. н. (див. рис. 3).

Для створення гомозиготних ліній відібрали по десять рослин нащадків трансгенних ліній LS\colM\_28 та LS\colM\_281, отриманих після самозапилення: LS\colM\_28\1 — LS\colM\_28\10 та LS\colM\_281\1 — LS\colM\_281\10. Насіння рослин цих ліній пророщували і обробляли гербіцидом Basta, оскільки трансгенні рослини містять крім гена коліцину М також ген *bar*, що надає стійкості до фосфіотрицину (дієвої речовини гербіциду). На першому етапі досліджень ми не застосовували гербіцид, оскільки мали на меті відібрати лінії з антибактеріальною активністю і саме за цією ознакою дослідити успадкування трансгена. Надалі використання гербіциду спрощувало аналіз нащадків на успадкування трансгена. Ми також проводили вибіркового аналізу на наявність антибактеріальної активності і відбирали лінії, у яких все потомство покоління Т2 було стійке до гербіциду, виявляло антибактеріальну активність та було ПЛР-позитивним на ген *ста*. У лінії, 100 % нащадків якої були трансгенні рослини, батьківська рослина була гомозигота. У такий спосіб нам вдалося отримати незалежні гомозиготні трансгенні лінії салату, що несуть ген коліцину М.

Відбір гомозиготних ліній значно спрощує подальшу роботу з трансгенними рослинами та їх практичне застосування, оскільки відпадає потреба у постійному відбраковуванні нетрансгенних ліній у кожному наступному поколінні і завдяки цьому зберігається стала експресія трансгена. Слід зауважити, що рівень експресії трансгена є непередбачуваним і залежить від місця інтеграції, а також кількості так званих вставок. Трансгенні лінії з одиночною вставкою генетично стабільніші та рідше піддаються сайлесингу, ніж лінії з множинними копіями вставок, які можуть зазнавати метилування як повтори [15—17]. Отже, раціональний відбір подій трансформації на ранньому етапі (за критерієм наявності експресії та одиночною вставкою) полегшує подальше створення гомозиготних ліній зі стабільною експресією трансгена.

На тлі зростання антибіотикорезистентності застосування бактеріоцинів, які діють за принципово іншими механізмами, розглядається як перспективна альтернатива антибіотикам. Наше дослідження демонструє реальну реалізацію такого підходу: рослини салату, які самі можуть бути джерелом зараження, перетворено на продуцентів антимікробного рекомбінантного білка, здатного нейтралізувати патоген [12]. Додавання висушеної біо-

маси таких рослин до кормів тварин на фермах може зменшити колонізацію кишечника великої рогатої худоби патогенною *E. coli*, тим самим знизити пов'язану з цим смертність молодняка тварин, а також контамінацію м'яса та овочів.

**Висновки.** Результати дослідження свідчать про те, що істівні трансгенні рослини здатні синтезувати антимікробні білки без втрати їхньої активності, накопичувати цей білок у кількості, достатній для прояву антибактеріальної активності, та успадковувати цю ознаку. Гомозиготність трансгена забезпечує успадкування ознаки всіма нащадками, що робить ці лінії перспективними для подальшого використання. Отримані результати є важливим кроком до створення функціональних харчових добавок на основі рослин, здатних протидіяти патогенним бактеріям, і до розроблення нових підходів у подоланні проблеми антибіотикорезистентності.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. WHO warns of widespread resistance to common antibiotics worldwide. World Health Organization (WHO). 2025. 13 October. URL: <https://www.who.int/news/item/13-10-2025-who-warns-of-widespread-resistance-to-common-antibiotics-worldwide>. (Дата звернення: 20.11.2025).
2. Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*. 2017. **543**. 15. <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550>
3. Sheu C.-C., Chang Y.-T., Lin S.-Y., Chen Y.-H., Hsueh P.-R. Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An update on therapeutic options. *Front. Microbiol.* 2019. **10**. 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>
4. Record-high rates of STEC and Listeria infections in the EU/EEA in 2023. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2025. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/record-high-rates-stec-and-listeria-infections-eueea-2023>. (Дата звернення: 20.11.2025).
5. Navarro-Garcia F. *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Microbiol. Spectr.* 2014. **2**, № 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0008-2013>
6. Tietze E., Dabrowski P.W., Prager R., Radonic A., Fruth A., Auraß P., Nitsche A., Mielke M., Fliieger A. Comparative genomic analysis of two novel sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strains isolated 2011 in Germany. *PLoS One*. 2015. **10**, № 4. e0122074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122074>
7. Quinn O., Yanshi, King G., Hoban A., Sawyer C., Douglas A., Painset A., Charlett A., Nelson A., Rees C., Byers C., Williams C., Brown C., Mohan K., Brown C., Jenkins C., Neill C., Leckenby G., Larkin L., Allison L., Olufon O., Nickbakhsh S., Mannes T., Inns T., Balasegaram S. National outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 associated with pre-packed sandwiches, United Kingdom, May–June 2024. *Epidemiol. Infect.* 2024. **152**. e179. <https://doi.org/10.1017/S0950268824001729>
8. Biswas S., Bal M., Pati S., Rana R., Dixit S., Ranjit M. Antibiotic resistance in toxigenic *E. coli*: a severe threat to global health. *Discov. Med.* 2024. **1**, № 1. 72. <https://doi.org/10.1007/s44337-024-00102-x>
9. Schulz S., Stephan A., Hahn S., Bortesi L., Jarczowski F., Bettmann U., Paschke A.-K., Tusé D., Stahl C.H., Giritch A., Gleba Yu. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. **112**. P. E5454–E5460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513311112>
10. Hahn-Löbmann S., Stephan A., Schulz S., Schneider T., Shaverskyi A., Tusé D., Giritch A., Gleba Yu. Colicins and salmocins — new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials. *Front. Plant Sci.* 2019. **10**. 437. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00437>
11. Łojewska E., Sakowicz T., Kowalczyk A., Konieczka M., Grzegorzczak J., Sitarek P., Skąła E., Czarny P., Śliwiński T., Kowalczyk T. Production of recombinant colicin M in *Nicotiana tabacum* plants and its antimicrobial activity. *Plant Biotechnol. Rep.* 2020. **14**. P. 33–43. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00571-y>
12. Shcherbak N., Prochaska H., Lystvan K., Prokhorova Y., Giritch A., Kuchuk M. Accumulation of colicin M protein and its biological activity in transgenic lettuce and mizuna plants. *Front. Plant Sci.* 2023. **14**. 1271757. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1271757>

13. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1951. **62**, № 3. P. 293—300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
14. Healey A., Furtado A., Cooper T., Henry R.J. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods.* 2014. **10**. 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
15. Rajeevkumar S., Anunanthini P., Sathishkumar R. Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front. Plant Sci.* 2015. **6**. 693. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>
16. Vaucheret H. Epigenetic management of self and non-self: lessons from 40 years of transgenic plants. *C. R. Biol.* 2023. **345**, № 4. P. 149-174. <https://doi.org/10.5802/crbiol.96>
17. James V.A., Avart C., Worland B., Snape J.W., Vain P. The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 2002. **104**, № 4. P. 553—561. <https://doi.org/10.1007/s001220100745>

Надійшла до редакції 30.11.2025

## REFERENCES

1. WHO warns of widespread resistance to common antibiotics worldwide (2025). World Health Organization (WHO). Retrieved from <https://www.who.int/news/item/13-10-2025-who-warns-of-widespread-resistance-to-common-antibiotics-worldwide>
2. Willyard, C. (2017). The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*, 543, 15. <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550>
3. Sheu, C.-C., Chang, Y.-T., Lin, S.-Y., Chen, Y.-H. & Hsueh, P.-R. (2019). Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An update on therapeutic options. *Front. Microbiol.*, 10, 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>
4. Record-high rates of STEC and Listeria infections in the EU/EEA in 2023 (2025, June 5). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/record-high-rates-stec-and-listeria-infections-eueea-2023>
5. Navarro-Garcia, F. (2014). *Escherichia coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli*/Shiga toxin-producing *E. coli* explosive cocktail of high virulence. *Microbiol. Spectr.*, 2, No. 6. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0008-2013>
6. Tietze, E., Dabrowski, P. W., Prager, R., Radonic, A., Fruth, A., Auraß, P., Nitsche, A., Mielke, M. & Flieger, A. (2015). Comparative genomic analysis of two novel sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strains isolated 2011 in Germany. *PloS One*, 10, No. 4, e0122074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122074>
7. Quinn, O., Yanshi, King, G., Hoban, A., Sawyer, C., Douglas, A., Painset, A., Charlett, A., Nelson, A., Rees, C., Byers, C., Williams, C., Brown, C., Mohan, K., Brown, C., Jenkins, C., Neill, C., Leckenby, G., Larkin, L., Allison, L., Olufon, O., Nickbakhsh, S., Mannes, T., Inns, T. & Balasegaram, S. (2024). National outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:H28 associated with pre-packed sandwiches, United Kingdom, May—June 2024. *Epidemiol. Infect.*, 152, e179. <https://doi.org/10.1017/S0950268824001729>
8. Biswas, S., Bal, M., Pati, S., Rana, R., Dixit, S. & Ranjit, M. (2024). Antibiotic resistance in toxigenic *E. coli*: a severe threat to global health. *Discov. Med.*, 1, No. 1, 72. <https://doi.org/10.1007/s44337-024-00102-x>
9. Schulz, S., Stephan, A., Hahn, S., Bortesi, L., Jarczowski, F., Bettmann, U., Paschke, A.-K., Tusé, D., Stahl, C. H., Giritch, A. & Gleba, Yu. (2015). Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112, pp. E5454-E5460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513311112>
10. Hahn-Löbmann, S., Stephan, A., Schulz, S., Schneider, T., Shaverskyi, A., Tusé, D., Giritch, A. & Gleba, Yu. (2019). Colicins and salmocins — new classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials. *Front. Plant Sci.*, 10, 437. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00437>
11. Łojewska, E., Sakowicz, T., Kowalczyk, A., Konieczka, M., Grzegorzczak, J., Sitarek, P., Skała, E., Czarny, P., Śliwiński, T. & Kowalczyk, T. (2020). Production of recombinant colicin M in *Nicotiana tabacum* plants and its antimicrobial activity. *Plant Biotechnol. Rep.*, 14, pp. 33-43. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00571-y>
12. Shcherbak, N., Prochaska, H., Lystvan, K., Prokhorova, Y., Giritch, A. & Kuchuk, M. (2023). Accumulation of colicin M protein and its biological activity in transgenic lettuce and mizuna plants. *Front. Plant Sci.*, 14, 1271757. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1271757>

13. Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62, No. 3, pp. 293-300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
14. Healey, A., Furtado, A., Cooper, T. & Henry, R. J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10, 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
15. Rajeevkumar, S., Anunanthini, P. & Sathishkumar, R. (2015). Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front. Plant Sci.*, 6, 693. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>
16. Vaucheret, H. (2023). Epigenetic management of self and non-self: lessons from 40 years of transgenic plants. *C. R. Biol.*, 345, No. 4, pp. 149-174. <https://doi.org/10.5802/crbio.96>
17. James, V. A., Avart, C., Worland, B., Snape, J. W. & Vain, P. (2002) The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. *Theor. Appl. Genet.*, 104, No. 4, pp. 553-561. <https://doi.org/10.1007/s001220100745>

Received 30.11.2025

N.L. Shcherbak, <https://orcid.org/0000-0002-2478-8408>

V.A. Galkina, <https://orcid.org/0000-0002-3231-4085>

M.V. Kuchuk, <https://orcid.org/0000-0001-7365-7474>

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

E-mail: natalia@icbge.org.ua

#### INHERITANCE OF GENE ENCODING THE ANTIBACTERIAL PROTEIN COLICIN M IN THE OFFSPRING OF LETTUCE TRANSGENIC PLANTS

The increasing antibiotic resistance of bacterial pathogens and recurring outbreaks of foodborne infections caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains require the search for alternative means of preventing infectious diseases and controlling pathogenic strains. One promising approach is the use of bacteriocins—antimicrobial proteins of bacterial origin that also can be successfully produced in biotechnological plants. Previously, we demonstrated the creation of transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants expressing one of the bacteriocins, colicin M, and confirmed the antibacterial activity of extracts from these plants against various *E. coli* strains, including pathogenic serotypes such as O157:H7. In this study, we present research on the transgene inheritance in the progeny of these transgenic plants, the identification of lines potentially with a single insertion, and the development of stable homozygous transgenic lettuce lines with the colicin M gene. The presence of colicin M expression in the progeny of transgenic lettuce plants was assessed by determining the antibacterial activity of plant extracts against laboratory strains of *E. coli*. The results of this work confirm the potential for developing biotechnological plants that produce antimicrobial proteins to combat bacterial pathogens.

**Keywords:** bacteriocins, colicin M, transgenic lettuce, pathogenic *Escherichia coli*, multi-drug resistance, inheritance of transgenes.