

УДК 635.5:581.143.5
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-3-15-17>

Романова О.В.,
 Солдатенко А.В.,
 Романов В.С.

ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»
 143072, Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,
 п. ВНИИССОК, ул. Селекционная д. 14
 E-mail: ArkisOlga@yandex.ru, alex-soldat@mail.ru,
 romanov_valera@mail.ru

Ключевые слова: : салат, *Lactuca sativa* L.,
 биотехнология, *in vitro*, клональное размножение,
 растения-регенеранты.

Конфликт интересов: Авторы заявляют
 об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Романова О.В., Солдатенко А.В.,
 Романов В.С. СИСТЕМА РЕГЕНЕРАЦИИ САЛАТА
 (*LACTUCA SATIVA* L.) ЧЕРЕЗ КУЛЬТУРУ *IN VITRO*.
 Овощи России. 2019;(3):15-17.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-3-15-17>

Поступила в редакцию: 06.06.2019
Опубликована: 25.06.2019

Romanova O.V.,
 Soldatenko A.V.,
 Romanov V.S.

FSBSI Federal Scientific Vegetable Center
 Selectionaya St. 14, p. VNIISOK, Odintsovo district,
 Moscow region, 143072, Russia
 E-mail: ArkisOlga@yandex.ru, alex-soldat@mail.ru,
 romanov_valera@mail.ru

Keywords: lettuce, *Lactuca sativa* L., biotechnology,
in vitro, clonal reproduction, regenerative plants.

Conflict of interest: The authors declare
 no conflict of interest.

For citation: Romanova O.V., Soldatenko A.V., Romanov
 V.S. REGENERATION SYSTEM OF LETTUCE (*LACTU-*
CA SATIVA L.) THROUGH *IN VITRO* CULTURE.
 Vegetable crops of Russia. 2019;(3):15-17 (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-3-15-17>

Received: 06.06.2019
Accepted: 25.06.2019

СИСТЕМА РЕГЕНЕРАЦИИ САЛАТА (*LACTUCA SATIVA* L.) ЧЕРЕЗ КУЛЬТУРУ *IN VITRO*



Статья посвящена проблеме получения растений-регенерантов сортов салата (*Lactuca sativa* L.) Букет, Изумрудный, Хамелеон (селекции ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»). Культура салата является неотзывчивой к условиям *in vitro* и требует разработки альтернативных условий регенерации. Семена поверхностно стерилизовали в 96% этаноле (30 с), затем 15 минут в 50% водном растворе «Белизны» с добавлением Твина-20 (1 капля на 100 мл), промывали трехкратно в стерильной дистиллированной воде. Затем семена салата помещали в чашки Петри на среду Gamborg B5 (2% сахарозы, 3,0 г/л фитогеля). Через 10 суток полученные проростки черенковали, листовые пластинки иссекали на квадраты размером 1 см и переносили на среду MS B5 (2% сахарозы) с тремя вариантами концентрации гормонов: 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, 1 мг/л НУК и 0,1 мг/л БАП. Образовавшиеся побеги укореняли на среде MS (2% сахарозы, 7,0 г/л агара). Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при 25°C и фотопериоде 14 часов, освещенности 2,5 тыс. люкс. По результатам исследований подобрана концентрация гормонов (0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП), которая позволила получить до 10 побегов с одного листового экспланта. Наибольшее число побегов отмечалось на листовых эксплантах, расположенных ближе к центральной жилке листа. Полученные данные позволили совершенствовать системы регенерации сортов салата Изумрудный, Букет и Хамелеон.

REGENERATION SYSTEM OF LETTUCE (*LACTUCA SATIVA* L.) THROUGH *IN VITRO* CULTURE

The article is devoted to the problem of obtaining regenerative plant varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) Bouquet, Emerald, Chameleon (FSBSI Federal Scientific Vegetable Center). Salad culture is insensitive to *in vitro* conditions and requires the development of alternative regeneration conditions. Seeds were surface sterilized in 96% ethanol (30 s), then 15 minutes in 50% aqueous solution of "Whiteness" with the addition of Twin-20 (1 drop per 100 ml), washed three times in sterile distilled water. Then lettuce seeds were placed in Petri dishes on Gamborg B5 medium (2% sucrose, 3,0 g/l fitogeli). After 10 days, the obtained seedlings were cut, the leaf blades were cut into squares 1 cm in size and transferred to medium MS B5 (2% sucrose) with three variants of hormone concentrations: 0.1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA and 1 mg/l BAP, 1 mg/l NAA and 0.1 mg/l BAP. The formed shoots were rooted on MS medium (2% sucrose, 7,0 g/l agar). Cultivation was carried out on racks with fluorescent lamps at 25°C and a photoperiod of 14 hours, illumination of 2,5 thousand Lux. According to the results of studies, the concentration of hormones (0,1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP) was selected, which allowed to obtain up to 10 shoots from one leaf explant. Moreover, the largest number of shoots was noted on leaf explants located closer to the veins of the sheet. The obtained data allowed to improve the system of regeneration of varieties of emerald lettuce, Bouquet and Chameleon.

Салат (*Lactuca sativa* L.), одна из главных свежих листовых овощных культур, относится к семейству Астровые (*Asteraceae* (*Compositae*)). Это самоопыляемая культура, которая может возделываться круглогодично во всем мире. По данным FAOSTAT в 2017 году самыми крупными производителями являлись Китай (56%), США (14%) и страны ЕС (11%). Общий объем производства салата-латука и салата цикорного составил 26,866557 млн т (2,5% от общего объема производства овощей). Салат является диетическим продуктом, особенно при употреблении в свежем виде. Это способствует широкому распространению культуры салата в мире и увеличению объема производства.

Современные задачи селекции салата сводятся к улучшению качества продукции и устойчивости к вредителям и болезням. Эти задачи могут быть выполнены с использованием методов биотехнологии. С помощью культуры *in vitro* возможно сохранить ценные генотипы салата и получить оздоровленные семена, а также сократить период селекционных программ. Методы гаплоидизации представляют интерес для получения чистых линий. Регенерация через соматический эмбриогенез является источником соматоклональной изменчивости (Saricam et al., 2017).

Для успешного использования системы *in vitro* необходима надежная система регенерации, обеспечивающая получение множественных побегов. На эффективность регенерации влияют три основных фактора: выбор отзывчивого генотипа, подбор исходного экспланта и адаптация состава питательной среды (Xinrun, Conner, 1992; Ampomah-Dwamena et al., 1997;

Mohebodini et al., 2011; Armaz et al., 2017).

В случае культуры салата многие сорта являются неотзывчивыми к условиям *in vitro*. Результаты регенерации сильно варьируют в экспериментах и зависят от генотипа (Curtis et al., 1994).

Органогенез побегов может быть вызван культивированием 3-7 дневных семядольных эксплантов на различных твердых средах и различной комбинацией гормонов (Doerschug, Miller, 1967; Koevary et al., 1978; Webb et al., 1984; Teng et al., 1992; Hunter, Burritt, 2002; Latif et al., 2014).

Наиболее распространенный подход (Hunter, Burritt, 2002), позволяющий получать до 72% регенерации побегов (Mohebodini et al., 2011), содержит 0,09 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК или их незначительные вариации (Teng et al., 1992; Kanamoto et al., 2003).

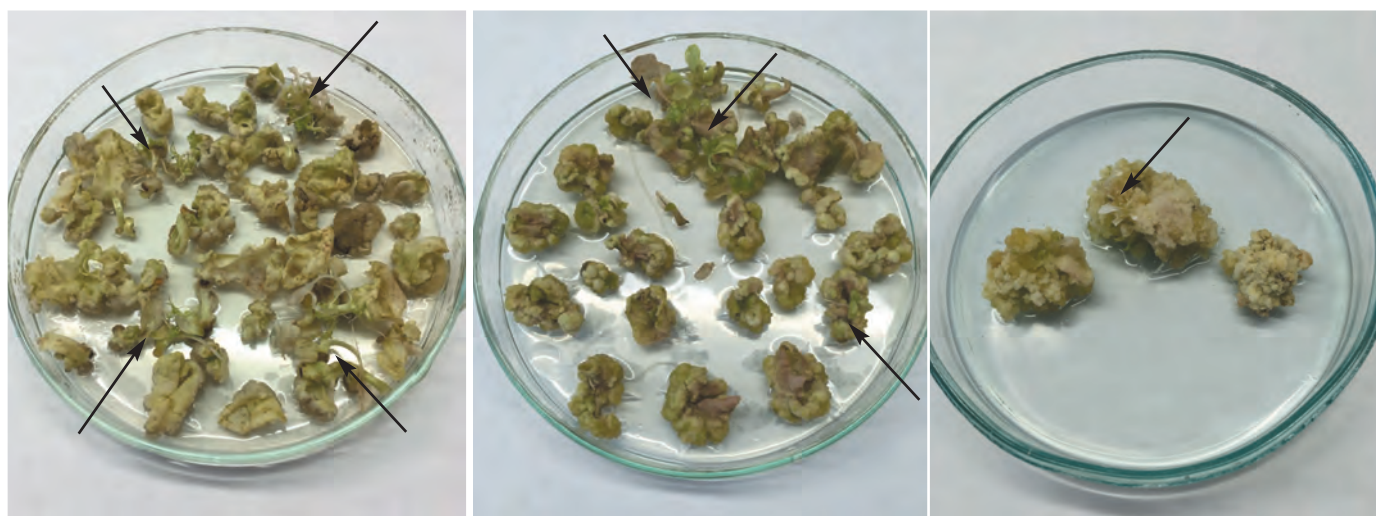
Замена смеси солей Мурасиге и Скуга (МС) на смесь солей Шенка и Хильдебрандта (ШХ) не влияла на результат, также замена сахарозы на глюкозу не показала отличий.

Увеличение концентрации БАП с 0,09 мг/л до 9 мг/л и НУК с 0,05 мг/л до 0,45 мг/л значительно ускорило появление побегов и скорость их роста. Однако побеги имели удлиненные стебли и листья с неправильной формой лопасти. Регенерация была очень низкой, побеги развивались медленно, часто вовсе останавливались в росте. Добавление активированного угля в питательную среду (200 мг/л) требовало повышенных концентраций гормона роста БАП (5-10 мг/л), хотя отмечался сильный и значительный рост побегов вокруг эксплантов у 64-87% образцов (Armaz et al., 2017).

В ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» в лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений начаты исследования по клональному микроразмножению салата (Романова и др., 2019), чтобы в дальнейшем этот этап вошел в протокол получения гаплоидных растений салата через культуру *in vitro*.



Рис. 1. Проростки салата сорта Букет через 7 и 11 суток, полученные на среде Gamborg B5 (2% сахарозы, 3,0 г/л фитогел).
Fig. 1. Sprouts of Buket variety lettuce after 7 and 11 days, obtained on Gamborg B5 medium (2% sucrose, 3.0 g/l phytogel).



Изумрудный

Хамелеон

Букет

Рис. 2. Культивирование эксплантов растений салата сорта Изумрудный, Хамелеон и Букет на среде МС В5 с 2% сахарозой (стрелками показано побегообразование).
Fig. 2. Cultivation of plant explants lettuce varieties Emerald, Chameleon and Bouquet on medium MS B5 with 2% sucrose (the arrows indicate the shoot formation).



Рис. 3. Образование множественных проростков растений-регенерантов салата сорта Изумрудный.

Fig. 3. Formation of multiple seedlings of plants-regenerants of the Emerald variety lettuce.

Объекты и методы исследования

Целью настоящей работы является разработка системы регенерации культур вида *Lactuca sativa* L. Объектами исследования служили

сорта салата (*Lactuca sativa* L.): Букет, Изумрудный, Хамелеон.

Семена листового салата поверхностно стерилизовали погружением на 30 с в 96% этанол, затем в 50% водный раствор «Белизны» с добавлением Твина-20 (1 капля на 100 мл) в течение 15 минут и промывали трехкратно в стерильной дистиллированной воде.

Поверхностно стерилизованные семена салата помещали в чашки Петри на среду Gamborg B5, содержащей 2% сахарозу и 3,0 г/л фитогеля (рис. 1.). Через 14 суток полученные проростки черенковали, листовые пластинки иссекали на квадраты размером 1 см и переносили на среду MC B5 с 2% сахарозой с тремя вариантами концентрации гормонов: 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, 1 мг/л НУК и 0,1 мг/л БАП. Образовавшиеся побеги укореняли на среде MC с 2% сахарозы и 7,0 г/л агара (рис. 2, 3). Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при 25°C и фотопериоде 14 часов, освещенности 2,5 тыс. люкс.

Результаты

Согласно проведенным исследованиям для регенерации сортов салата

Изумрудный, Букет и Хамелеон были определены оптимальные питательные среды для индукции (Gamborg B5 с 2% сахарозой и 3,0 г/л фитогеля), регенерации (MC B5 с 2% сахарозой) и укоренения побегов салата (MC с 2% сахарозой и 3,0 г/л фитогеля). Также была подобрана концентрация гормонов (0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП), которая позволила получить до 10 побегов с одного листового экспланта. Причем наибольшее число побегов отмечалось на листовых эксплантах, расположенных ближе к центральной жилке листа. Регенерация для сорта Букет характеризовалась длительной стадией калусообразования (рис. 2). Полученные данные позволили совершенствовать технологию регенерации сортов салата Изумрудный, Букет и Хамелеон.

Регенерация салата *in vitro* может занять месяцы из-за неудачного сочетания генотипа и состава питательной среды (Teng et al., 1992; Xinrun, Conner, 1992; Curtis et al., 1994; Ampomah-Dwamena et al., 1997). Невозможно найти состав среды, которая обеспечивает высокие уровни индукции на любом сорте салата. Для неотзывчивых сортов необходима разработка альтернативных условий регенерации.

Об авторах:

Романова О.В. – кандидат с.-х. наук, м.н.с.

<https://orcid.org/0000-0002-6513-1541>

Солдатенко А.В. – доктор с.-х. наук, проф. РАН, главный н.с.

<https://orcid.org/0000-0002-9492-6845>

Романов В.С. – кандидат с.-х. наук, с.н.с.

<https://orcid.org/0000-0002-3287-1914>

About the authors:

Romanova O.V. – Candidate of Agricultural Sciences, Junior Researcher

<https://orcid.org/0000-0002-6513-1541>

Soldatenko A.V. – Doctor of Agricultural Sciences, prof. RAS, Chief Researcher

<https://orcid.org/0000-0002-9492-6845>

Romanov V.S. – Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher

<https://orcid.org/0000-0002-3287-1914>

Литература

1. Saricam S., Kantoglu K. Y., Ellialtioglu S.S. Tissue culture applications in lettuce (*Lactuca sativa* L.). CES Science Group. Euras. J. Agr. Res. 2017(1(2)):99-107.
2. Xinrun Z., Conner A.J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. J Genet Breed. 1992;(46): 287-90.
3. Ampomah-Dwamena C., Conner A.J., Fautrier A.G. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration *in vitro*. Sci. Hortic. (Amsterdam). 1997;(71):137-145.
4. Mohebodin M., Javaran M.J., Mahboudi F., Alizadeh H. Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Aust. J Crop Sci. 2011;(5):92-95.
5. Armas I., Pogrebnjak N., Raskin I. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). Plant Methods. 2017;(13):1-9. DOI: 10.1186/s13007-017-0208-0
6. Curtis I.S., Power J.B., Blackhall N.W., De Laat A.M.M., Davey M.R. Genotype independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. J Exp Bot. 1994;(45):1441-1449.
7. Doerschug M.R., Miller C.O. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. Am. J. Bot. 1967;(54):410-413.
8. Koevary K., Rappaport L., Morris L.L. Tissue culture propagation of Head lettuce. Hortic. Sci. 1978;(13):39-41.
9. Webb D.T., Torres L.D., Fobert P. Interactions of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons *in vitro*. Can J Bot. 1984;(62):586-590.
10. Teng W.L., Liu Y.J., Soong T.S. Rapid regeneration of lettuce from suspension culture. Hortic Sci. 1992;(27):1030-1032.
11. Hunter D.C., Burritt D.J. Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Sci Hortic (Amsterdam). 2002;(95):269-276.
12. Latif B., Javaran M.J., Alizadeh H., Memari H.R., Mohammadi R. Interactions of genotype and plant growth regulators affecting direct shoot regeneration of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Int. J. Biosci. 2014;(5(1)). – P.315-322.
13. Kanamoto H., Yamashita A., Asao H., Okumura S., Takase H., Hattori M., et al. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. Transgenic Res. 2006;(15):205-217.
14. Романова О.В., Солдатенко А.В., Чичварина О.А., Ахраменко В.А., Павлова О.В., Романов В.С. Разработка элементов технологии получения посадочного материала салата (*Lactuca sativa* L.) на безвирусной основе с использованием методов биотехнологии. Овощи России. 2019;(2):22-26. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-2-22-26>

References

1. Saricam S., Kantoglu K. Y., Ellialtioglu S.S. Tissue culture applications in lettuce (*Lactuca sativa* L.). CES Science Group. Euras. J. Agr. Res. 2017(1(2)):99-107
2. Xinrun Z., Conner A.J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. J Genet Breed. 1992;(46): 287-90.
3. Ampomah-Dwamena C., Conner A.J., Fautrier A.G. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration *in vitro*. Sci. Hortic. (Amsterdam). 1997;(71):137-145.
4. Mohebodin M., Javaran M.J., Mahboudi F., Alizadeh H. Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Aust. J Crop Sci. 2011;(5):92-95.
5. Armas I., Pogrebnjak N., Raskin I. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). Plant Methods. 2017;(13):1-9. DOI: 10.1186/s13007-017-0208-0
6. Curtis I.S., Power J.B., Blackhall N.W., De Laat A.M.M., Davey M.R. Genotype independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. J Exp Bot. 1994;(45):1441-1449.
7. Doerschug M.R., Miller C.O. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. Am. J. Bot. 1967;(54):410-413.
8. Koevary K., Rappaport L., Morris L.L. Tissue culture propagation of Head lettuce. Hortic. Sci. 1978;(13):39-41.
9. Webb D.T., Torres L.D., Fobert P. Interactions of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons *in vitro*. Can J Bot. 1984;(62):586-590.
10. Teng W.L., Liu Y.J., Soong T.S. Rapid regeneration of lettuce from suspension culture. Hortic Sci. 1992;(27):1030-1032.
11. Hunter D.C., Burritt D.J. Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Sci Hortic (Amsterdam). 2002;(95):269-276.
12. Latif B., Javaran M.J., Alizadeh H., Memari H.R., Mohammadi R. Interactions of genotype and plant growth regulators affecting direct shoot regeneration of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Int. J. Biosci. 2014;(5(1)). – P.315-322.
13. Kanamoto H., Yamashita A., Asao H., Okumura S., Takase H., Hattori M., et al. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. Transgenic Res. 2006;(15):205-217.
14. Romanova O.B., Soldatenko A.V., Chichvarina O.A., Akhramenko V.A., Pavlova O.V., Romanov V.S. Development of elements of technology for planting material of lettuce (*Lactuca sativa* L.) on virus-free basis using methods of biotechnology. Vegetable crops of Russia. 2019;(2):22-26. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-2-22-26>