
<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.094>

УДК 581.143.6

**Ю.В. Приймак¹, О.Є. Смірнов¹,
Н.Ю. Таран¹, В.В. Швартау²**

¹ ННЦ “Інститут біології та медицини”

Київського національного університету ім. Тараса Шевченка

² Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

E-mail: plantaphys@gmail.com

Особливості калусогенезу контрастних за вмістом антоціанів сортів *Lactuca sativa* L.

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.В. Швартау

*Апробовано підбір умов для введення в культуру in vitro двох контрастних за вмістом антоціанів сортів салату посівного (*Lactuca sativa* L.) — Лоло Біонда (зелений) та Лоло Росса (червоний). Проведено порівняння впливу фітогормонального співвідношення і обробки стерилізуючими агентами на індукцію калусогенезу, площу, консистенцію та структуру шеститижневих первинних калусів обох сортів. Встановлено, що за умов вирощування на середовищах зі співвідношенням регуляторів росту: 6-бензиламінопурин (БАП) — 0,3 мг/л, нафтилоцтова кислота (НОК) — 2 мг/л, 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота (2,4-Д) — 0,2 мг/л та БАП — 10 мг/л, НОК — 0,5 мг/л відбувається стимуляція калусогенезу з експлантів сім'ядольних листків асептичних проростків обох сортів. Значну стимуляцію росту первинних калусів сорту Лоло Росса зафіксовано у варіанті стерилізації експлантів хлоридом ртуті і гіпохлоритом натрію. Досліджено гетерогенність клітинного складу калусної тканини і можливість отримання пухкого та компактного калусів обох сортів.*

Ключові слова: калусогенез, первинний калус, *Lactuca sativa* L., Лоло Біонда, Лоло Росса.

Представники виду салату посівного (*Lactuca sativa* var. *secalina*) — трав'янисті, листові самозапильні однорічні рослини родини айстрових, що культивуються в усьому світі для споживання вегетативної маси в сирому вигляді. Салат є цінною харчовою культурою, оскільки містить значну кількість вітамінів, мікро- та макроелементів, каротинів, антоціанів, гідроксикоричних кислот. За оцінкою Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН у 2014 р. щодо культивування салату, у рік його виробництво сягає 25 мільйонів метричних тонн з валовою продукцією понад 12 мільйонів доларів США [1]. Різноманітні сорти салату посівного є матеріалом для поліпшення агрономічних ознак у біофортифікаційних дослідженнях для використання в галузі функціонального харчування [2]. Дослі-

Цитування: Приймак Ю.В., Смірнов О.Є., Таран Н.Ю., Швартау В.В. Особливості калусогенезу контрастних за вмістом антоціанів сортів *Lactuca sativa* L. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 7. С. 94–100. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.07.094>

дження і виведення сортів з ознаками гербіцидної та вірусної резистентності, екологічної пластичності, підвищеною врожайністю, накопиченням фармацевтично цінних білків, підвищеним вмістом кальцію в листках, а також збільшенням загального вмісту фенольних сполук та антоціанів відбувається в умовах введення салату посівного в культуру *in vitro*, субкультивування та підтримки здатності калусів до регенерації [3, 4]. Успішність введення *L. sativa* в культуру *in vitro* сильно варіює залежно від сортових особливостей [5, 6]. Тому ми ставили за мету підбір умов для індукції калусогенезу та отримання первинних калусів різної консистенції двох контрастних за вмістом антоціанів сортів *L. sativa* — зеленого Лоло Біонда та червоного Лоло Росса.

Матеріали і методи. Поверхневу стерилізацію насіння салату посівного (*Lactuca sativa* L.) проводили в 70 %-му етанолі та 3 %-му розчині хлораміну з додаванням Tween 20. Досліджували особливості калусогенезу первинної калусної культури двох сортів *L. sativa*, що є контрастними за вмістом антоціанів — непластидних пігментів з антиоксидантними властивостями. В культуру *in vitro* рослини зеленого сорту Лоло Біонда і червоного сорту Лоло Росса вводили через стадію асептичних проростків, які вирощували на 50 %-му середовищі Мурасіге—Скуга з додаванням 1 % сахарози і без регуляторів росту протягом 5 діб з фотоперіодом 16/8 (густина потоку фотосинтетичних фотонів ≈ 200 мкмоль фотонів \cdot м⁻² \cdot с⁻¹) при 25 °С. Для отримання первинної калусної тканини експланти сім'ядольних листків асептичних проростків проводили через стерилізацію для дослідження впливу обробки експлантів стерилізуючими агентами (HgCl₂ і NaOCl) на калусогенез. Простерилізовані експланти переносили на середовища Мурасіге—Скуга з різним вмістом регуляторів росту. Середовище № 1: 6-бензиламінопурин (БАП) — 0,3 мг/л, нафтилоцтова кислота (НОК) — 2 мг/л, 2,4-дихлорфеноксіцтова кислота (2,4-Д) — 0,2 мг/л. Середовище № 2: БАП — 0,09 мг/л, НОК — 0,1 мг/л. Середовище № 3: БАП — 10 мг/л, НОК — 0,5 мг/л [7].

Як контрольні параметри використовували відсоток калусогенезу — відношення кількості експлантів, на яких відбувся калусогенез, до загальної кількості експлантів в одному варіанті через тиждень експозиції і розмір калусів у 1 мм² через шість тижнів за допомогою фотофіксації та програмного забезпечення ImageJ [8]. Морфологічні особливості, консистенцію та цитологічну гетерогенність калусів оцінювали за допомогою виготовлення тимчасових давлених препаратів, профарбованих 1 %-м водним розчином толюїдинового синього [9].

Біологічна повторність кожного експерименту трикратна. Математичну обробку даних здійснювали методом дисперсійного аналізу з подальшим застосуванням множинного рангового критерію Дункана. Дані вважали достовірними при рівні значущості $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Утворення калусної тканини і ефективність регенерації салату посівного на середовищах з різним співвідношенням регуляторів росту сильно варіюють залежно від досліджуваного генотипу [10]. Успішність введення в культуру *in vitro* сортів Лоло Біонда та Лоло Росса оцінювали за показником калусоутворення для підбору оптимальних умов індукції калусогенезу. Через тиждень після пересадки на різні за фітогормональним складом середовища показник утворення первинних калусів на середовищі № 2 становив 11 % для сорту Лоло Біонда та 16 % для сорту Лоло Росса. Високий показник калусоутворення зафіксовано на середовищах № 1 і № 3 — індукція калусогенезу обох сортів відбулась у понад 90 % експлантів сім'ядольних листків асептичних проростків.

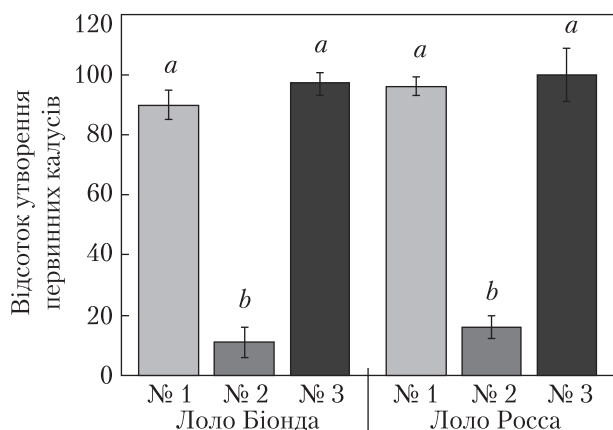
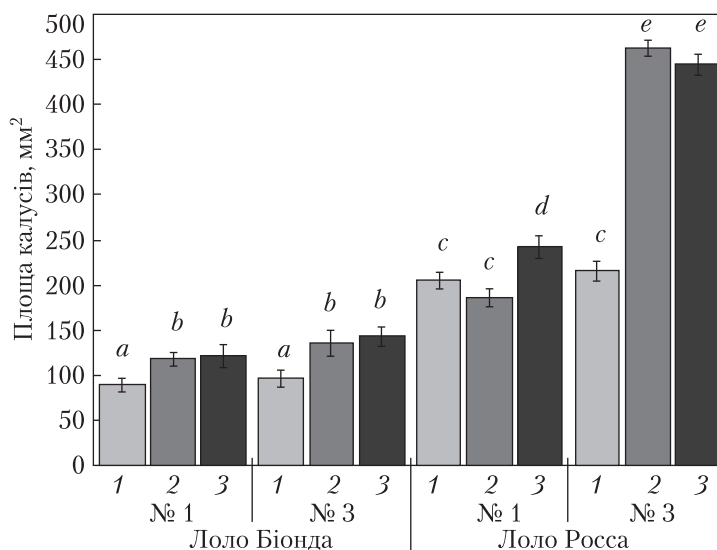


Рис. 1. Відсоток утворення первинних калусів *Lactuca sativa* на живильних середовищах (№ 1, № 2, № 3) з різним співвідношенням регуляторів росту; *a, b* – середні значення показника, позначені однаковими літерами свідчать про недостовірну різницю при $P < 0,05$ згідно з множинним ранговим критерієм Дункана

Рис. 2. Площа шеститижневих первинних калусів *Lactuca sativa* після стерилізації асептичних експлантів на живильних середовищах (№ 1 та № 3) з різним співвідношенням регуляторів росту: 1 – без стерилізації, 2 – $HgCl_2$, 3 – $NaOCl$; *a, b, c, d, e* – середні значення показника, позначені однаковими літерами, свідчать про недостовірну різницю при $P < 0,05$ згідно з множинним ранговим критерієм Дункана



На середовищі № 3 до калусоутворення перейшли всі висаджені експланти (рис. 1). Через низький відсоток калусогенезу і виживаності експлантів на середовищі № 2 для дослідження інших параметрів (площа калусів, оцінка структури та гетерогенності клітинного складу) використовували середовища № 1 та № 3.

Введення в культуру *in vitro* передбачає стерилізацію експлантів сім'ядольних листків, а використання різних стерилізуючих агентів може істотно впливати на калусоутворення [11]. Вплив стерилізуючих агентів на індукцію калусогенезу порівнювали через шість тижнів розвитку калусної тканини, вимірюючи площу первинних калусів. Аналіз отриманих даних показав, що у разі використання 0,1 %-го розчину хлориду ртуті та 1 %-го розчину гіпохлориту натрію як стерилізуючих агентів відбувається стимуляція калусоутворення (рис. 2). Площа калусів сорту Лоло Біонда на обох середовищах після використання стерилізуючих агентів збільшувалася на 30 % відносно контрольних зразків, а площа калусів сорту Лоло Роса на середовищі № 3 зростала більш ніж удвічі. Порівняння впливу 0,1 %-го розчину хлориду ртуті та 1 %-го розчину гіпохлориту натрію не виявило статистично значущої різниці між показниками площі первинних калусів, тому через меншу токсичність і

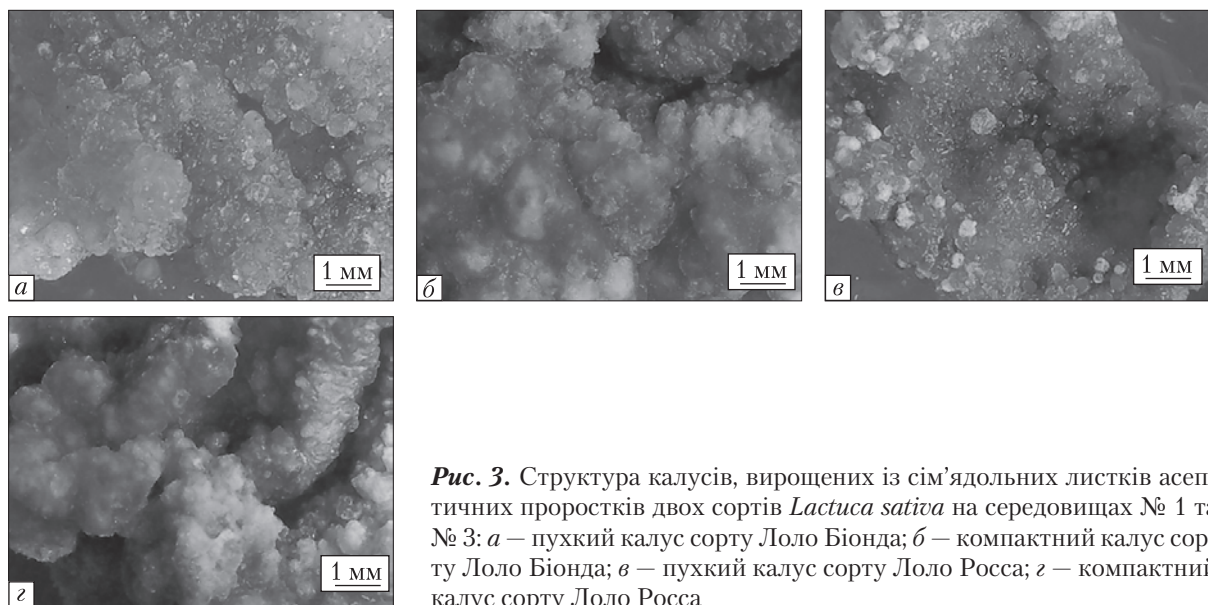


Рис. 3. Структура калусів, вирощених із сім'ядольних листків асептичних проростків двох сортів *Lactuca sativa* на середовищах № 1 та № 3: *а* – пухкий калус сорту Лоло Біонда; *б* – компактний калус сорту Лоло Біонда; *в* – пухкий калус сорту Лоло Росса; *z* – компактний калус сорту Лоло Росса

відсутність особливих заходів утилізації доцільніше використовувати гіпохлорит натрію для стерилізації експлантів сім'ядольних листків асептичних проростків *L. sativa* досліджуваних сортів.

Калусна тканина, як аморфна маса паренхімних клітин з тонкими клітинними стінками не має певної анатомічної структури. Колір маси калусної тканини може бути білим, жовтуватим, зеленим, бурим, червонуватим, пігментованим повністю або зонально присутністю хлорофілів та антоціанів. Залежно від складу живильного середовища та умов вирощування можливо отримати пухкий або компактний калус [12]. У структурі калусів, вирощених на живильних середовищах № 1 і № 3, виявлено відмінності як за кольором, так і за консистенцією (рис. 3). Калуси на середовищі № 3 мали зелене забарвлення, а вирощені на середовищі № 1 – жовтуваті. За консистенцією калуси з живильного середовища № 1 ідентифіковані як пухкі, а вирощені на середовищі № 3 – компактні. Консистенція калусів легко змінюється під дією ауксиноподібних регуляторів росту, що обумовлюють метаболічні та морфологічні зміни. Попередні дослідження показали, що додавання 2,4-Д спричиняє формування пухких калусів у *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota* та *Parthenocissus quinquefolia*, а вирощування на середовищі з додаванням НОК – компактних [12]. Наші дослідження підтверджують можливість регуляції отримання як пухкого, так і компактного калусів додаванням у середовище синтетичних ауксинів.

Відомо, що за умов вирощування рослин *in vitro* утворюються гетерогенні за клітинним складом калуси. Усі клітини рослинного організму тотипотентні, тому зміна умов вирощування і фази розвитку калусної тканини може призвести до вторинної диференціації та перетворення меристематичних клітин у паренхімні. Синтетичні процеси і, відповідно, характер вмісту паренхімних клітин також корелює з умовами вирощування [13]. На шостий тиждень розвитку калусів обох сортів на середовищах № 1 та № 3 нами було зафіксовано кількісне домінування паренхімних клітин та значний вміст трахеїдоподібних еле-

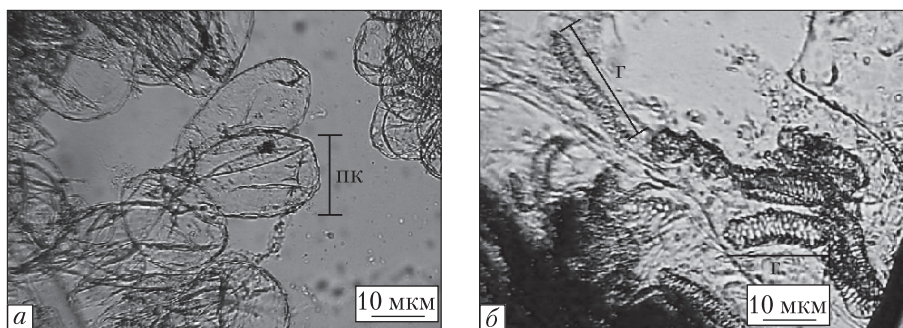


Рис. 4. Гетерогенність калусів, вирощених із сім'ядольних листків асептичних проростків двох сортів *Lactuca sativa*: а – паренхімні клітини (ПК), б – гідроцити, або трахеїдоподібні елементи (Г)

ментів – гідроцитних вузлів (рис. 4). Відсутність меристематичних клітин є ознакою переходу калусної культури в стаціонарну фазу калусогенезу, що вказує на припинення росту і старіння калусної тканини. Переважання вакуолізованих паренхімних клітин у калусній тканині сприяє синтезу та акумуляції вторинних метаболітів фенольної природи, оскільки паренхімні клітини мають добре розвинену вакуолярну систему, ядра займають пристінкове положення і майже не розрізняються. У молодих клітин вакуолі погано розвинуті, тому вакуолізація паренхімних клітин також є ознакою виходу на стаціонарну фазу калусогенезу [14]. Зафіксовані гідроцити, або трахеїдоподібні елементи, належать до широко розповсюджених водонесних елементів у калусних тканинах, що мають потовщені здерев'янілі клітинні стінки. Такі візерунчасті клітинні стінки складаються з мікрофібрил целюлози, геміцелюлози та просякнуті лігніном. Гідроцити сприяють прискоренню надходження води, ергопластичних речовин, регуляторів росту та формують повноцінну провідну систему у калусній тканині [15].

Отже, проведено порівняння впливу складу живильного середовища і поверхневої стерилізації експлантів сім'ядольних листків асептичних проростків на індукцію калусогенезу, ріст первинних калусів, їхню консистенцію та структуру. За результатами дослідження підібрані оптимальні умови для введення двох контрастних за вмістом антоціанових пігментів сортів салату в культуру *in vitro* з метою використання в біофортифікаційних дослідженнях і розробки біотехнологічних методів підвищення вмісту антоціанів, як потенційних нутрицевтиків з антиоксидантними властивостями та використання в галузі функціонального харчування.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. FAOSTAT. Lettuce and chicory crop production. Food and Agriculture Organization Statistical Division. 2014. URL: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/lettuce>
2. Cheng D.M., Pogrebnyak N., Kuhn P., Krueger C.G., Johnson W.D., Raskin I. Development and phytochemical characterization of high polyphenol red lettuce with anti-diabetic properties. *PLoS One*. 2014. **9**, e 91571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091571>
3. Armas I., Pogrebnyak N., Raskin I. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Methods*. 2017. **13**. P. 58. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0208-0>

4. Vanjildorj E., Bae T.-W., Riu K.-Z., Kim S.-Y., Lee H.-Y. Overexpression of Arabidopsis *ABF3* gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell, Tissue Organ. Cult.* 2005. **83**. P. 41–50. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-3800-3>
5. Xinrun Z., Conner A.J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. *J. Genet. Breed.* 1992. **46**. P. 287–290.
6. Ampomah-Dwamena C., Conner A.J., Fautrier A.G. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration *in vitro*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 1997. **71**. P. 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00098-8)
7. Kanamoto H., Yamashita A., Asao H., Okumura S., Takase H., Hattori M., Yokota A., Tomizawa K.-I. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res.* 2006. **15**. P. 205–217. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-3997-2>
8. Chang C.M., Penna S., Bhagwat S.G. Callus induction and plant regeneration from different *Triticum species*. *Asian Australas. J. Plant Sci. Biotechnol.* 2012. **6**, Sp. Iss. 1. P. 56–62.
9. Конотоп Є.О., Карпець Л.А., Зінченко А.В., Лопатько С.К., Коваленко М.С., Смірнов О.Є. Вплив цитратстабілізованих Су- і Мп-вмісних наноколоїдів на ріст та проліферативну активність апікальних меристем кореня *Allium cepa* L. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2019. № 1. С. 86–92. <https://doi.org/10.15407/dopovid2019.01.086>
10. Mohebodini 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**. P. 92–95.
11. Maina S.M., Emongor Q., Sharma K.K., Gichuki S., Gathaara M., de Villiers S.M. Surface sterilant effect on the regeneration efficiency from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties adapted to Eastern and Southern Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 2010. **9**, № 20. P. 2866–2871.
12. Тюкавин Б.Г. Основы биотехнологии моркови. Москва: ВНИИССОК, 2007. 480 с.
13. Chiavegatto R.B., Castro A.H.F., Marçal M.G., Pádua M.S., Alves E., Techio V.H. Cell viability, mitotic index and callus morphology of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae). *Trop. Plant Biol.* 2015. **8**, № 3–4. P. 87–97. <https://doi.org/10.1007/s12042-015-9150-3>
14. Ованесян Н. А., Мкртумян М. К., Есаян А. Г. Цитогенетическое описание калусной культуры *Nerium oleander*. *Биол. журн. Армении*. 2008. **60**, № 1–2. С. 130–134.
15. Tikhomirova L.I., Bazarnova N.G., Sinitsyna A.A. Histochemical study of xylem cells in *in vitro* culture of *Iris sibirica* L. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. **44**, № 7. P. 860–869. <https://doi.org/10.1134/S1068162018070129>

Надійшло до редакції 23.03.2020

REFERENCES

1. FAOSTAT. Lettuce and chicory crop production. Food and Agriculture Organization Statistical Division (2014). Retrieved from <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/search/lettuce>
2. Cheng, D. M., Pogrebnyak, N., Kuhn, P., Krueger, C. G., Johnson, W. D. & Raskin, I. (2014). Development and phytochemical characterization of high polyphenol red lettuce with anti-diabetic properties. *PLoS One*, 9, e 91571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091571>
3. Armas, I., Pogrebnyak, N. & Raskin, I. (2017). A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Methods*, 13, pp. 58. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0208-0>
4. Vanjildorj, E., Bae, T.-W., Riu, K.-Z., Kim, S.-Y. & Lee, H.-Y. (2005). Overexpression of Arabidopsis *ABF3* gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell, Tissue Organ. Cult.*, 83, pp. 41-50. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-3800-3>
5. Xinrun, Z. & Conner, A. J. (1992). Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons. *J. Genet. Breed.*, 46, pp. 287-290.
6. Ampomah-Dwamena, C., Conner, A. J. & Fautrier, A. G. (1997). Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration *in vitro*. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, 71, pp. 137-145. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(97\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00098-8)
7. Kanamoto, H., Yamashita, A., Asao, H., Okumura, S., Takase, H., Hattori, M., Yokota, A. & Tomizawa, K.-I. (2006). Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res.*, 15, pp. 205-217. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-3997-2>

8. Chang, C. M., Penna, S. & Bhagwat, S. G. (2012). Callus induction and plant regeneration from different *Triticum species*. Asian Australas. J. Plant Sci. Biotechnol., 6, Sp. Iss. 1, pp. 56-62.
9. Konotop, Y. O., Karpets, L. A., Zinchenko, A. V., Lopatko, S. K., Kovalenko, M. S. & Smirnov, O. E. (2019). Influence of citrate-stabilized Cu- and Mn-nanocolloids on the growth and proliferative activity of *Allium cepa* L. apical meristems. Dopov. Nac. akad. nauk Ukr., No. 1, pp. 86-92 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.086>
10. Mohebodini, M., Javaran, M. J., Mahboudi, F. & Alizadeh, H. (2011). Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Aust. J. Crop Sci., 5, pp. 92-95.
11. Maina, S. M., Emongor Q., Sharma K. K., Gichuki S., Gathaara M. & de Villiers S. M. (2010). Surface sterilant effect on the regeneration efficiency from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varieties adapted to Eastern and Southern Africa. Afr. J. Biotechnol., 9, No. 20, pp. 2866-2871.
12. Tyukavin, G. B. (2007). Carrot biotechnology. Moscow: VNISSOK (in Russian).
13. Chiavegatto, R. B., Castro, A. H. F., Marçal, M. G., Pádua, M. S., Alves, E. & Techio, V. H. (2015). Cell viability, mitotic index and callus morphology of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae). Trop. Plant Biol., 8, No. 3-4, pp. 87-97. <https://doi.org/10.1007/s12042-015-9150-3>
14. Hovhannisyan, N. A., Mkrtumyan, M. K. & Yesayan, A. G. (2008). Cytogenetic description of *Nerium oleander* callus culture. Biol. J. Armenia, 60, No. 1-2, pp. 130-134 (in Russian).
15. Tikhomirova, L. I., Bazarnova, N. G. & Sinitsyna, A. A. (2018). Histochemical study of xylem cells in *in vitro* culture of *Iris sibirica* L. Russ. J. Bioorg. Chem., 44, No. 7, pp. 860-869. <https://doi.org/10.1134/S1068162018070129>

Received 23.03.2020

Yu. V. Pryimak¹, O. E. Smirnov¹,
N. Yu. Taran¹, V. V. Schwartzau²

¹ Institute of Biology and Medicine of Taras Shevchenko National University of Kyiv

² Institute of Plant Physiology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: plantaphys@gmail.com

CALLUSOGENESIS FEATURES OF ANTHOCYANIN CONTRASTING VARIETIES OF *LACTUCA SATIVA* L.

The selection of conditions for the callusogenesis introduction of two anthocyanin contrasting varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) – Lolo Bionda (green) and Lolo Rossa (red) was approved. The effect of phytohormonal ratio, treatment with sterilizing agents on the induction of callusogenesis, calli area, consistency and structure of the six-week primary calli of both varieties were compared. Using media with a ratio of growth regulators: 6-benzylaminopurine (BAP) – 0.3 mg/L, naphthylacetic acid (NAA) – 2 mg/L, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) – 0.2 mg/L, and BAP – 10 mg/L, NAA – 0.5 mg/L led to callusogenesis stimulation from the cotyledon leaves explants of both varieties aseptic seedlings. A significant growth stimulation of primary Lolo Rossa calluses under sterilization of explants with mercury chloride and sodium hypochlorite was found. The heterogeneity of the cellular content of calls tissue and the possibility of obtaining loose and compact calluses of both varieties were investigated.

Keywords: callusogenesis, primary callus, *Lactuca sativa* L., Lolo Bionda, Lolo Rossa.