

УДК 635.5:573.6
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-2-22-26>

Романова О.Б., Солдатенко А.В.,
 Чичварина О.А., Ахраменко В.А.,
 Павлова О.В., Романов В.С.

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

Ключевые слова: салат, *Lactuca sativa* L., вирус аспермии томата (*Tomato aspermy cucumovirus*) – AsTV (*Cucumovirus, Bromoviridae*) термотерапия, стерилизация семян, биотехнология, безвирусные растения.

Конфликт интересов: заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: 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 L. Овощи России. – 2019;(2):22-26. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-2-22-26>.

Поступила в редакцию: 15.02.2019
Опубликована: 30.03.2019

Romanova O.B., Soldatenko A.V.,
 Chichvarina O.A., Akhramenko V.A.,
 Pavlova O.V., Romanov V.S.

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

Keywords: lettuce, *Lactuca sativa* L., tomato aspermy virus (*Tomato aspermy cucumovirus*) – AsTV (*Cucumovirus, Bromoviridae*), thermotherapy, sterilization of seeds, biotechnology, virus-free plants.

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

For citation: Romanova O.B., Soldatenko A.V., Chichvarina O.A., Akhramenko V.A., Pavlova O.V., Romanov V.S. BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF PLANT IMPROVEMENT AND BREEDING OF VIRUS-FREE PLANTING MATERIAL OF *LACTUCA SATIVA* L. Vegetable crops of Russia. 2019;(2):22-26. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-2-22-26>.

Received: 15.02.2019
Accepted: 30.03.2019

РАЗРАБОТКА ЭЛЕМЕНТОВ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА САЛАТА (*LACTUCA SATIVA* L.) НА БЕЗВИРУСНОЙ ОСНОВЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ



В статье представлены результаты исследований по получению в культуре *in vitro* растений-регенерантов из семян сортов салата (*Lactuca sativa* L.) Изумрудный, Букет, Хамелеон (селекции ФГБНУ ФНЦО), восприимчивых к вирусу аспермии томата (*Tomato aspermy cucumovirus*) – AsTV. Семена сильновосприимчивых к AsTV сортов салата Хамелеон и Букет были подвергнуты термотерапии при разных температурных режимах (37°C, 38°C, 40°C) в течение различного временного интервала (1, 3, 5, 7, 10 суток) в сухом виде и при увлажнении. Отмечена сортовая специфичность при прорастании семян после термотерапии. Так, наибольшее количество проростков у сорта Изумрудный получено после 5 суток термотерапии (10,0±0), тогда как у сорта Букет лучшие показатели были после 3 суток термотерапии (9,3±1,2) при увлажнении. После термотерапии сухих семян при 40°C сорта Изумрудный растительный материал был высажен на твердые и жидкие питательные среды. Подобраны условия ступенчатой стерилизации семян салата для введения в культуру *in vitro*: промывание в 96% этаноле, затем в 50% водном растворе «Белизны» с добавлением Твина-20, после в стерильной дистиллированной воде. Использована питательная среда для прорастивания семян салата: Gamborg B5 (2% сахароза, 7,0 г/л агара), жидкая питательная среда была того состава. Полученные проростки черенковали и переносили на среду MS (2% сахароза, 0,1 мг/л ГК и 1 мг/л БАП, 3,0 г/л фитогеля). Образовавшиеся побеги для укоренения были перенесены на среду MS (2% сахароза, 3,0 г/л фитогеля). В дальнейшем будет проведена адаптация растений салата в условиях *in vivo* и тестирование на наличие вируса аспермии томата в посадочном материале.

DEVELOPMENT OF ELEMENTS OF TECHNOLOGY FOR PLANTING MATERIAL OF LETTUCE (*LACTUCA SATIVA* L.) ON VIRUS-FREE BASIS USING METHODS OF BIOTECHNOLOGY

The article presents the results of research on the production *in vitro* of regenerated plants from the seeds of cultivars of lettuce (*Lactuca sativa* L.) Emerald, Bouquet, Chameleon (FSBSI Federal Scientific Vegetable Center), susceptible of aspermy tomato (*Tomato aspermy cucumovirus*) – AsTV. Seeds of strongly susceptible to AsTV varieties of salad Chameleon and Bouquet were subjected to thermotherapy at different temperatures (37°C, 38°C, 40°C) for a different time interval (1, 3, 5, 7, 10 days) in dry form and when moistened. Marked varietal specificity during germination of seeds after thermotherapy. Thus, the greatest number of seedlings in the emerald variety was obtained after 5 days of thermotherapy (10.0±0), while the Bouquet variety had the best results after 3 days of thermotherapy (9.3±1.2) with moisture. After the thermotherapy of dry seeds by 40°C plant material of cultivar Emerald was planted on solid and liquid culture media. The conditions of step sterilization of lettuce seeds for introduction into the culture *in vitro* were chosen: washing in 96% ethanol, then in 50% aqueous solution of "Whiteness" with the addition of Twin-20, after in sterile distilled water. The nutrient medium for germination of lettuce seeds was used: Gamborg B5 (2% sucrose, 7.0 g/l agar), and the liquid nutrient medium was of that composition. The obtained seedlings were cutted and transferred to medium MS (2% sucrose, 0.1 mg/l ha and 1 mg/l BAP, 3.0 g/l phytogel). The formed shoots for rooting were transferred to the MS medium (2% sucrose, 3.0 g/l phytogel). In the future, lettuce plants will be adapted *in vivo* and tested for the presence of tomato aspermy virus in the planting material.

Салат (*Lactuca sativa* L.) является листовым овощем, принадлежащим к семейству *Asteraceae*. Эта культура выращивается повсеместно. Потребляют салат исключительно в свежем виде. Имеет диетическую ценность, так как на 95% состоит из воды.

Одним из факторов, лимитирующих размножение и возделывание салата, являются инфекционные болезни вирусной природы. На данный момент известно порядка 15 наиболее вредоносных вирусопатогенов, наносящих экономический ущерб культуре. В последние годы нарастает вредоносность вируса аспермии томата (*Tomato aspermy cucumovirus* – *AsTV*) (*Cucumovirus*, *Bromoviridae*), вызывающего чрезмерную кустистость растений, угнетение главного стебля, слабое развитие пазушных и боковых побегов. Листья деформируются, приобретают мозаичную расцветку и мельчают. Семена имеют аномалии развития или вообще отсутствуют. Этому способствует возделывание сортов со слабой устойчивостью к вирусам, а также климатические условия Центрального региона РФ, когда наблюдается большой перепад дневных и ночных температур и высокая влажность. В отдельные годы обилие насекомых-переносчиков создают высокий инфекционный фон (Енгальчева и др., 2015; Енгальчева, Павлова, 2016).

Вирус аспермии томата (*Cucumovirus*, *Bromoviridae*) имеет широкий круг-хозяев, относящихся к различным семействам. Штаммы *AsTV* передаются векторно несколькими видами тлей непersistентным способом; по горизонтали распространение также возможно механическим путем, прививкой. По вертикали передача семенами возможна для *Stellaria media* и *Phaseolus vulgaris* (Noordam et al., 1965; Wang, 1982).

Вирусы быстро накапливаются и распространяются в растениях. Они поражают надземную часть и сохраняются в семенах. Репродукция вирусов тесно связана с метаболизмом клетки растения-хозяина (Бойко, 1990; Журавлёв, 1979), и это основное препятствие для прямого подавления жизнедеятельности вирусов растений (Митрофанова и др., 2014).

С точки зрения биологии вирусов, передача их семенами служит самым надёжным резервом, поддерживающим сохранение вируса в природе. Кроме того, при передаче вируса семенами создаются очаги инфекции при посеве и посадке растений в полевых условиях. Особенно это касается вирусов, являющихся общими для овощных культур (Гнутова, 2009).

При решении этой проблемы исследователи высказываются за интегрированный подход, используя современные достижения биотехнологии и вирусологии (Кеглер и др., 1986). Освобождение растений от вирусов представляет собой единый процесс: тестирование растений на вирусы, термотерапия, стерилизация семян, регенерация растений из семян *in vitro*, культивирование регенерантов *in vivo*, повторное тестирование адаптированных растений на вирусы (рис. 1).

Для оздоровления растений используют термотерапию. Она подразделяется на два способа: применение горячей воды и применение горячего сухого воздуха. Второй способ оказался более эффективным, особенно при использовании вегетирующих цветочных растений (Митрофанова и др., 2014).

Высокие температуры вызывают физическое разрушение термоллабильных вирусов, а также нарушают равновесие



Рис. 1. Получение безвирусных растений салата.
Fig. 1. Preparation of virus-free lettuce plants.

между синтезом и деградацией вирусов. При термотерапии иногда удается вылечить растение целиком (Hollings, Kassanis, 1957). Однако чаще от вирусов освобождаются только верхушки побегов, отросшие за время термотерапии. Исследования показали, что чем дольше экспозиция термотерапии и больший прирост растений, тем выше гарантия получения безвирусных верхушек (Митрофанова, 1986). Этот прием используют в сочетании с культурой меристемы для получения безвирусного посадочного материала плодовых и цветочно-декоративных культур (Тесленко и др., 1986). Об использовании термотерапии растений хризантем, инфицированных вирусом аспермии томата, сообщали ряд исследователей (Hollings, Kassani, 1957; Brierley, Lorentz, 1960). Также оздоровленные растения хризантем получали при помощи культуры меристем (Bachelier et al., 1976)

Основным методом получения и клонального микроразмножения безвирусных растений является культура органов и тканей (Бутенко, 1964, 1999; Катаева, Бутенко, 1983; Калинин и др., 1992; Митрофанова и др., 2000; Torrence, Jones, 1981; *Biotechnology of Ornamental Plants*, 1997; George et al., 2008). Первыми успешно регенерировали растения салата из каллуса Дершуг и Миллер (1967). Растения салата также успешно регенерировали из апикальных сегментов и семян (Koevary et al., 1978; Bloksberg, Saltveit, 1986; Pink, Carter, 1987; Armas et al., 2017).

Для поверхностной стерилизации исходных растительных образцов использовали погружение в растворы хлора и неоднократное промывание в стерильной дистиллированной воде (Berry et al., 1982; Brown et al., 1986). Иногда применяли предварительную стерилизацию, включающую промывку в воде с Tween 80 (Bloksberg, Saltveit, 1986) и погружение в 40% этанол на несколько секунд (Alconero, 1983).

Большинство исследователей использовали среду Мурасиге-Скуга (1962) (МС). Однако, для культуры *in vitro* применяли и другие среды (Alconero, 1983; Pink, 1992). Рост побегов происходил на среде, содержащий ИУК и БАП (Bloksberg, Saltveit, 1986).

Армас с сотрудниками (2017) использовали среды МС и ШХ (Schenk, Hildebrandt, 1972) с разным содержанием сахаразы, БАП, кинетина, зеатина, ИУК, ИМК, ТДЗ. Они подтвер-

дили, что замена МС среды на ШХ среду не влияет на индуцирование регенерации, как и сообщалось ранее (Teng et al., 1992; Xinrun, Conner, 1992; Ampomah-Dwamena, 1997). Не было различий в регенерации в средах, содержащих глюкозу и сахарозу, хотя Тенг и Коннер (1992) получили лучшие результаты на средах с сахарозой. Замена БАП на кинетин или ТДЗ не вызывала значительных изменений. Изучение влияния БАП на индукцию каллуса, среднее количество регенерированных побегов на листовой эксплант показало, что при низких концентрациях БАП каллусообразование было незначительным, а регенерация побегов увеличивалась (Mohebodini, 2011; Latif et al. 2014).

Методы *in vitro* позволяют сохранить отобранные генотипы салата, выращивая семена на средах, свободных от болезней (Jenni et al., 2006). Также были разработаны методы оценки LMV (*Lettuce Mosaic Virus*) на регенерируемых растениях (Mazier et al., 1999; Koyama, 2012).

В ФГБНУ ФНЦО в лаборатории биотехнологии исследования по клональному микроразмножению и получению безвирусного посадочного материала овощных культур ведутся достаточно давно (Domblides et al., 2017), но для культур, относящихся к семейству Asteraceae, они носили лишь поисковый характер, и действующих протоколов еще не разработано.

Объекты и методы исследования

В нашей работе ранее были исследованы линии и сорта разновидностей салата, дикие виды (*L. serriola*, *L. salligna*, *L. virosa*, *L. livida*, *L. scariola*), гибриды разных поколений (F₁, F₂, F₃, F₄). Идентификацию вируса AsTV проводили методами визуальной, серологической диагностики (иммуноферментный анализ), методом растений-индикаторов, «экспресс-методом» с использованием иммунострипов, методом электронной микроскопии. Оценку результатов иммуноферментного анализа (ИФА) проводили с помощью спектрофотометра при длине волны 480 нм, определяя относительную концентрацию вирусных частиц в пробах по коэффициентам экстинкции. В течение всего вегетационного периода проводили визуальную оценку по шестибальной шкале. Устойчивость образцов оценивали на основе комплекса показателей: распространенность (%), индекс поражения (средний балл), степень развития болезни (%) (Методические рекомендации по оценке и созданию исходного материала перца сладкого с устойчивостью к вирусу бронзовости томата, 2007). По совокупности всех оценок и ИФА образцы дифференцировали на четыре группы устойчивости.

Целью настоящей работы является разработка методики получения и клонального микроразмножения безвирусного материала культур вида *Lactuca sativa* L. Объектами исследования служили сорта салата селекции ФГБНУ ФНЦО: Букет, Изумрудный, Хамелеон.

Термотерапию семян проводили при температуре 37°C, 38°C и 40°C в течение разного временного интервала (1, 3, 5, 7, 10 суток) в сухом виде и при увлажнении. В опытах использовали по 10 семян каждого сорта в 3-х вариантах. Контроль – семена без прогревания.

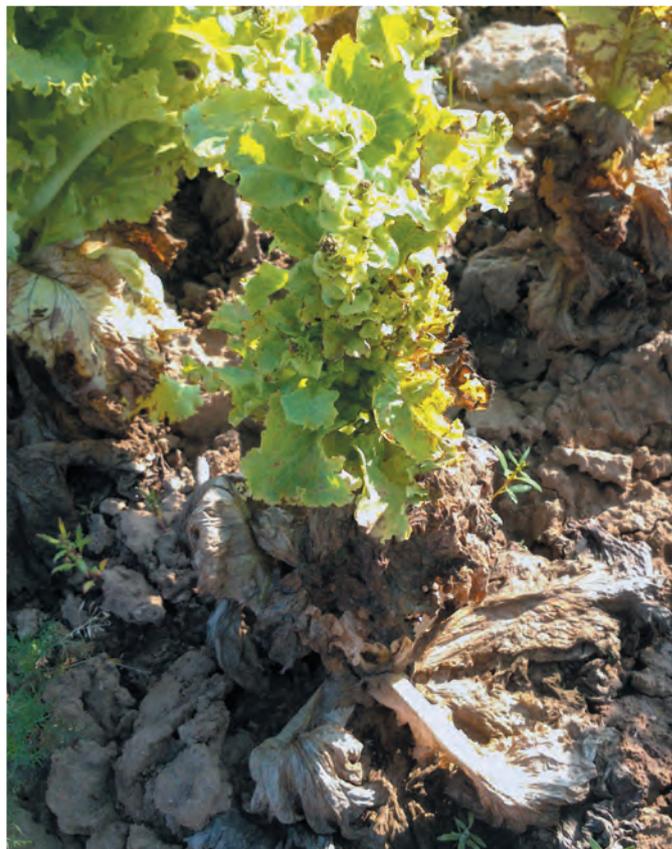


Рис. 2. Поражение растения салата вирусом аспермии томата.
Fig. 2. The defeat of the salad with the virus of tomato aspermy.

Семена для культуры *in vitro* стерилизовали 30 с в 96% этаноле, затем ещё течение 5 мин в 50% водном растворе «Белизны» с добавлением Твина-20 (1 капля на 100 мл). После трехкратно промывали в стерильной дистиллированной воде.

Семена салата помещали в чашки Петри на среду Gamborg B5 (Gamborg, 1968), содержащей 2% сахарозу и 7,0 г/л агары, и на мостики из фильтровальной бумаги в пробирки с жидкой питательной средой того же состава. Полученные проростки черенковали и переносили на среду МС с 2% сахарозой, 0,1 мг/л ГК и 1 мг/л БАП и 3,0 г/л фитогеля. Образовавшиеся побеги для укоренения были перенесены на среду МС с 2% сахарозой и 3,0 г/л фитогеля. Культивирование проводили на стеллажах с люминесцентными лампами при 25°C и фотопериоде 14 часов, освещенности 2,5 тыс. люкс.

Результаты

Вирус аспермии томата (*Tomato aspermy cucumovirus* - AsTV) в условиях Московской области на растениях салата вызывал симптомы осветления жилок на пластинах листьев, образование укороченной розетки, зональной крапчатости (рис. 2). При электронной микроскопии в препаратах, изготовленных из сока инфицированных растений салата с симптомами угнетенного роста, были обнаружены изометрические вирионы размером 40 нм. По массовому проявлению симптоматики в период «бутонизация – начало цветения» образцы разделили на четыре группы устойчивости к *Tomato aspermy cucumovirus*: толерантные, слабо-, средне- и сильновосприимчивые.

У сортов салата Хамелеон, Букет балл поражения был достаточно высоким и составил 2,50-2,65. По результатам ИФА в данных образцах содержание вируса в соке было средним (коэффициент экстинкции составил 0,232 и 0,314)

(Енгальчева, Павлова, 2016). Семена, полученные от этих наиболее восприимчивых к вирусу *AsTV* растений, были использованы для дальнейших исследований.

Проведение термотерапии семян сортов, восприимчивых к вирусу *AsTV* растений, является важнейшим этапом получения оздоровленных растений. Прогревание семян при точке термической инактивации (ТТИ) вируса позволяет существенно снизить вирусное заражение и в дальнейшем использовать семена, подвергнутые термотерапии, для получения безвирусных растений салата. Исходя из ранее проведенных исследований на хризантемах, ТТИ-температура вируса аспермии томата составила 36°-37°C (Hollings, Kassani, 1957; Brierley, Lorentz, 1960; Johnstone, Wade, 1974).

Термотерапия семян салата выявила сортовую специфичность. Так, наибольшее количество проростков у сорта Изумрудный было получено после 5 суток термотерапии ($10,0 \pm 0$; $HCP_{05}=0$), тогда как у сорта Букет лучшие показатели были после 3 суток термотерапии ($9,3 \pm 1,2$; $HCP_{05}=0,3$) при увлажнении (рис. 3).

В результате проведенных исследований условия термотерапии и подобранные среды позволили получить растения-регенеранты из семян салата (рис. 4). В дальнейшем будет проведена адаптация растений салата в условиях *in vivo* и тестирование на наличие вируса аспермии томата *AsTV* для подтверждения получения безвирусного посадочного материала.

Решение поставленной задачи имеет важные экономические последствия, так как семенная передача вирусов способствует сохранению инфекции в семени длительное время и распространению на большие расстояния. Правила международной торговли также требуют получение специальных сертификатов для посадочного материала, подтверждающих отсутствие вирусов.

Разработка биотехнологических методов получения безвирусного материала салата обеспечит рост качества посадочного материала, что, в свою очередь, будет в большем объеме удовлетворять потребности рынка независимо от времени года.



Рис.3. Прорастание семян при термотерапии. А – сорт Изумрудный, Б – сорт Букет.
Fig. 3. Germination of seeds during thermotherapy. А - cultivar Emerald, Б - cultivar Bouquet.

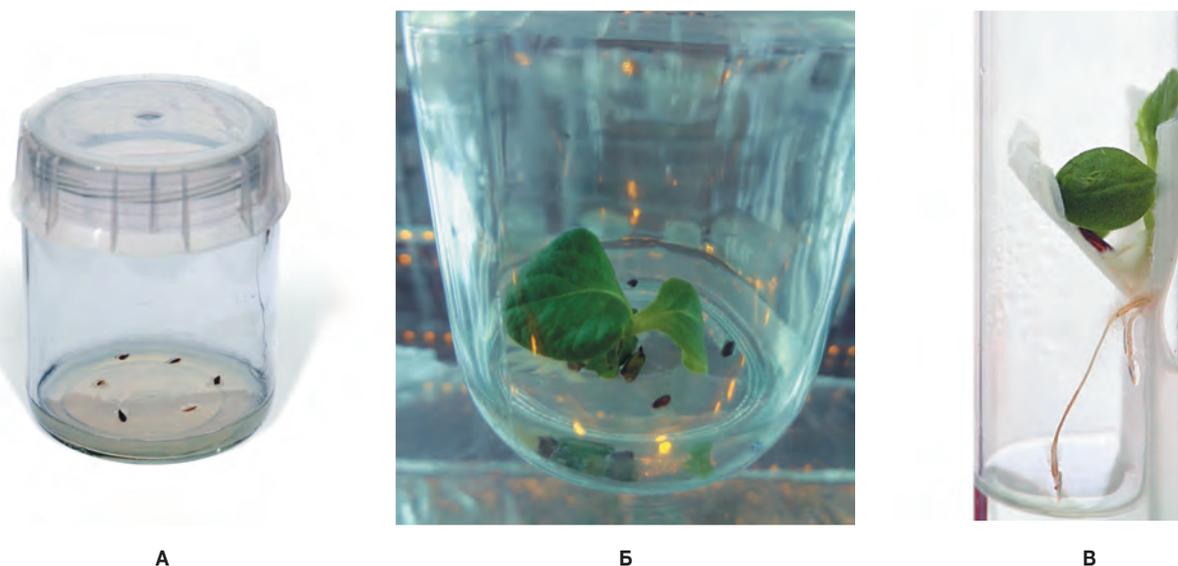


Рис. 4. Прорастание семян салата на твердых (А и Б) и жидких питательных средах (В).
Fig. 4. Germination of lettuce seeds on solid (A and B) and liquid nutrient media (B).

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/0000-0001-5817-0860>
Чичварина О.А. – м.н.с.
Ахраменко В.А. – кандидат техн. наук, н.с.
Павлова О.В. – м.н.с.
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/0000-0001-5817-0860>
Chichvarina O.A. – junior researcher
Akhramenko V.A. – Candidate of Technical Sciences, Researcher
Pavlova O.V. – junior researcher
Romanov V.S. – Candidate of Agricultural Sciences, Senior Researcher

Литература

1. Енгальчева И.А., Пышная О.Н., Джос Е.А., Тимина Л.Т., Золотарева О.И. Использование межвидовой гибридизации в селекции перца и салата на устойчивость к вирусной инфекции // *Rus. Agr. Sci. Rev.* – 2015. – Т.6. – №6-2. – С.2-4.
2. Енгальчева И.А., Павлова О.В. Межвидовая гибридизация салата (*Lactuca sativa* L.) селекции на устойчивость к *Tomato aspermy cucumovirus* // *Mat. междунар. конф. "Эколого-генетические основы современных агротехнологий"* (СПб, 27–29 апреля 2016 г.) // *Вест. зоол. раст.* – 2016. – 3(89). – С.68-70.
3. Noordam D., Bijl M., Overbeek S.C., Quiniones S.S. Viruses uit *Campanula rapunculoides* en *Stellaria media* en hun relatie tot komkommervozaiekvirus en tomaat-'aspermy'-virus // *Neth. J. Pl. Path.* – V.71. – P.61.
4. Wang W.J. *Tech Bull Plant Quarantine Res. Inst. Pl. Quarantine. Dong San Huan Beijing.* – 1982. – №3.
5. Boyko A.L. Экология вирусов растений. К.: Вища школа. – 1990. – 166 с.
6. Журавлев Ю.Н. Фитовирусы в целом растении и в модельных системах. – М.: Наука, 1979. – 246 с.
7. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // *Сб. научн. тр. ГНБС.* – 2014. – Т.138. – С.5-56.
8. Гнугтова Р.В. Таксономия вирусов растений Дальнего Востока. – Владивосток: Дальнаука, 2009. – 467 с.
9. Кеглер Х., Клейнхемпель Х., Эртель К., Презелер Г., Шимански Х.-Х., Шмидт Х., Шпаар Д., Вердеревский Т.Д. Борьба с вирусными болезнями растений / Пер. с нем. Г.И. Лойдиной; Под ред. и с предисл. И.Г. Атабекова и В.А. Шмыгли. – М.: Агропромиздат, 1986. – 480 с.
10. Hollings M., Kassanis B. The curl of chrysanthemums from some virus diseases by heat // *J. Roy. Hort. Soc.* – 1957. – V.82. – №8. – P.339-342.
11. Митрофанова О.В. Разработка биотехнологии ускоренного размножения в стерильной культуре цветочных растений на безвирусной основе // *Всесоюз. конф. ВАСХНИЛ: Тез. Докл.* – Л., 1986. – С.101-104.
12. Тесленко А.В., Митрофанова О.В., Лукичева Л.А. Разработка технологии получения безвирусного материала перца // *Сб. науч. тр. Никит. ботан. сада.* – 1986. – Т.99. – С.85-92.
13. Brierley P., Lorentz P. Healthy tip cutting from some mosaic-diseased Asiatic chrysanthemums: some benefits and other effects of heat treatment // *Phytopathology.* – 1960. – V.50. – №6. – P.404-408.
14. Bacheelier J.C., Monsion M., Dunez J. Possibilities of improving detection of chrysanthemum stunt and obtaining viroid-free plants by meristem-tip culture // *Acta Hort.* – 1976. – №59. – P.63-69.
15. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
16. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: Учеб. пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
17. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 232 с.
18. Калинин Ф.И., Кушир Г.П., Сарцацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
19. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 45 с.
20. Torrence L., Jones R.A.C. Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses // *Plant Pathology.* – 1981. – V.30. – P.1-24. DOI:10.1111/j.1365-3059.1981.tb01218.x
21. *Biotechnology of Ornamental Plants* / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – 412 p.
22. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. *Plant Propagation by Tissue Culture.* 3rd Edition. – Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. – 501 p.
23. Doerschug M.R., Miller C.O. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants // *Am. J. Bot.* – 1967. – №54. – P.410-413.
24. Koevary K., Rappaport L., Morris L.L. Tissue culture propagation of Head lettuce // *Hortic. Sci.* – 1978. – №13. – P.39-41.
25. Bloksberg L.N., Saltveit M.E. Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown iceberg lettuce // *Hortic. Sci.* – 1986. – №21. – P.1201-1203.
26. Pink D.A.C., Carter P.J. Propagation of lettuce (*Lactuca sativa*) breeding material by tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* – 1987. – P.611-616.
27. Armas I., Pogrebnyak N., Raskin I. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Plant Methods.* – 2017. – V.13. – Is.1. – P.1-9. DOI: 10.1186/s13007-017-0208-0
28. Berry S.F., Lu D.Y., Pental D., Cocking E.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Lactuca sativa* L. Z Pflanzenphysiol. – 1982. – №108. – P.31-38. DOI:10.1016/S0044-328X(82)80088-3
29. Brown C., Lucas J.A., Crute I.R., Walkley D.G.A., Power J.B. An assessment of genetic variability in some commercial lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) and their offspring // *Ann. Appl. Biol.* – 1986. – №109. – P.391-407.
30. Alconero R. Regeneration of plants from cell suspensions of *Lactuca saligna*, *Lactuca sativa* and *Lactuca serriola* // *Hortic. Sci.* – 1983. – №18. – P.305-307.
31. Murashige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – №15. – P.473-497.
32. Pink D.A.C. Micropropagation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III* (ed. by Y.P.S. Bajaj) – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, – 1992. – P.42-57.
33. Schenk R.V., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Canad. J. Bot.* – 1972. – №50. – P.199-204. DOI:10.1139/b72-026
34. Teng W.L., Liu Y.J., Soong T.S. Rapid regeneration of lettuce from suspension culture // *Hortic. Sci.* – 1992. – №27. – P.1030-1032.
35. Xinrun Z., Conner A.J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons // *J. Genet. Breed.* – 1992. – №46. – P.287-90.
36. Ampomah-Dwamena C., Conner A.J., Fautrier A.G. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration *in vitro* // *Sci. Hort. (Amsterdam)* – 1997. – №71. – P.137-145.
37. Mohebodin M., Javarani 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.
38. Latif B., Javarani 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. – V.5. – №1. – P.315-322.
39. Jenni S., Loukil F., Moghaddam B. E. *In vitro* culture response of apical and axillary shoot-tips excised from crisphead lettuce cores depends on head maturity not storage time // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2006. – V.42. – №3. – P.274-277.
40. Mazier M., Maisonneuve B., Bellec Y., Chupeau M.C., Souche S. and Chupeau Y. Interest of protoplasts for lettuce breeding // *Eucarpia Leafy Vegetables 99*, A. Lebeda, Kristkova, ed., *Proceeding of the Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding*, Olomouc, the Czech Republic, 8-11 June, 1999. Palacky University Olomouc, Olomouc, 1999. – P.239-244.
41. Dombildes E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Vjurtts T.S., Kozar E.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Dombildes A.S., Pivovarov V.F., Soldatenko A.V. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops. *Agrosym 2017. Book of proceedings.* – 2017. – P.452-460. DOI: 10.18619/2072-9146-2018-6-3-7
42. Koyama R., Sanada M., Itoh H., Kanechi M., Inagaki N., Uno Y. *In vitro* evaluation of tipburn resistance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2012. – №108. – P.221-227. DOI:10.1007/s11240-011-0033-5
43. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell. Res.* – 1968. – №50. – P.151-158.
44. Методические рекомендации по оценке и созданию исходного материала перца сладкого с устойчивостью к вирусу бронзовости томата / В.Ф. Пивоваров, О.Н. Пышная, М.И. Мамедов, И.Т. Балашова, Л.К. Гуркина, Е.Г. Козарь, И.А. Енгальчева. – М., 2007. – 18 с.
45. Johnstone G.R., Wade G.C. Therapy of virus-infected plants by heat treatment I. Some properties of tomato aspermy virus and its inactivation at 36°C // *Austral. J. Bot.* – 1974. – V.22. – №3. – P.437-450. DOI:10.1071/BT9740437

References

1. Engalycheva I.A., Pishnaya O.N., Dzhos E.A., Timina L.T., Zolotareva O.I. The use of interspecific hybridization in the selection of pepper and lettuce for resistance to viral infection // *Rus. Agr. Sci. Rev.* – 2015. – V.6. – №6-2. – P.2-4.
2. Engalycheva I.A., Pavlova O.V. Interspecific hybridization of lettuce (*Lactuca sativa* L.) breeding for resistance to *Tomato aspermy cucumovirus* // *Mat. international Conf.* "Ecological and genetic bases of modern agricultural technologies" (St. Petersburg, April 27-29, 2016) // *Bull. plant prot.* – 2016. – №3(89). – P.68-70.
3. Noordam D., Bijl M., Overbeek S.C., Quiniones S.S. Viruses uit *Campanula rapunculoides* en *Stellaria media* en hun relatie tot komkommervozaiekvirus en tomaat-'aspermy'-virus // *Neth. J. Pl. Path.* – V.71. – P.61.
4. Wang W.J. *Tech Bull Plant Quarantine Res. Inst. Pl. Quarantine. Dong San Huan Beijing.* – 1982. – №3.
5. Boyko A.L. Ecology of plant viruses. – K.: Vischa school. – 1990. – 166 p.
6. Zhuravlev Y.N. Phytoviruses in the whole plant and in model systems. – M.: Science, 1979. – 246 p.
7. Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sidorenko N.P., Ivanova N.N. The application of biotechnological methods in plant improvement and propagation of disease-free planting material of promising ornamental crops // *Proc. scient. tr. GNBS.* – 2014. – V.138. – P.5-56.
8. Gnugtova R.V. Taxonomy of plant viruses in the Far East. – Vladivostok: Dalnauka, 2009. – 467 p.
9. Kegel H., Kleinhepffel H., Gang, K., Presler G., Szymanski, H.-H., Schmidt H., Spaar D., Verderevsky T.D. Control of viral diseases of plants / *Translat for German*. G. I. Loginii; ed. and with foreword. I.G. Atabekov and A.V. Shmygli. – M.: Agropromizdat, 1986. – 480 p.
10. Hollings M., Kassanis B. The curl of chrysanthemums from some virus diseases by heat // *J. Roy. Hort. Soc.* – 1957. – V.82. – №8. – P.339-342.
11. Mitrofanova O.V. Development of biotechnology of the accelerated reproduction in the sterile culture of flower plants on virus-free basis // *Proceedings of All-Union. Conf. Agricultural Sciences: theses of reports.* – L., 1986. – P.101-104.
12. Teslenko A.B., Mitrofanova O.V., Lukicheva L.A. Development of technology for production of virus-free peach material // *Coll. sci. works of Nikitsky Botanical garden.* – 1986. – V.99. – P.85-92.
13. Brierley P., Lorentz P. Healthy tip cutting from some mosaic-diseased Asiatic chrysanthemums: some benefits and other effects of heat treatment // *Phytopathology.* – 1960. – V.50. – №6. – P.404-408.
14. Bacheelier J.C., Monsion M., Dunez J. Possibilities of improving detection of chrysanthemum stunt and obtaining viroid-free plants by meristem-tip culture // *Acta Hort.* – 1976. – №59. – P.63-69.
15. Butenko R.G. Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis. – Moscow: Science, 1964. – 272 p.
16. Butenko R.G. Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnology based on them: Studies. benefit. – M.: FGC-PRESS, 1999. – 160 p.
17. Kataeva N.B., Butenko R.G. Clonal micropropagation of plants. – M.: Science, 1983. – 232 p.
18. Kalinin F.I., Kushnir G.P., Samatskaya V.V. Technology of microclonal reproduction of plants. – K.: Naukova Dumka, 1992. – 23 p.
19. Mitrofanova O.V., Slavgorodskaya-Kurpieva L.E., Mitrofanova I.V., Lukicheva L.A. Diagnosis of viral diseases and biotechnological methods of obtaining virus-free planting material of stone fruit crops. – Yalta: Crimea press, 2000. – 45 p.
20. Torrence L., Jones R.A.C. Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses // *Plant Pathology.* – 1981. – V.30. – P.1-24. DOI:10.1111/j.1365-3059.1981.tb01218.x
21. *Biotechnology of Ornamental Plants* / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – 412 p.
22. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. *Plant Propagation by Tissue Culture.* 3rd Edition. – Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. – 501 p.
23. Doerschug M.R., Miller C.O. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants // *Am. J. Bot.* – 1967. – №54. – P.410-413.
24. Koevary K., Rappaport L., Morris L.L. Tissue culture propagation of Head lettuce // *Hortic. Sci.* – 1978. – №13. – P.39-41.
25. Bloksberg L.N., Saltveit M.E. Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown iceberg lettuce // *Hortic. Sci.* – 1986. – №21. – P.1201-1203.
26. Pink D.A.C., Carter P.J. Propagation of lettuce (*Lactuca sativa*) breeding material by tissue culture. *Ann. Appl. Biol.* – 1987. – P.611-616.
27. Armas I., Pogrebnyak N., Raskin I. A rapid and efficient *in vitro* regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Plant Methods.* – 2017. – V.13. – Is.1. – P.1-9. DOI: 10.1186/s13007-017-0208-0
28. Berry S.F., Lu D.Y., Pental D., Cocking E.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Lactuca sativa* L. Z Pflanzenphysiol. – 1982. – №108. – P.31-38. DOI:10.1016/S0044-328X(82)80088-3
29. Brown C., Lucas J.A., Crute I.R., Walkley D.G.A., Power J.B. An assessment of genetic variability in some commercial lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) and their offspring // *Ann. Appl. Biol.* – 1986. – №109. – P.391-407.
30. Alconero R. Regeneration of plants from cell suspensions of *Lactuca saligna*, *Lactuca sativa* and *Lactuca serriola* // *Hortic. Sci.* – 1983. – №18. – P.305-307.
31. Murashige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – №15. – P.473-497.
32. Pink D.A.C. Micropropagation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III* (ed. by Y.P.S. Bajaj) – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, – 1992. – P.42-57.
33. Schenk R.V., Hildebrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Canad. J. Bot.* – 1972. – №50. – P.199-204. DOI:10.1139/b72-026
34. Teng W.L., Liu Y.J., Soong T.S. Rapid regeneration of lettuce from suspension culture // *Hortic. Sci.* – 1992. – №27. – P.1030-1032.
35. Xinrun Z., Conner A.J. Genotypic effects on tissue culture response of lettuce cotyledons // *J. Genet. Breed.* – 1992. – №46. – P.287-90.
36. Ampomah-Dwamena C., Conner A.J., Fautrier A.G. Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration *in vitro* // *Sci. Hort. (Amsterdam)* – 1997. – №71. – P.137-145.
37. Mohebodin M., Javarani 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.
38. Latif B., Javarani 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. – V.5. – №1. – P.315-322.
39. Jenni S., Loukil F., Moghaddam B. E. *In vitro* culture response of apical and axillary shoot-tips excised from crisphead lettuce cores depends on head maturity not storage time // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2006. – V.42. – №3. – P.274-277.
40. Mazier M., Maisonneuve B., Bellec Y., Chupeau M.C., Souche S. and Chupeau Y. Interest of protoplasts for lettuce breeding // *Eucarpia Leafy Vegetables 99*, A. Lebeda, Kristkova, ed., *Proceeding of the Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding*, Olomouc, the Czech Republic, 8-11 June, 1999. Palacky University Olomouc, Olomouc, 1999. – P.239-244.
41. Dombildes E.A., Shmykova N.A., Shumilina D.V., Zayachkovskaya T.V., Vjurtts T.S., Kozar E.V., Kan L.Yu., Romanov V.S., Dombildes A.S., Pivovarov V.F., Soldatenko A.V. Biotechnological approaches for breeding programs in vegetable crops. *Agrosym 2017. Book of proceedings.* – 2017. – P.452-460. DOI: 10.18619/2072-9146-2018-6-3-7
42. Koyama R., Sanada M., Itoh H., Kanechi M., Inagaki N., Uno Y. *In vitro* evaluation of tipburn resistance in lettuce (*Lactuca sativa* L.) // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2012. – №108. – P.221-227. DOI:10.1007/s11240-011-0033-5
43. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell. Res.* – 1968. – №50. – P.151-158.
44. Guidelines for the evaluation and creation of the source material of sweet pepper with resistance to the tomato bronze virus / V.F. Pivovarov, O.N. Pysnaya, M.I. Mammadov, I.T. Balashova, L.K. Gurkina, E.G. Kozar, I.A. Engalycheva. – M., 2007. – 18 s.
45. Johnstone G.R., Wade G.C. Therapy of virus-infected plants by heat treatment I. Some properties of tomato aspermy virus and its inactivation at 36°C // *Austral. J. Bot.* – 1974. – V.22. – №3. – P.437-450. DOI:10.1071/BT9740437