

ОБЗОРЫ

Обзорная статья
УДК 575.222.73
DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-256-264



Межвидовая гибридизация и клеточная инженерия салата (*Lactuca L.*)

Н. А. Загнухина, А. Б. Курина

Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Наталья Андреевна Загнухина, nzagnuhina97@gmail.com

Lactuca sativa L. (салат) – овощная зеленная культура семейства Asteraceae, широко возделываемая во всем мире. Основными направлениями в селекции салата являются повышение урожайности, улучшение вкусовых качеств растения, скороспелость, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессорам. Некоторые дикорастущие виды *Lactuca* L. широко используют в селекции салата в качестве доноров устойчивости к различным болезням. При создании новых сортов в настоящее время используют как традиционные, так и биотехнологические методы селекции. В данной статье представлен обзор основных достижений по получению межвидовых гибридов салата, включая методы культуры клеток и тканей и генной инженерии. Исследования искусственной гибридизации и изучение естественных популяций позволяют выяснить эволюционные связи между различными видами салата. Соматическая гибридизация – незаслуженно забытая, но перспективная технология в селекции салата – позволяет получать более широкий спектр изменений и не подвергается строгому контролю со стороны законов о ГМО. Этот метод имеет проблемы, связанные со сложностью регенерации протопластов и потерей способности к размножению у гибридов. Методы редактирования генома более эффективны и легче поддаются контролю, однако общество все еще настороженно относится к любым вмешательствам в геном растений и законодательно регулирует продажу ГМ-продуктов в качестве продуктов питания. Перед исследователями стоит задача усовершенствования данных методик.

Ключевые слова: *Lactuca* L., селекция, методы, межвидовые гибриды, клеточная и генная инженерия

Благодарности: статья подготовлена в рамках государственного задания ВИР согласно тематическому плану ВИР по проекту FGEM-2022-0012 «Клеточные технологии для расширения селекционного потенциала культур овощного направления использования».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Загнухина Н.А., Курина А.Б. Межвидовая гибридизация и клеточная инженерия салата (*Lactuca* L.). Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2024;185(3):256-264. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-256-264

SURVEYS

Review article

DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-256-264

Interspecific hybridization and cell engineering of lettuce (*Lactuca L.*)

Natalia A. Zagnukhina, Anastasia B. Kurina

*N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg Russia***Corresponding author:** Natalia A. Zagnukhina, nzagnuhina97@gmail.com

Lactuca sativa L. is a leafy vegetable crop of the Asteraceae family, widely cultivated throughout the world. The main breeding trends for lettuce include higher yields, better taste quality, earliness, and resistance to abiotic and biotic stressors. Some wild *Lactuca* spp. have actively been employed by lettuce breeders as donors of resistance to various diseases. Conventional and biotechnological breeding methods are both currently used to develop new lettuce cultivars. This is an overview of the main advances in the production of interspecific *Lactuca* hybrids, including the use of cell and tissue culture techniques, and genetic engineering. Studying artificial hybridization and natural populations makes it possible to identify evolutionary relationships among various *Lactuca* spp. Somatic hybridization is an overlooked but promising technology in *Lactuca* breeding: it allows a breeder to obtain a wider range of variations, and is beyond the strict control by GMO laws. This technique faces problems associated with complicated protoplast regeneration and the loss of reproductive ability in hybrids. Genome-editing methods are more effective and better controllable, but society is still wary of any interference with the plant genome and legally regulates the sale of GM products as food. Thus, researchers are challenged with the task to improve these techniques.

Keywords: *Lactuca* L., breeding, methods, interspecific hybrids, cell and genetic engineering

Acknowledgements: the article was prepared within the framework of the state task according to the theme plan of VIR, Project No. FGEM-2022-0012 "Cell technologies to expand the breeding potential of crops for vegetable use". The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Zagnukhina N.A., Kurina A.B. Interspecific hybridization and cell engineering of lettuce (*Lactuca* L.). *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(3):256-264. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-3-256-264

Введение

Lactuca sativa L. (салат-латук, салат посевной) – это однолетняя культура семейства Asteraceae, широко возделываемая во всем мире благодаря своей высокой продуктивности и ценному биохимическому составу. Такие страны, как США, Китай, Индия, Япония, Испания и Италия, являются крупнейшими мировыми производителями салата. По данным ФАО ООН, производство салата (и цикория) на 2021 г. превысило 27 миллионов тонн, а задействованная под его посеvy площадь составила 1,2 миллиона гектаров (FAOSTAT..., 2022). На 2023 г. в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию на территории РФ, было включено 470 сортов салата, большинство из которых характеризуются устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды (<https://gossortrf.ru>).

Основным фактором, ограничивающим урожайность культурного салата, является поражение растений различными заболеваниями и вредителями. Для решения этой проблемы, а также для обогащения генофонда этой экономически значимой культуры новыми полезными признаками широко используется межвидовая гибридизация (Engalicheva et al., 2015). С ее помощью можно передать ценные гены от дикорастущих видов к культурному, расширить генетическую изменчивость и получить новые перспективные формы с комплексом хозяйственно ценных признаков, включая высокую устойчивость к неблагоприятным факторам. Основное внимание в селекции салата уделяется внедрению генов устойчивости к ложной мучнистой росе, поскольку данное заболевание является наиболее серьезным поражением растений.

В мире насчитывается большое разнообразие видов салата. По классификации A. Lebeda et al. (2007) род *Lactuca* насчитывает около ста видов.

На основе концепции генофонда (Harlan, de Wet, 1971) виды *Lactuca* были разделены на три генофонда – первичный (GP-1), вторичный (GP-2) и третичный (GP-3).

Первичный генофонд представлен многочисленными сортами *L. sativa*, примитивными местными сортами и дикорастущими видами, прежде всего прямым предком культурного салата – *L. serriola* L., для которых не существует барьеров межвидового скрещивания (De Vries, 1997). Современные исследователи включают в этот генофонд также *L. aculeata* Boiss., *L. altaica* Fisch. & C.A. Mey., *L. azerbaijanica* Rech.f., *L. scarioloides* Boiss., *L. georgica* Grossh., *L. dregeana* DC. (Zohary, 1991; Lebeda et al., 2007; Jemelková et al., 2015; Chu et al., 2022). Как правило, виды салата, входящие в первичный генофонд, успешно скрещиваются между собой как спонтанно в природных популяциях, так и традиционными методами селекции. Успешная взаимная гибридизация *L. sativa* × *L. serriola* позволила ввести в культурный сорт несколько генов устойчивости к ложной мучнистой росе (Crute, 1992).

Вторичный генофонд включает виды, которые могут давать при гибридизации с GP-1 в F₁ частично фертильные растения (Harlan, de Wet, 1971). Во вторичный генофонд *Lactuca* включен *L. saligna* (Zohary, 1991; Singh, 2006). Скрещивание *L. saligna* × *L. sativa* возможно только в случае, если *L. saligna* используется в качестве материнской формы (De Vries, 1990).

К третичному генофонду относят виды, у которых различные пре- и постзиготические барьеры вызывают частичную или полную неудачу гибридизации между GP-1 и GP-3 (Singh, 2006). К третичному генофонду отно-

сят *L. virosa* L., а также *L. aurea* (Vis. & Pančić) Stebbins, *L. acanthifolia* (Willd.) Boiss., *L. alpestris* (Gand.) Rech.f., *L. indica* L., *L. oblongifolia* Nutt., *L. orientalis* Boiss., *L. quercina* L., *L. reviersii* Litard. & Maire, *L. sibirica* Benth. ex Maxim., *L. tatarica* (L.) C.A. Mey., *L. tetrantha* B.L. Burt & P.H. Davis, *L. taraxacifolia* (Willd.) Schumacher, *L. longidentata* Moris ex DC., *L. viminea* (L.) J. Presl & C. Presl и *L. watsoniana* Trel. и некоторые другие дикорастущие виды (Wei Z. et al., 2017; Wei T. et al., 2021; Chu et al., 2022).

Большинство современных сортов *L. sativa* созданы методом традиционной селекции – путем гибридизации с местными адаптированными сортами. Таким способом получены высокоурожайные, скороспелые сорта с высоким качеством и устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессорам (Hassan et al., 2021). Однако этот метод имеет ограничения в возможности комбинирования генов и этим усложняет селекционный процесс (Samko, Snigireva, 2009). В настоящее время для получения форм с желаемыми признаками такие современные биотехнологические методы, как клеточная и генная инженерия, заменяют традиционные подходы к селекции растений. В частности, для салата применяются такие методы, как соматическая гибридизация и трансгенез. Для редактирования генов также широко используется технология CRISPR/Cas9.

В данной статье представлен обзор основных достижений по получению межвидовых гибридов салата, включая методы культуры клеток и тканей и генной инженерии.

Естественная и искусственная межвидовая гибридизация

Салат – автогамное растение, но также возможны и случаи спонтанного перекрестного опыления (De Vries, 1997). В природе виды, относящиеся к первичному генофонду, успешно скрещиваются между собой. Однако в большинстве случаев подобные гибриды между культурными и дикорастущими растениями *Lactuca* остаются незамеченными, поскольку они неотличимы по внешнему виду от своих диких родственников (Hooftman et al., 2005).

Ряд экспериментальных исследований посвящен изучению естественных гибридов между *L. sativa* × *L. serriola* (Hooftman et al., 2007; D'Andrea et al., 2008; Uwimana et al., 2012).

В 2007 г. D.A.P. Hooftman, M.J.D. Jong, J.G.B. Oostermeijer и др. предположили, что гибридизация между *L. sativa* и *L. serriola* привела к расширению естественного ареала *L. serriola* за счет улучшения его адаптивности (Hooftman et al., 2007).

В работе L. D'Andrea, F. Felber и R. Guadagnuolo (D'Andrea et al., 2008) говорится о возможности естественной гибридизации между *L. sativa* и *L. serriola*. Уровень гибридизации в этом исследовании варьировал от 0 до 26% в зависимости от расстояния между растениями. Свыше 80% растений дали по крайней мере один гибрид на расстоянии 1 м и от 4 до 5% на расстоянии 40 м.

B. Uwimana, L. D'Andrea, F. Felber и др. (Uwimana et al., 2012a) подтвердили гипотезу о повсеместном распространении естественных гибридов между *L. serriola* и *L. sativa*. Анализ показал, что общее распространение гибридных растений салата в Европе составило 7%.

Возможность естественной гибридизации *L. aculeata* × *L. serriola* также была подтверждена установлением гибридного происхождения нескольких образцов,

морфологически определенных как *L. aculeata*, но содержащих гены обоих видов. Несколько образцов проявляли морфологические признаки, характерные для *L. serriola*, при их выращивании в теплице (Jemelková et al., 2015).

В ряде работ сообщалось о спонтанной межвидовой гибридизации, обнаруженной в природных популяциях у *L. altaica* с *L. saligna* и *L. serriola*; *L. aculeata* с *L. sativa*; *L. serriola* с *L. dregeana* и *L. saligna* (Zohary, 1991; Křístková, 2012).

Работы по искусственной гибридизации проводили как для выявления эволюционных взаимосвязей между видами *Lactuca*, так и для целей прикладной селекции (Uwimana et al., 2012b; Hoofman et al., 2005, 2007, 2008, 2009). Несколько полевых экспериментов по гибридизации между *L. serriola* и культурным салатом показали улучшенные характеристики всхожести и жизнеспособности у гибридов по сравнению с их диким родителем: они прослеживались на протяжении четырех поколений, что могло быть связано с гетерозисом, сцепленным наследованием и трансгрессивной сегрегацией (Hoofman et al., 2005, 2007, 2008, 2009; Hartman et al., 2013). Были проведены эксперименты в контролируемых абиотических стрессовых условиях (засуха, засоление и дефицит питательных веществ) для выявления вклада аллелей генов в продуктивность потомства F_2 , полученного от гибридизации между *L. sativa* и *L. serriola* путем переноса пыльцы (Uwimana et al., 2012b).

Таким образом, проведенные исследования наглядно показывают возможность естественной гибридизации между культурным и дикими видами *Lactuca*. Эксперименты по искусственной гибридизации и изучение естественных популяций позволили выяснить эволюционные связи между различными видами.

Методы культуры клеток и тканей

Для преодоления межвидовых барьеров при получении гибридов между дикими видами и культурным салатом широко используют методы клеточной биологии. Они основаны на регенерации растений из культуры протопластов, клеток и тканевых эксплантов. К таким методам относят, в частности, метод спасения незрелых эмбрионов и слияние протопластов посредством соматической гибридизации (Lebeda et al., 2014).

Существует несколько способов преодолеть половую несовместимость посредством спасения зародышей. Выбор методики связан с типом несовместимости, который возникает на этапе до или после оплодотворения.

Прогамная несовместимость проявляется при отдаленной гибридизации на этапе до оплодотворения и обусловлена морфологическими (различия родительских форм по длине столбика пестика и пыльцевой трубки; блокирование роста трубки на разных этапах ее пути от рыльца до микропиле семязпочки) или физиологическими (разное время созревания пыльцы или отсутствие нектара рыльца пестика) причинами (Shmykova et al., 2015). Основной способ ее преодоления – оплодотворение *in vitro*, которое заключается в совместном культивировании пыльцы и семязпочек. Сформировавшийся зародыш прорастает и дает начало гибриднему поколению.

Постгамная несовместимость наблюдается после оплодотворения и приводит к образованию невсхожих семян. Если она связана с несоответствием темпов развития зародыша и эндосперма или непригодностью используемых для питания зародыша метаболитов тка-

ней материнского растения, то для ее преодоления применяют культивирование незрелых гибридных зародышей на питательной среде. Если она обусловлена генетическими причинами и приводит к аномалиям развития органов зародыша или молодого проростка, то для ее преодоления используют введение промежуточного этапа – получения гибридной каллусной ткани из живых тканей проростка или зародыша и регенерации растений на ее основе.

Спасение *in vitro* незрелых зародышей позволило получить гибриды *L. sativa* × *L. virosa* и *L. sativa* × *L. saligna* (Maisonneuve, Bellec, 1987; Maisonneuve, 2003). Генотип *L. sativa* при этом оказывал влияние на успешность культивирования эмбрионов.

Технологию соматической гибридизации растений путем слияния протопластов долгое время широко использовали для получения гибридов между культурным и дикорастущими видами салата (Hassan et al., 2021). Основным преимуществом этого метода является то, что в отличие от гибридов, полученных половым путем, при слиянии протопластов цитоплазматические гены передаются не только материнским путем, а от обоих родителей. С его помощью возможно также получать ассиметричные и многоплоидные гибриды (Samko, Snigireva, 2009).

Протопласты сливают физическими (электрослияние) или химическими (с помощью ПЭГ) методами и инкубируют. С помощью ПЭГ удалось провести слияние сортов *L. sativa* 'Evola' и 'Red Leaf Amboni' (Siddiqui, 2014). Межвидовая соматическая гибридизация культурного салата с *L. serriola* (Matsumoto, 1987) и *L. indica* (Mizutani et al., 1989) также достигнута данным методом (Matsumoto, 1987). При помощи электрослияния осуществлена соматическая гибридизация между сортами культурного салата (Siddiqui, 2014), а также *L. sativa* с *L. virosa* (Matsumoto, 1987) и с *L. indica* (Mizutani et al., 1989). Авторы отметили, что эффективность метода электрослияния протопластов сортов *L. sativa* была на 40,51% выше, чем при использовании полиэтиленгликоля (Siddiqui, 2014).

Несмотря на то что регенерация протопластов культурного и дикого салата проходила успешно, фертильные растения в ранних исследованиях не были получены (Brown et al., 1987; Nishio et al., 1988). W. Chaipakdee (2007) в своем исследовании сообщил, что микроколонии наблюдали в течение 4 недель в культурах протопластов *L. sativa*, но в дальнейшем образования каллуса не происходило. У Е. Matsumoto (1987, 1991) были получены гибридные регенеранты дикого и культурного салата *L. sativa* × *L. serriola* и *L. sativa* × *L. virosa*. Они имели нормальную морфологию, но демонстрировали признаки диких видов (жесткие волоски, горький вкус и т. д.), а также имели частичную или полную стерильность. Несмотря на неудачи, в недавнем исследовании (Son et al., 2022) фертильные растения корейского сорта салата 'Чеонгчима' успешно регенерированы из протопластов, полученных из листьев.

Методы спасения зародышей и соматической гибридизации имеют большой потенциал и перспективы для селекции растений, поскольку позволяют создавать новые формы сельскохозяйственных культур с улучшенными характеристиками, а также преодолевать барьеры, связанные с половой несовместимостью, однако в настоящее время их используют нечасто. В частности, в последнее время практически не поступало новых сообщений об использовании соматической гибридизации салата с целью интрогрессии генов диких видов в *L. sativa*,

и большая часть исследований относится к 80–90 годам прошлого века.

Трансформация

При отсутствии новой информации, касающейся переноса важных селекционных признаков от диких видов в *L. sativa* путем соматической гибридизации, в настоящее время активно исследуют возможности переноса генов в дикорастущий и культурный салат с помощью трансформации.

Первые попытки привнести в салат новые гены осуществляли посредством электропорации протопластов путем прямого поглощения ДНК или при помощи трансформации, опосредованной ПЭГ (Davey et al., 2009). Несмотря на то что были достигнуты определенные успехи, лишь немногие генотипы салата удалось преобразовать таким путем из-за сложности с регенерацией растений. Впоследствии трансформацию протопластов осуществляли преимущественно с помощью агробактерий.

В 1987 г. группа исследователей (Michelmore et al., 1987) опубликовала первый протокол по трансформации с использованием *Agrobacterium tumefaciens* C58, ACH5 и GV3111 с рTiB6S3. Трансформация была достигнута с помощью различных интегрирующих и бинарных векторов *Ti* (pMON120, pMON200, pMON505), содержащих химерный ген устойчивости к канамицину. Таким способом удалось получить несколько сотен растений; при этом получение потомства от трансформированных растений заняло всего на 2–5 недель больше, чем при обычном жизненном цикле.

В протоколах, предложенных в ранних работах, успех трансформации часто зависел от генотипа растения (Michelmore et al., 1987; Torres et al., 1993), но в дальнейших исследованиях удалось добиться независимой от генотипа трансформации (Curtis et al., 1994; Wroblewski et al., 2005; Song et al., 2014; Chen et al., 2018).

При помощи трансформации в растения салата введен мутантный ген *P5CS*, придающий растению устойчивость к отрицательным температурам (Pileggi et al., 2001). Предложен механизм обеспечения засухоустойчивости путем подавления генов (*PIP*), кодирующих аквапорины плазматической мембраны (Porcel et al., 2006).

Устойчивость к грибковому патогену *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary достигнута путем переноса в салат гена хитиназы риса (*chi*) (Sharma et al., 2022). Гены, придающие устойчивость к вирусу мозаики салата, также введены при помощи трансформации (Dinant et al., 1997).

Субъединица термолabileного энтеротоксина В (LTB) *Escherichia coli* способна индуцировать иммунный ответ и может быть использована в качестве адъюванта при введении антигенов. Синтетический LTB (sLTB) введен в клетки *L. sativa* методами агробактериальной трансформации (Kim et al., 2007).

По сравнению с ядерной трансформацией, трансформация генома пластид имеет преимущество за счет многократности молекул ДНК в хлоропластах, что обеспечивает высокую продукцию трансгенов. Кроме того, пластидный геном наследуется материнским путем, что облегчает контроль над передачей генетических изменений. Тем не менее не все гены могут быть трансформированы таким путем. Пластидная трансформация при помощи генной пушки произведена для культурного салата сорта 'Cisco' (Kanamoto et al., 2006).

Трансформация салата открывает большие перспективы для получения «съедобных вакцин». Трансформа-

цию, опосредованную *Agrobacterium tumefaciens*, использовали для получения трансгенных растений салата, несущих ген ВИЧ (вируса иммунодефицита человека) *gp-gp120* (Jing et al., 2007), а также вырабатывающих антигены к вирусу гепатита В (Marcondes, Hansen, 2008). Экстракты трансгенного салата, экспрессирующие поверхностный антиген гриппа H1N1 (нейраминидаза), вызывали иммунный ответ у мышей (Liu et al., 2012). Исследована биологическая активность белковых экстрактов салата, в который был введен ген человеческого интерферона *α2b*, в отношении вируса везикулярного стоматита (Matvieieva et al., 2012). Исследование показало зависимость противовирусной активности растительных экстрактов из корней или листьев от вектора, используемого для трансформации растений. Трансгенные растения *L. sativa* с генами, кодирующими синтез туберкулезных антигенов, также получены при помощи агробактериальной трансформации (Matvieieva et al., 2009).

Таким образом, исследования в области трансформации салата продолжают активно развиваться и вносят значительный вклад в селекцию и биотехнологию растений. Введение генов, придающих устойчивость к неблагоприятным условиям, а также создание «съедобных вакцин» открывают новые возможности для использования салата в медицине и сельском хозяйстве.

Редактирование генома

Для редактирования генома в последние десятилетия были разработаны такие технологии, как нуклеазы цинковых пальцев (Zinc-finger nucleases – ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (Transcription activator-like effector nuclease – TALEN), и кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы, узнаваемые нуклеазой Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, recognized by Cas9 nuclease – CRISPR/Cas9) (Kuzmina, 2020). Самым распространенным способом редактирования генома в настоящее время является технология CRISPR/Cas9, поскольку данный метод демонстрирует простоту, точность и предсказуемость результатов.

Несколькими исследователями разработан подробный протокол редактирования генома на основе RNP в протопластах салата с их последующей регенерацией (Woo et al., 2015; Park et al., 2019). При помощи Cas9 RNP из протопластов регенерированы мутанты по гену *LsNCE4*, ответственному за термоингибирование прорастания семян (Bertier et al., 2018). Его подавление позволило получить растения, прорастающие при высоких температурах, что может быть коммерчески ценным признаком в зонах с жарким климатом. Кроме того, *LsNCE4* можно использовать в качестве дополнительного маркера при редактировании CRISPR, поскольку его введение в геном позволит отобрать необходимые растения путем проращивания семян при высокой температуре.

Одним из направлений в селекции салата является получение сортов, обладающих поздним стрелкованием и, соответственно, цветением, поскольку оно вызывает ухудшение качества и вкуса листьев и сокращает время сбора урожая. В работе S. H. Choi et al. (2022) применена технология CRISPR с целью уменьшения экспрессии гена *SOC1*, кодирующего один из нескольких транскрипционных факторов, регулирующих начало цветения у салата. Время начала цветения было отложено за счет индукции

однонуклеотидной мутации с помощью RNP в *SOC1*, что привело также к снижению активности таких регуляторных генов, как *LsLFY*, *LsFUL*, *LsAPL1* и *LsAPL2*, отвечающих за цветение.

Исследования в области геномного редактирования салата с использованием таких современных технологий, как CRISPR/Cas9, открывают новые перспективы для быстрого создания высококачественных сортов, способных адаптироваться к различным условиям. Применение CRISPR/Cas9 в настоящее время широко распространено, поскольку позволяет вносить точечные изменения в генетический материал и редактировать конкретные участки генов, при этом отличаясь простотой и точностью результатов.

Обсуждение

В настоящее время чаще всего для получения новых признаков у салата используют технологию CRISPR/Cas9 посредством агробактериальной трансформации, электропорации или при помощи ПЭГ. Такой метод, как гибридизация соматических клеток, незаслуженно забыт – несмотря на это, у него есть некоторые преимущества. В отличие от CRISPR/Cas9, он может привести к более широкому спектру изменений, так как позволяет совмещать различные свойства родительских видов и получать полиплоидные и гибридные формы со сложными ядерно-цитоплазматическими комбинациями. Кроме того, соматические гибриды не признаются генетически модифицированными организмами и их оборот не подвергается строгому контролю.

Помимо положительных сторон, использование соматической гибридизации в селекции рождает некоторые проблемы, которые ограничивают его применение. Проведение соматической гибридизации и последующая селекция – кропотливый и долгий процесс. Прежде всего, стоит отметить, что хотя способы регенерации протопластов у салата были описаны как у культурных, так и дикорастущих видов, сообщения о регенерации жизнеспособных фертильных растений из протопластов довольно редки. Потеря способности к размножению у гибридов связана с возникновением различных генетических барьеров. Чаще всего это обусловлено нарушением мейоза в процессе гаметогенеза. Это приводит к образованию гамет с неправильным числом хромосом, что препятствует успешному оплодотворению и развитию зародышей. Кроме этого, стерильность может быть обусловлена как несовместимостью ядра и цитоплазмы, так и действием генов, препятствующих развитию женских и мужских органов цветка.

Редактирование генов с помощью CRISPR/Cas, несомненно, является более простой технологией, но с точки зрения законодателей различных стран, регулирующих оборот ГМО, полученные растения имеют либо неясный статус, либо приравниваются к генетически модифицированным организмам. По этой причине пока ни один сорт салата, даже обладающий потенциально ценными свойствами, еще не поступил в продажу. Доставка системы CRISPR/Cas посредством рибонуклеопротеина (RNP) может быть решением данной проблемы. RNP не действует на ДНК, поэтому полученные в результате отредактированные культуры, вероятно, выходят за рамки регулирования ГМО, открывая путь к широкому использованию данного способа редактирования генома в биотехнологии и сельском хозяйстве (Woo et al., 2015; Park et al., 2019).

Таким образом, любой подход к получению новых свойств у культурного салата имеет как преимущества, так и недостатки. Выбор между ними зависит от конкретной задачи и требований к модифицированным растениям.

Заключение

Lactuca sativa – широко распространенная по всему миру овощная культура. Основными направлениями в селекции салата являются повышение урожайности, улучшение вкусовых качеств растения, скороспелость, устойчивость к абиотическим и биотическим стрессорам. При создании новых сортов в настоящее время используют как традиционные, так и биотехнологические методы селекции. Соматическая гибридизация является незаслуженно забытой, но перспективной технологией в селекции салата, которая позволяет получать более широкий спектр изменчивости и не подвергается строгому контролю со стороны законов о ГМО. Однако этот метод рождает проблемы, связанные со сложностью регенерации протопластов и потерей способности к размножению у гибридов. Методы редактирования генома более эффективны и лучше поддаются контролю, однако общество все еще настороженно относится к любым вмешательствам в геном растений и законодательно регулирует продажу ГМ-продуктов в качестве продуктов питания. Доставка системы CRISPR/Cas посредством рибонуклеопротеина (RNP) может быть решением данной проблемы. Перед исследователями в дальнейшем стоит задача усовершенствования данных методик.

References / Литература

- Berry S.F., Lu D.Y., Pental D., Cocking E.C. Regeneration of plants from protoplasts of *Lactuca sativa* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 1982;108(1):31-38. DOI: 10.1016/s0044-328x(82)80088-3
- Bertier L.D., Ron M., Huo H., Bradford K.J., Britt A.B., Michelmore R.W. High-resolution analysis of the efficiency, heritability, and editing outcomes of CRISPR/Cas9-induced modifications of NCED4 in lettuce (*Lactuca sativa*). *G3 (Bethesda)*. 2018;8(5):1513-1521. DOI: 10.1534/g3.117.300396
- Brown C., Lucas J.A., Power J.B. Plant regeneration from protoplasts of a wild lettuce species (*Lactuca saligna* L.). *Plant Cell Reports*. 1987;6(3):180-182. DOI: 10.1007/BF00268472
- Chaipakdee W. Isolation and culture of protoplast from leaves of *Lactuca sativa*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2007;29(4):929-935.
- Chen Z., Han Y., Ning K., Ding Y., Zhao W., Yan S. et al. Inflorescence development and the role of *LsFT* in regulating bolting in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2018;8:2248. DOI: 10.3389/fpls.2017.02248
- Choi S.H., Ahn W.S., Jie E.Y., Cho H.S., Kim S.W. Development of late-bolting plants by CRISPR/Cas9-mediated genome editing from mesophyll protoplasts of lettuce. *Plant Cell Reports*. 2022;41(7):1627-1630. DOI: 10.1007/s00299-022-02875-w
- Chu R., Xu X., Lu Z., Ma Y., Cheng H., Zhu S. et al. Plastome-based phylogeny and biogeography of *Lactuca* L. (Asteraceae) support revised lettuce gene pool categories. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:978417. DOI: 10.3389/fpls.2022.978417
- Crute I.R. The role of resistance breeding in the integrated control of downy mildew (*Bremia lactucae*) in protected lettuce. *Euphytica*. 1992;63:95-102. DOI: 10.1007/BF00023915

- 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*. *Journal of Experimental Botany*. 1994;45(10):1441-1449. DOI: 10.1093/jxb/45.10.1441
- D'Andrea L., Felber F., Guadagnuolo R. Hybridization rates between lettuce (*Lactuca sativa*) and its wild relative (*L. serriola*) under field conditions. *Environmental Biosafety Research*. 2008;7(2):61-71. DOI: 10.1051/ebr:2008006
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. Leafy vegetables. In: C. Kole, T.C. Hall (eds). *Compendium of Transgenic Crop Plants. Vol. 6. Transgenic Vegetable Crops*. Chichester: Wiley-Blackwell; 2009. p.217-248. DOI: 10.1002/9781405181099.k0610
- De Vries I.M. Crossing experiments of lettuce cultivars and species (*Lactuca* sect. *Lactuca*, Compositae). *Plant Systematics and Evolution*. 1990;171(3):233-248. DOI: 10.1007/BF00940608
- De Vries I.M. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 1997;44(2):165-174. DOI: 10.1023/A:1008611200727
- Dinant S., Maisonneuve B., Albouy J., Chupeau Y., Chupeau M.C., Bellec Y. et al. Coat protein gene-mediated protection in *Lactuca sativa* against lettuce mosaic potyvirus strains. *Molecular Breeding*. 1997;3:75-86. DOI: 10.1023/a:1009671925550
- Engalicheva I.A., Pishnaya O.N., Dzhos E.A., Timina L.T., Zolotareva O.I. Use of interspecific hybridization in *Capsicum* and *Lactuca* breeding for virus resistance. *Russian Agricultural Science Review*. 2015;6(6-2):2-4. [in Russian] (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. *Russian Agricultural Science Review*. 2015;6(6-2):2-4).
- Engler D.E., Grogan R.G. Isolation, culture and regeneration of lettuce leaf mesophyll protoplasts. *Plant Science Letters*. 1982;28(2):223-229. DOI: 10.1016/s0304-4211(83)80013-3
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and agriculture data. Rome: FAO; 2022. Available from: <http://www.fao.org/> [accessed Feb. 06, 2024].
- Harlan J.R., de Wet J.M.J. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 1971;20(4):509-517. DOI: 10.2307/1218252
- Hartman Y., Uwimana B., Hooftman D.A.P., Schranz M.E., van de Wiel C., Smulders M.J.M. et al. Genomic and environmental selection patterns in two distinct lettuce crop-wild hybrid crosses. *Evolutionary Applications*. 2013;6(4):569-584. DOI: 10.1111/eva.12043
- Hassan M.N., Mekki S.A., Mahdy M., Salem K.F.M., Tawfik E. Recent molecular and breeding strategies in lettuce (*Lactuca* spp.). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2021;68(8):3055-3079. DOI: 10.1007/s10722-021-01246-w
- Hooftman D.A.P., de Jong M.J., Oostermeijer J.G.B., Den Nijs H.C.M. Modelling the long-term consequences of crop-wild relative hybridization: a case study using four generations of hybrids. *Journal of Applied Ecology*. 2007;44(5):1035-1045. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2007.01341.x
- Hooftman D.A.P., Hartman Y., Oostermeijer J.G.B., Den Nijs H.C.M. Existence of vigorous lineages of crop-wild hybrids in Lettuce under field conditions. *Environmental Biosafety Research*. 2009;8(4):203-217. DOI: 10.1051/ebr/2010001
- Hooftman D.A.P., Oostermeijer J.G.B., Jacobs M.M.J., Den Nijs H.C.M. Demographic vital rates determine the performance advantage of crop-wild hybrids in lettuce. *Journal of Applied Ecology*. 2005;42(6):1086-1095. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2005.01086.x
- Hooftman D.A.P., Oostermeijer J.G.B., Marquard E., Den Nijs H.C.M. Modelling the consequences of crop-wild relative gene flow: a sensitivity analysis of the effects of outcrossing rates and hybrid vigour breakdown in *Lactuca*. *Journal of Applied Ecology*. 2008;45(4):1094-1103. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2008.01508.x
- Jemelková M., Kitner M., Křístková E., Beharav A., Lebeda A., Biodiversity of *Lactuca aculeata* germplasm assessed by SSR and AFLP markers, and resistance variation to *Bremia lactucae*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2015;61:344-356. DOI: 10.1016/j.bse.2015.07.003
- Jing J., Ji J., Wang G., Wang P., Zhang P.Y. Establishment of genetic transformation system of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* and introduction of HIV *gap-gp120* gene. *Tianjin Agricultural Sciences*. 2007;13(1):14-17.
- 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 Research*. 2006;15(2):205-217. DOI: 10.1007/s11248-005-3997-2
- Kim T.G., Kim M.Y., Kim B.G., Kang T.J., Kim Y.S., Jang Y.S. et al. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *Protein Expression and Purification*. 2007;51(1):22-27. DOI: 10.1016/j.pep.2006.05.024
- Křístková E., Lebeda A., Kitner M., Vafková B., Matoušková Z., Doležalová I. et al. Phenotypes of the natural interspecific hybrids in the genus *Lactuca*. *Úroda*. 2012;60(9):28-31.
- Kuzmina Y.V. Methods of genome editing for increasing the shelf life of tomato fruits. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):31-39. [in Russian] (Кузьмина Ю.В. Методы редактирования генома для увеличения лёжкости плодов томата. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):31-39). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-06
- Lebeda A., Křístková E., Kitner M., Mieslerova B., Jemelková M., Pink D. Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. *European Journal of Plant Pathology*. 2014;138(3):597-640. DOI: 10.1007/s10658-013-0254-z
- Lebeda A., Ryder E.J., Grube R., Doležalová I., Křístková E. Lettuce (*Asteraceae*; *Lactuca* spp.). In: R.J. Singh (ed.). *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 3. Vegetable Crops*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2007. p.377-472. DOI: 10.1201/9781420009569.ch9
- Liu C.W., Chen J.J.W., Kang C.C., Wu C.H., Yiu J.C. Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) expressing H1N1 influenza surface antigen (neuraminidase). *Scientia Horticulturae*. 2012;139:8-13. DOI: 10.1016/j.scienta.2012.02.037
- Maisonneuve B. *Lactuca virosa*, a source of disease resistance genes in lettuce breeding: results and difficulties for gene introgression. In: Th.J.L. van Hintum, A. Lebeda, D. Pink, J.W. Schur (eds.). *EUCARPIA Leafy Vegetables 2003: Proceedings of the EUCARPIA Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding; Noordwijkerhout, the Netherlands, 19–21 March 2003*. Wageningen: CGN; 2003. p.61-67.
- Maisonneuve B., Bellec Y. Utilisation de la culture *in vitro* d'embryons immatures pour les croisements interspécifiques entre *Lactuca sativa* L. et *L. saligna* L. ou *L. virosa* L.; étude des hybrides obtenu. *Agronomie*. 1987;7(5):313-319. [in French] DOI: 10.1051/agro:19870503
- Marcondes J., Hansen E. Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HBsAg. *The Brazilian Journal of*

- Infectious Diseases*. 2008;12(6):469-471. DOI: 10.1590/s1413-86702008000600004
- Matsumoto E. Interspecific somatic hybridization between lettuce (*Lactuca sativa*) and wild species *L. virosa*. *Plant Cell Reports*. 1991;9(10):531-534. DOI: 10.1007/BF00232325
- Matsumoto E. Production of somatic hybrids between *Lactuca sativa* and *L. serriola* by cell fusion. *Japanese Journal of Breeding*. 1987;37 Suppl 1:134-135.
- Matvieieva N.A., Kudryavets Y.I., Lichova A.A. Shachovsky A.M., Bezdenezhnykh N.A., Kvasko E.Yu. Antiviral activity of extracts of transgenic chicory and lettuce plants with the human interferon alpha2b gene. *Cytology and Genetics*. 2012;46(5):285-290. DOI: 10.3103/S0095452712050076
- Matvieieva N.A., Vasylenko M.Yu., Shakhovsky A.M., Kuchuk N.V. Agrobacterium-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with genes coding bacterial antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cytology and Genetics*. 2009;43(2):94-98. DOI: 10.3103/S0095452709020042
- Michelmore R., Marsh E., Seely S., Landry B. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*. 1987;6(6):439-442. DOI: 10.1007/BF00272777
- Mizutani T., Liu X.J., Tashiro Y., Miyazaki S., Shimazaki K. Plant regeneration and cell fusion of protoplasts from lettuce cultivars and related wild species in Japan. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Saga University*. 1989;67:109-118.
- Nishio T., Sato T., Mori K., Takayanagi K. Simple and efficient protoplast culture procedure of lettuce, *Lactuca sativa* L. *Japanese Journal of Breeding*. 1988;38(2):165-171.
- Park J., Choi S., Park S., Yoon J., Park A.Y., Choe S. DNA-free genome editing via ribonucleoprotein (RNP) delivery of CRISPR/Cas in lettuce. *Methods in Molecular Biology*. 2019;1917:337-354. DOI: 10.1007/978-1-4939-8991-1_25
- Pileggi M., Mielniczki Pereira A.A., dos Santos Silva J., Pileggi S.A.V., Verma D.P.S., Delauney A.J. et al. An improved method for transformation of lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2001;44(2):191-196. DOI: 10.1590/S1516-89132001000200013
- Porcel R., Aroca R., Azcón R., Ruiz-Lozano J.M. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology*. 2006;60(3):389-404. DOI: 10.1007/s11103-005-4210-y
- Samko O.V., Snigireva A.V. The use of somatic hybridization technology in plant breeding (Ispolzovaniye tekhnologii somaticheskoy gibrizatsii v selektsii rasteniy). *Amurskiy nauchny vestnik = Amur Scientific Bulletin*. 2009;(1):233-239. [in Russian] (Самко О.В., Снигирева А.В. Использование технологии соматической гибридизации в селекции растений. *Амурский научный вестник*. 2009;(1):233-239).
- Sharma S., Gautam N., Thakur A.K., Srivastava D.K. Transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) harboring chitinase gene expressed resistance against a devastating fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. *International Journal of Plant Research*. 2022;36(2):1265-1274. DOI: 10.1007/s42535-022-00519-8
- Shmykova N.A., Suprunova T.P., Pivovarov V.F. Biotechnologies and molecular methods in vegetable crop breeding (to 95th anniversary of VNISSOK). *Agricultural Biology*. 2015;50(5):561-570. [in Russian] (Шмыкова Н.А., Супрунова Т.П., Пивоваров В.Ф. Биотехнологические и молекулярно-генетические методы в селекции овощных культур (к 95-летию ВНИССОК). *Сельскохозяйственная биология*. 2015;50(5):561-570). DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.561rus
- Siddiqui M.R. Somatic hybridization via protoplasts fusion in *Lactuca sativa* (Lettuce) and it's fused product response to culture media. *Journal of Agricultural Research*. 2014;52(1):1-9.
- Singh R.J. (ed.). Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Vol. 3. Vegetable Crops. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006. DOI: 10.1201/9781420009569
- Son B.H., Park C.G., Khakurel D., Hwang J., Kim W.Y., Jeon B.G. et al. Fertile plant regeneration from protoplasts of the Korean lettuce cultivar "Cheongchima" (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agriculture and Life Science*. 2022;56(5):45-50. DOI: 10.14397/jals.2022.56.5.45
- Song D., Han Q., Dong Z., He Z. Genetic transformation of lettuce (*Lactuca sativa*): A review. *African Journal of Biotechnology*. 2014;13(16):1686-1693. DOI: 10.5897/AJB2014.13651
- State Register for Selection Achievements Admitted for Usage: [website]. [in Russian] (Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию: [сайт]). URL: <https://gossortrf.ru> [дата обращения: 06.02.2024].
- Torres A.C., Cantliffe D.J., Laughner B., Bieniek M., Nagata R., Ashraf M. et al. Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993;34:279-285. DOI: 10.1007/bf00029717
- Uwimana B., D'Andrea L., Felber F., Hooftman D.A.P., Den Nijs H.C.M., Smulders M.J.M. et al. A Bayesian analysis of gene flow from crops to their wild relatives: cultivated (*Lactuca sativa* L.) and prickly lettuce (*L. serriola* L.) and the recent expansion of *L. serriola* in Europe. *Molecular Ecology*. 2012a;21(11):2640-2654. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05489.x
- Uwimana B., Smulders M.J.M., Hooftman D.A.P., Hartman Y., van Tienderen P.H., Jansen J. et al. Hybridization between crops and wild relatives: the contribution of cultivated lettuce to the vigour of crop-wild hybrids under drought, salinity and nutrient deficiency conditions. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012b;125(6):1097-1111. DOI: 10.1007/s00122-012-1897-4
- Wei T., van Treuren R., Liu X., Zhang Z., Chen J., Liu Y. et al. Whole-genome resequencing of 445 *Lactuca* accessions reveals the domestication history of cultivated lettuce. *Nature Genetics*. 2021;53(5):752-760. DOI: 10.1038/s41588-021-00831-0
- Wei Z., Zhu S.X., Van Den Berg R.G., Bakker F.T., Schranz M.E. Phylogenetic relationships within *Lactuca* L. (Asteraceae), including African species, based on chloroplast DNA sequence comparisons. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2017;64(1):55-71. DOI: 10.1007/s10722-015-0332-5
- Woo J.W., Kim J., Kwon S.I., Corvalán C., Cho S.W., Kim H. et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*. 2015;33(11):1162-1164. DOI: 10.1038/nbt.3389
- Wroblewski T., Tomczak A., Michelmore R. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*. 2005;3(2):259-273. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x
- Zohary D. The wild genetic resources of cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Euphytica*. 1991;53(1):31-35. DOI: 10.1007/BF00032029

Информация об авторах

Наталья Андреевна Загнухина, и. о. младшего научного сотрудника, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, nzagnumhina97@gmail.com, <http://orcid.org/0009-0000-7079-3278>

Анастасия Борисовна Курина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, a.kurina@vir.nw.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3197-4751>

Information about the authors

Natalia A. Zagnukhina, Acting Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, nzagnumhina97@gmail.com, <http://orcid.org/0009-0000-7079-3278>

Anastasia B. Kurina, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Acting Head of a Laboratory, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, a.kurina@vir.nw.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3197-4751>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 28.02.2024; одобрена после рецензирования 13.08.2024; принята к публикации 04.09.2024.
The article was submitted on 28.02.2024; approved after reviewing on 13.08.2024; accepted for publication on 04.09.2024.