

УДК 581.143.6

ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ И КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ У СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА УКРАИНСКОЙ И БЕЛОРУССКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Е.Н. ШИША,¹ А.И. ЕМЕЦ,¹ Е.В. ГУЗЕНКО,² В.А. ЛЕМЕШ,² Н.А. КАРТЕЛЬ,² Я.Б. БЛЮМ¹

¹Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины»

04123 Киев, ул. Осиповского, 2А

²Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси

220072 Минск, ул. Академическая, 27

Представлены результаты изучения факторов, влияющих на процессы регенерации побегов из сегментов гипокотилей и их укоренения у ряда сортов льна-долгунца украинской и белорусской селекции (Вручий, Дашковский, Зоря 87, К-65, Нива, Рушнычок, Свитанок, Томский 16, Украинский 3). Установлены оптимальные соотношения концентраций фитогормонов БАП и НУК в питательной среде, индуцирующих эффективное побегообразование у различных генотипов льна. Подобран состав среды для укоренения образовавшихся *in vitro* побегов. Определены сорта, обладающие наивысшим регенерационным потенциалом.

Ключевые слова: *Linum usitatissimum* L., лен-долгунец, культура *in vitro*, генотип, гипокотиль, фитогормоны, регенерация побегов, корнеобразование.

Лен культурный — однолетнее двудольное растение. Различают пять групп культурного льна: лен-долгунец, лен-межеумок, лен-кудряш, крупносеменной и стелющийся. Наибольшее значение имеют первые три группы, при этом ведущую роль в решении многих народно-хозяйственных задач играет лен-долгунец, поскольку его биологический потенциал позволяет получать до 2 т натурального высококачественного волокна с 1 га [4]. Льняное волокно является одним из самых крепких растительных волокон. Степень полимеризации целлюлозы льняного волокна в 2—3 раза выше, чем хлопка, поэтому льняное волокно гораздо прочнее на разрыв, более устойчиво к воздействию света и высоких температур. Лен высокогигроскопичен, обладает хорошей электропроводностью, которая почти на 20 % выше, чем у хлопка [4]. Наличие (до 27 %) в волокне спутников целлюлозы увеличивает его антисептические, противогнилостные и светостойкие свойства [4]. В связи с этим интерес к производству льна-долгунца не ослабевает ни в нашей стране, ни в странах ближнего и дальнего зарубежья, в частности Беларуси и России, во многих странах Запада.

Наряду с этим к перспективным сортам льна-долгунца предъявляются все более жесткие требования. Прежде всего новые сорта должны быть высокопродуктивными по волокну, иметь более высокое качество волокна, обладать устойчивостью к полеганию, болезням и т.д. Эти задачи решаются как методами традиционной селекции, так и биотехно-

логическими методами культивирования клеток и тканей *in vitro*. Последние открывают возможности получения в самые сжатые сроки качественно новых, улучшенных и более конкурентоспособных сортов как в результате отбора соматоклональных вариантов, так и путем введения в их геном экзогенной ДНК с заданными свойствами. Для осуществления работ в данном направлении необходима прежде всего разработка эффективных методик регенерации и укоренения различных генотипов льна в условиях *in vitro*.

Таким образом, с учетом вышеизложенного, целью наших исследований было изучение влияния факторов культивирования и состава питательных сред на эффективность регенерации, роста и развития, а также укоренения полученных в условиях *in vitro* побегов ряда сортов льна-долгунца белорусской и украинской селекции с последующей возможностью применения разработанных методик при создании генетически модифицированных растений с ценными хозяйственными признаками.

Методика

В работе использованы 5–6-суточные асептические проростки семян льна-долгунца. Семена белорусских сортов (Дашковский, К-65, Нива) любезно предоставлены Институтом генетики и цитологии НАН Беларуси, украинских сортов (Вручий, Зоря 87, Рушнычок, Свитанок, Томский 16, Украинский 3) — Институтом лубяных культур НААН Украины.

Семена стерилизовали в течение 1 мин в 70 %-м этаноле, затем 12 мин — в 25 %-м растворе коммерческой «Белизны» с добавлением 2 капель детергента Tween-80 для лучшей смачиваемости семян. Затем их промывали 3 раза по 30 с и 2 раза по 5 мин в стерильной дистиллированной воде и помещали на предложенную нами среду МС-ЛС (таблица). В качестве эксплантатов для инициации образования побегов использовали сегменты гипокотилей, которые высаживали на шесть вариантов разработанных нами сред: МС-ЛР1, МС-ЛР-2, МС-ЛР3, МС-ЛР4,

Состав сред для культуры *in vitro* ряда сортов льна-долгунца

Среда	Состав							
	Соли МС	Витамины МС	Сахара, г/л	Мезоинозит, г/л	МЭС, г/л	Фитогормоны, мг/л		рН среды
						БАП	НУК	
МС-ЛС	1/2	—	12	0,2	0,25	—	—	5,8–6,2
МС-ЛР1	1	+	20	0,2	0,25	1	0,05	5,8
МС-ЛР2	1	+	20	0,2	0,25	1	0,1	5,8
МС-ЛР3	1	+	20	0,2	0,25	2	0,05	5,8
МС-ЛР4	1	+	20	0,2	0,25	2	0,1	5,8
МС-ЛР5	1	+	20	0,2	0,25	3	0,05	5,8
МС-ЛР6	1	+	20	0,2	0,25	3	0,1	5,8
МС-ЛП	1	+	10	0,2	0,25	—	—	5,8

Примечание. МС-ЛС — среда для проращивания семян; МС-ЛР(1–6) — варианты сред для регенерации побегов из сегментов гипокотилей льна; МС-ЛП — среда для роста регенерировавших побегов льна и их укоренения; МЭС — 2-(морфолин)-этансульфоновая кислота.

МС-ЛР5, МС-ЛР6, в состав которых входили соли и витамины МС-среды [19] (см. таблицу). Эксплантаты инкубировали при 22–24 °С и 16-часовом фотопериоде. Через каждые три недели (длительность одного пассажа) эксплантаты переносили на свежеприготовленные среды.

Для оценки результатов использовали не менее 30 эксплантатов каждого сорта с трехкратным повторением.

Образовавшиеся побеги впоследствии отделяли и переносили на среду МС-ЛП, состав которой был разработан нами, для роста и развития растений (см. таблицу). Морфогенетический потенциал определяли через 3 недели после начала культивирования исходных эксплантатов как отношение количества регенерирующих эксплантатов к общему количеству высаженных. Эффективность регенерации оценивали через 5 недель после начала культивирования эксплантатов на различных вариантах сред как отношение количества полученных побегов (более 5 мм длиной) к общему количеству высаженных эксплантатов. Возможность укоренения полученных регенерантов изучали на среде МС-ЛП с добавлением и без добавления нафтилуксусной кислоты (НУК). Для оценки эффективности укоренения использовали по 30 побегов каждого сорта в трехкратном повторении. Статистическая обработка полученных данных проведена согласно стандартным методикам.

Результаты и обсуждение

Культура клеток различных видов растений, в том числе и льна, характеризуется большой морфофизиологической и генетической гетерогенностью, которая может зависеть как от типа ткани эксплантата, так и от состава питательной среды, а также от способа культивирования [2, 8, 9, 11, 12, 20]. Для получения множественных побегов льна-долгунца заданных сортов в условиях *in vitro* использованы сегменты гипокотилей 5–6-суточных проростков, которые по сообщениям ряда авторов являются наиболее подходящими эксплантатами для индукции регенерации побегов [1, 6, 13, 23, 25]. Всхожесть семян всех сортов в нашей работе варьировала от 80 при рН 5,8 до 99 % при рН 6,0–6,2. Для изучения регенерационного потенциала льна-долгунца сортов Дашковский, К-65, Нива, Вручий, Зоря 87, Рушнычок, Свитанок, Томский 16 и Украинский 3 использовали питательные среды, которые отличались соотношением бензиламинопурина (БАП) и НУК (см. таблицу).

Ранее мы уже изучали регенерационную способность 12 сортов льна-долгунца, обладающих разной устойчивостью к полеганию [1]. В этих опытах для индукции побегов льна также использовали комбинацию БАП и НУК, но только в одном варианте: соответственно 1,0 и 0,05 мг/л. В целом, как свидетельствуют результаты наших предыдущих исследований, среда с БАП и НУК оказалась самой эффективной для регенерации побегов льна-долгунца. Наибольшая частота регенерации была у сортов Светоч, Могилевский 2, Л 1120 и Былинка. Отмечено [1], что сорт Томский 16 обладает наименьшей регенерационной способностью, что не совпадает с полученными нами в представленной работе данным (рис. 1, 2). В то же время мы выяснили, что незначительные изменения в составе среды способны влиять на морфогенетическую реакцию отдельных генотипов. Предложенные нами среды (см. таблицу) для индукции побегов из сегментов гипокотилей несколько отличались от среды МС-БН, разработанной ранее: к стандартному набору солей и ви-

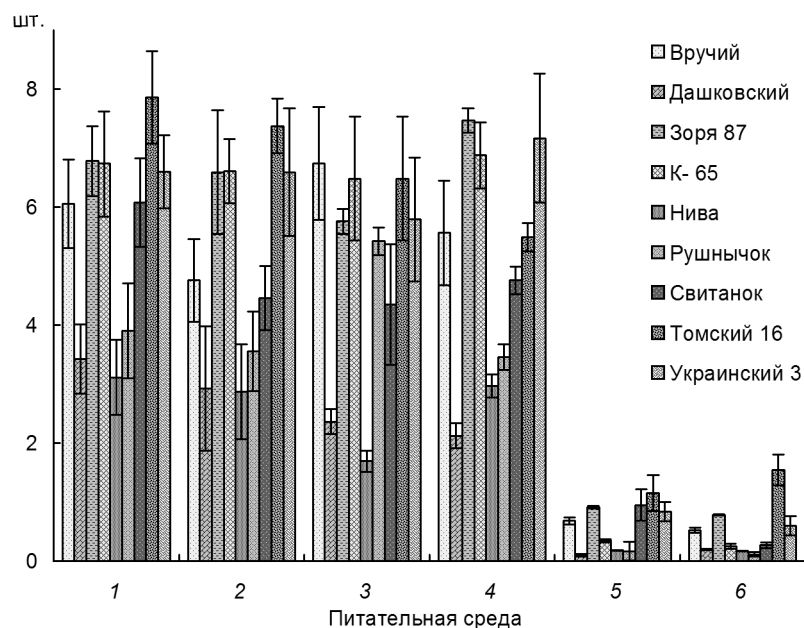


Рис. 1. Влияние концентрации регуляторов роста в питательной среде на эффективность регенерации побегов. Здесь и на рис. 2:

1 – МС-ЛР1; 2 – МС-ЛР2; 3 – МС-ЛР3; 4 – МС-ЛР4; 5 – МС-ЛР5; 6 – МС-ЛР6

таминов среды МС было добавлено 0,2 г/л мезоинозита, 0,25 г/л МЭС, а содержание сахарозы уменьшено с 30 до 20 г/л [1].

В экспериментах сегменты гипокотилей длиной 4–5 мм помещали на среды для регенерации побегов, которые различались, как указывалось выше, исключительно соотношением БАП и НУК (см. таблицу). Через 1 неделю культивирования на всех вариантах сред отмечено образование первичного темно-зеленого каллуса на местах ранения эксплантатов всех исследуемых сортов. В дальнейшем каллус наиболее интенсивно рос на двух вариантах сред, содержащих 3 мг/л БАП в комбинации с 0,1 мг/л НУК и 3 мг/л БАП с 0,05 мг/л НУК. При этом на средах, со-

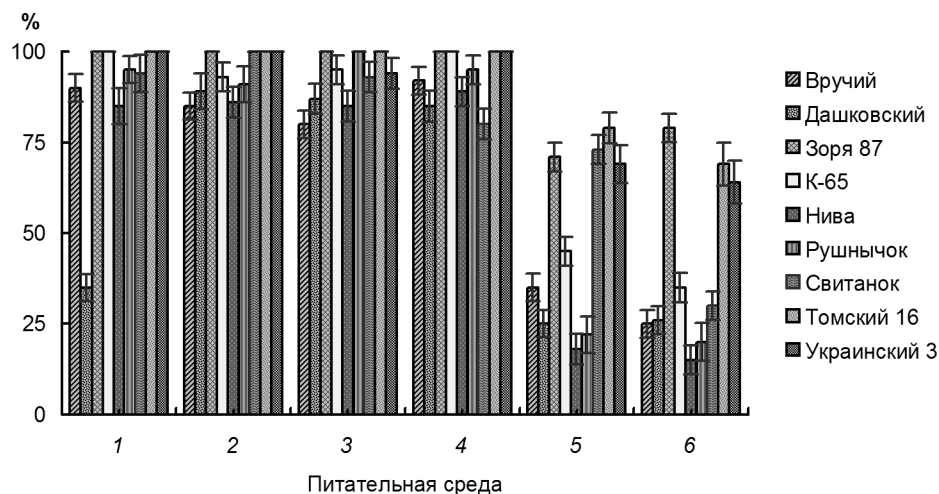


Рис. 2. Влияние концентрации (%) регуляторов роста в питательной среде на частоту регенерации побегов

державших 1 или 2 мг/л БАП в комбинации с 0,05 или 0,1 мг/л НУК, рост каллюса к концу 3-й недели культивирования замедлялся, но при этом наблюдалось интенсивное побегообразование, особенно у сортов Вручий, Зоря 87, К-65, Свитанок, Украинский 3 и Томский 16.

Для других исследуемых сортов также отмечен более интенсивный процесс регенерации при пониженных концентрациях БАП, а при содержании 3 мг/л этого фитогормона в среде интенсивнее шел процесс каллюсообразования (см. рис. 1). Максимальная частота регенерации побегов зафиксирована у сортов Вручий, Зоря 87, К-65, Томский 16, Украинский 3 (см. рис. 2).

Высокая эффективность регенерации — до 7–8 побегов на эксплантат через 5 недель культивирования зарегистрирована у сортов Зоря 87, К-65, Томский 16, Украинский 3. Для сорта Томский 16 наибольшее количество побегов получено на среде, содержащей 1 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК. Для других сортов высокую эффективность регенерации также наблюдали в основном на среде, содержащей 1 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК, и на среде, содержащей 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК (см. рис. 1).

Известно, что такой углевод, как сахароза, обычно входит в состав любой питательной среды для индукции морфогенеза растительных тканей [2, 17, 21, 24], в том числе и льна-долгунца [9, 15]. В литературе имеются данные о влиянии различных концентраций сахарозы на рост и развитие побегов из культуры пыльников льна-долгунца [10]. Отмечено, что отсутствие сахарозы приводит к гибели всех побегов в течение 4 недель. Наибольшее количество выживших и хорошо развитых за это же время побегов наблюдалось при наличии 5 г/л (48 %) и 10 г/л (88 %) сахарозы. На среде, содержащей 30 г/л, сахарозы, выживала незначительная часть побегов (8 %). Другие авторы приводят данные, что снижение концентрации сахарозы с 30 до 10 г/л способствует росту и развитию побегов также других сельскохозяйственных культур, например люцерны, побеги которой были регенерированы из клеток каллюсных культур [22]. Вероятнее всего сахароза как осмотический регулятор в большей степени нужна в период удлинения побегов, чем при их инициации [7], когда необходимо уменьшать содержание этого компонента в средах для роста растений. Повышенный уровень сахарозы может привести к деградации хлорофилла, что, в свою очередь, повлечет гибель регенерировавших побегов. О значительном влиянии концентрации сахарозы на качество побегов у льна указано и в других публикациях [16].

Суммировав данные многих исследований относительно содержания сахарозы в средах для инициации образования побегов из эксплантатов различных типов тканей льна-долгунца и их последующего роста, развития и укоренения, можно предположить, что среды для регенерации должны содержать не более 20 г/л этого компонента. Отобранные побеги предложено пересаживать на среды с пониженным до 1 % содержанием сахарозы, так как при этой концентрации они хорошо растут и развиваются, у многих сортов достаточно хорошо проходит процесс укоренения. На рис. 3 приведены данные по укоренению побегов на среде МС-ЛП. Как видим, концентрация НУК 0,1 мг/л не оказывает особого влияния на укоренение, скорее даже отрицательно влияет на процесс ризогенеза, о чем сообщали и другие авторы [3]. Нами отмечено, что наилучшей ризогенной способностью обладали побеги сортов Томский 16, К-65, Украинский 3, наихудшей — сортов Зоря 87 и Дашковский. В то

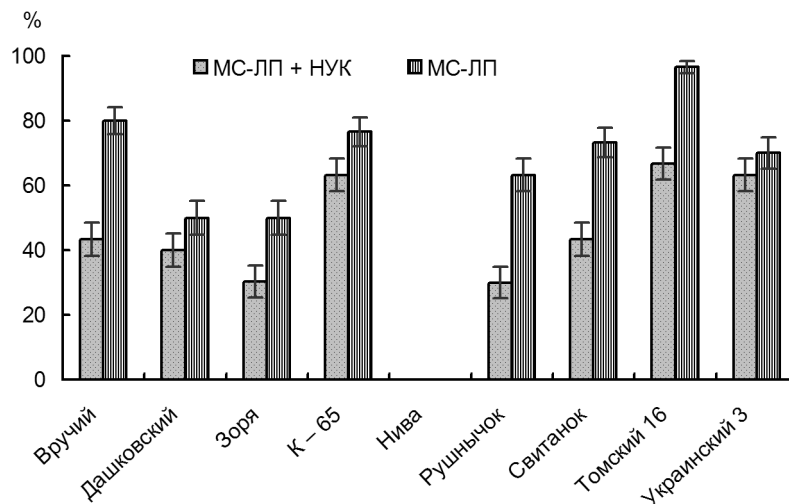


Рис. 3. Частота укоренения (%) отобранных побегов разных сортов льна-долгунца на среде МС-ЛП с добавлением 0,1 мг/л НУК и без ее добавления

же время регенеранты сорта Нива на предложенной нами среде укоренить не удалось (см. рис. 3). Следует отметить, что наши данные относительно способности к ризогенезу сортов К-65 и Дашковский согласуются с данными других исследователей [5].

Известно, что условия освещения способны влиять на рост и развитие изолированных тканей и растений [14, 18]. Например, сильное солнечное освещение в естественных условиях произрастания может вызывать ветвление стебля, что впоследствии приводит к значительному снижению качества волокна [4]. Мы установили, что размещение пробирок с растениями льна-долгунца в местах наибольшего освещения на полках термальной комнаты приводило к усиленному ветвлению стеблей, тогда как при рассеянном освещении формировались прочные неразветвленные стебли.

Таким образом, полученные нами результаты по подбору сред для регенерации, роста, развития и укоренения побегов льна в условиях *in vitro* подтвердили зависимость этих процессов от генотипа исходного материала. Подобранные составы сред для регенерации и укоренения побегов льна в сочетании с другими условиями культивирования, например с интенсивностью освещения, являются достаточно эффективными для ряда изученных сортов, таких как Томский 16, Украинский 3, К-65. Для хорошо регенерирующего сорта Зоря 87 необходимо дополнительно оптимизировать процесс корнеобразования. Подобранные условия культивирования, состав сред для эффективной регенерации побегов и их укоренения являются важной предпосылкой для дальнейшего успешного проведения работ по генетической трансформации растений льна-долгунца.

Работа выполнена при частичной поддержке государственного фонда фундаментальных исследований Украины № 14.4/023 (2009—2010).

1. Баер О.А., Баер Г.Я., Емец А.И., Блюм Я.Б. Введение в культуру *in vitro* и регенерационная способность сортов льна-долгунца с различной устойчивостью к полеганию // Физиология и биохимия культ. растений. — 2004. — 36, № 1. — С. 48—54.

2. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. — К.: Наук. думка, 2005. — 270 с.
3. Орловская О.А., Сакович В.И., Лемеш В.А., Хотылева Л.В. Особенности каллусогенеза и органогенеза межсортовых гибридов льна F₁ (*Linum usitatissimum* L.) // Докл. АН Беларуси. — 2008. — 52, № 1. — С. 88—91.
4. Пашин Е.Л., Пашина Л.В. Агропромышленные технологии получения льна. Ч. 1. Сельскохозяйственное производство: Учебное пособие. — Кострома: КГТУ, 2001. — 116 с.
5. Титок В.В., Кубрак С.В., Рагдугина Г.Н. и др. Получение генетически модифицированных растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) с использованием гена бактериальной эндо-1,4 глюканазы // Докл. АН Беларуси. — 2008. — 52, № 3. — С. 77—81.
6. Bretagne B., Chupeau M.-C., Chupeau Y., Fouilloux G. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source // Plant Cell Rep. — 1994. — 14. — P. 120—124.
7. Brown D.C.W., Leung D.W.M., Torpe T.A. Osmotic requirements for shoot formation in tobacco callus // Physiol. plant. — 1979. — 46. — P. 36—41.
8. Chen Y., Dribnenki P. Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture // Plant Cell Rep. — 2002. — 21. — P. 204—207.
9. Chen Y., Kenaschuk E., Dribnenki P. High frequency of plant regeneration from anther culture in flax, *Linum usitatissimum* L. // Plant Breed. — 1998. — 117. — P. 463—467.
10. Chen Y., Lin Sh., Duguid S. et al. Effect of sucrose concentration on elongation of shoots from flax anther culture // Plant Cell, Tissue, Organ. Cult. — 2003. — 72. — P. 181—183.
11. Cunha A., Fernandes-Ferreira M. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) // Plant Physiol. — 1999. — 155. — P. 591—597.
12. Cunha A., Fernandes-Ferreira M. Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax // Plant Cell, Tissue, Organ. Cult. — 1996. — 47. — P. 1—8.
13. Dedicova B., Hricjva A., Samaj J. et al. Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments // J. Plant Physiol. — 2000. — 157. — P. 327—334.
14. George E.F. Plant Propagation by Tissue Culture. The Technology. — 2-nd ed. — Exegetis Limited, 1993. — Pt. 1. — 574 p.
15. Kaul V., Williams E.G. Multiple shoot induction in vitro from the hypocotyls of germinating embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.) // Plant Physiol. — 1987. — 131. — P. 441—448.
16. Millam S., Davidson D., Powell W. The use of flax (*Linum usitatissimum* L.) as a model system for studies on organogenesis in vitro: the effect of different carbohydrates // Plant Cell, Tissue, Organ. Cult. — 1992. — 28. — P. 163—166.
17. Mukherjee S.K., Rathinasabapathi B., Gupta N. Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. // Ibid. — 1991. — 25. — P. 13—16.
18. Murashige T. Plant propagation through tissue cultures // Annu. Rev. Plant Physiol. — 1974. — 25. — P. 135—166.
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. plant. — 1962. — 15. — P. 473—497.
20. Nichterlein K., Umbach H., Friedt W. Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // Euphytica. — 1991. — 15. — P. 13—15.
21. Sorvari S., Schieder O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media // Plant Breed. — 1987. — 99. — P. 164—171.
22. Stavarek S.J., Croughan T.P., Rains D.W. Regeneration of plants from longterm cultures of alfalfa cells // Plant Sci. Lett. — 1980. — 19. — P. 253—261.
23. Tejavathi D.H., Sita G.L., Sunita A.T. Somatic embryogenesis in flax // Plant Cell, Tissue, Organ. Cult. — 2000. — 63. — P. 155—159.
24. Tremblay L., Tremblay F.M. Maturation of black spruce somatic embryos: sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium // Ibid. — 1995. — 42. — P. 39—46.
25. Yildiz M., Er C. Increasing the injured area on hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) leads to high frequency callus-based shoot regeneration // Turk. J. Biol. — 2002. — 26. — P. 95—98.

Получено 19.06.2009

ВИВЧЕННЯ РЕГЕНЕРАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ ТА КОРЕНЕУТВОРЕННЯ У СОРТІВ
ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ УКРАЇНСЬКОЇ І БІЛОРУСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

О.М. Шиша,¹ А.І. Ємець,¹ О.В. Гузенко,² В.О. Лемеш,² М.О. Картель,² Я.Б. Блюм¹

¹Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ

²Інститут генетики та цитології Національної академії наук Білорусі, Мінськ

Наведено результати вивчення чинників, які впливають на процеси регенерації пагонів із сегментів гіпокотилів та їх укорінення в низки сортів льону-довгунця української та білоруської селекції (Вручий, Дашковський, Зоря 87, К-65, Нива, Рушничок, Світанок, Томський 16, Український 3). Встановлено оптимальні співвідношення концентрацій фітогормонів БАП і НУК у поживному середовищі, які індукують ефективне пагоноутворення у різних генотипів льону. Підібрано склад середовища для вкорінення пагонів, що утворилися *in vitro*. Визначено сорти з найвищим регенераційним потенціалом.

STUDY OF THE REGENERATION CAPABILITY AND ROOT FORMATION IN
UKRAINIAN AND BELARUSIAN FLAX CULTIVARS

E.N. Shysha,¹ A.I. Yemets,¹ E.V. Guzenko,² V.A. Lemesh,² N.A. Kartel,² Ya.B. Blume¹

¹Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine
2A Osipovskogo St., Kyiv, 04123, Ukraine

²Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya St., Minsk, 220072, Belarus

The results of testing the factors influencing on shoot regeneration and root formation from hypocotyl explants of some Ukrainian and Belarusian flax cultivars (Vruchiy, Dashkovskiy, Zorya 87, K-65, Niva, Rushnychok, Svitanok, Tomskiy 16, Ukrainskiy 3) have been presented. The optimal ratios of phytohormones (BAP and NAA) concentrations in nutrient medium that induce effective shoot formation in different flax genotypes have been found. The composition of a medium for rooting of regenerated *in vitro* shoots has been elaborated. The cultivars with the highest regeneration potential have been detected.

Key words: *Linum usitatissimum* L., flax, culture *in vitro*, genotype, hypocotyl, phytohormone, shoot regeneration, root formation.