ISSN 1992-4917. ВІСНИК ХАРКІВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО АГРАРНОГО УНІВЕРСИТЕТУ. СЕРІЯ БІОЛОГІЯ
THE BULLETIN OF KHARKIV NATIONAL AGRARIAN UNIVERSITY. SERIES BIOLOGY. 2019. 2 (47): 92-100

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 633.521:58.085

ВПЛИВ 6-БЕНЗИЛАМІНОПУРИНУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ КАЛЮСОГЕНЕЗУ І ОРГАНОГЕНЕЗУ *LINUM USITATISSIMUM* L. В УМОВАХ *IN VITRO*

© 2019 р. С. В. Міщенко

Інститут луб'яних культур
Національної академії аграрних наук України
(Глухів, Сумська обл., Україна)

Linum usitatissimum L. convar. elongatum (сорт Глінум) значною мірою здатний до утворення калюсу на гіпокотильних сегментах за умови культивування на живильному середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням 30 г/л сахарози, фотоперіоді 16 год, при відносній вологості повітря 60-80%, температурі повітря 22-24°С і під впливом: 1) лише ауксинів, 2) лише цитокінінів, 3) комбінації ауксинів і цитокінінів екзогенного походження. Найвища частота органогенезу спостерігалась під впливом 1,0 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП), 0,3 мг/л кінетину (тобто лише цитокінінів), поєднання 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) і БАП, індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) і БАП. Проведені дослідження із залученням порівняно великого варіаційного ряду концентрацій БАП свідчать про те, що за наявності ауксину (0,05 мг/л НОК в усіх варіантах) ефективність калюсогенезу і регенерації пагонів була вищою. Разом з тим, застосування лише БАП може бути цілком самодостатнім прийомом для індукції калюсо- і органогенезу. Для досліджуваного виду в цілому і даного генотипу зокрема достатнім для органогенезу є синтез ауксинів ендогенного походження за наявності цитокінінів екзогенного походження. Збільшення концентрації БАП до 3,0 мг/л пригнічувало ріст калюсу і регенерацію пагонів. Оптимальні концентрації фітогормону можна виразити нерівністю $1,0 \leq$ БАП $\leq 1,75$, а за умови додавання до середовища 0,05 мг/л НОК нерівністю $0,5 \leq$ БАП $\leq 2,0$. Найбільша результативність калюсогенезу і органогенезу виявлена у варіантах: 1) 1,5 мг/л БАП, 2) 1,25 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК. Реакція *L. usitatissimum* L. convar. elongatum на вплив фітогормонів відрізнялася від такої *L. usitatissimum* L. convar. mediterraneum.

Ключові слова: *Linum usitatissimum, in vitro, фітогормони, 6-бензиламінопурин, калюс, органогенез*

DOI: https://doi.org/10.35550/vbio2019.02.092

Льон звичайний (*Linum usitatissimum* L.) – важлива сільськогосподарська культура комплексного використання. Здебільшого його вирощують для отримання натурального волокна, що може використовуватися у текстильній промисловості, насіння, харчової або технічної олії. Незважаючи на те, що льон культивують уже кілька тисячоліть, він і нині залишається предметом наукових пошуків у галузі філогенезу і таксономії, генетики і селекції, технології вирощування тощо. Вид льон звичайний в останні роки перебуває в центрі багатьох фундаментальних і прикладних біотехнологічних досліджень, оскільки культивування рослинних клітин і тканин *in vitro* супроводжується виникненням значного цитоморфологічного і генетичного різноманіття як у калюсних тканинах, так і у рослин-регенерантів, що створює основу для їх подальшого використання, перш за все, у селекції.

Обґрунтовуються стратегії застосування явища регенерації рослинних клітин і тканин льону, методів соматичного ембріогенезу, культури ізольованих протопластів, клітинних су-

Адреса для кореспонденції: Міщенко Сергій Володимирович, Інститут луб'яних культур НААН України, вул. Терещенків, 45, м. Глухів, Сумська обл., 41400, Україна; e-mail: serhii-mishchenko@ukr.net

спензій тощо. Важливою галуззю досліджень є використання у селекційних програмах культури пиляків та подвоєних гаплоїдів, розглядаються нові технології перенесення і експресії генів за допомогою генетичної трансформації, що свідчить про перспективність даної сільськогосподарської культури (Поляков, 2000; Evtimova et al., 2005; Millam et al., 2005).

Для індукції соматичного калюсогенезу і органогенезу у льону в умовах *in vitro* описано успішний досвід використання 0,005 мг/л 2,4-Д і 0,1 мг/л бензиладеніну (Siegień et al., 2013), а також тідіазурону з метою утворення пагонів на гіпокотилі (Mundhara, Rashid, 2006).

Було встановлено, що ефективність органогенезу залежить не лише від визначення оптимальних концентрацій і комбінацій ауксинів і цитокінінів у середовищі, а й від попередньої підготовки експлантів (гіпокотильних сегментів) та конкуренції між ними. Ефективність індукції формування калюсу та органогенезу були вищими, коли гіпокотильні сегменти перед розміщенням на живильному гормональному середовищі занурювали у стерильну дистильовану воду і злегка струшували протягом 20 хв, порівняно з варіантом, де їх відразу поміщали на середовище. Висловлено припущення, що така попередня обробка пом'якшувала шар епідермісу і збільшувала його проникність, що й посилювало метаболічну активність тканин за рахунок збільшення поглинання води, елементів живлення і гормонів із середовища (Yildiz, Özgen, 2004). Різний ступінь конкуренції серед експлантів був досягнутий шляхом зміни між ними відстані у чашках Петрі. При відстані 1,0 см, порівняно з розміщенням через 2,0 см, збільшувалась кількість регенерантів та їх довжина. При зменшенні відстані до 0,5 см спостерігали явище стресу і зменшення частоти органогенезу та розмірів утворених пагонів (Yildiz et al., 2011).

Культура пиляків досить часто використовується у біотехнологічних дослідженнях. Хоча вона і є менш ефективною у регенерації рослин льону порівняно з культурою соматичних клітин, однак регенеранти, отримані саме з клітин пиляків, мають підвищену стійкість до фузаріозного в'янення (Rutkowska-Krause et al., 2003). При цьому для індукції калюсу більш ефективно застосовувати два джерела вуглеводів – 2,5% сахарозу і 2,5% глюкозу, для утворення пагонів доцільним було використання лише сахарози і у нижчій концентрації (2,0%) (Rutkowska-Krause et al., 2003). За іншими даними, найкраща регенерація пагонів була на середовищі із мальтозою, а найкраще утворення коренів спостерігали на середовищі з сахарозою (Millam et al., 1992), або ж більшу інтенсивність калюсогенезу у пиляків отримано при включенні у середовище лактози порівняно із сахарозою (Chen, Dribnenki, 2002). Однак заміна сахарози іншими вуглеводами може знижувати або повністю пригнічувати утворення пагонів.

При цьому попередня обробка рослин-донорів, генотип (сорт) льону і склад екзогенних регуляторів росту по-різному впливають на індукцію калюсоутворення в культурі пиляків. Пиляки рослин-донорів, вирощених в умовах знижених температур (14-18°С), значно збільшували калюсоутворення, порівняно з пиляками, вирощеними за вищих температур (18-22°С). Комбінації регуляторів росту і концентрації вуглеводів повинні бути вибрані окремо для кожного генотипу, зокрема, для різних сортів (зразків) прийнятні такі комбінації: 0,1 мг/л БАП і 0,2 мг/л 2,4 Д; 0,2 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК; 0,1 мг/л БАП і 0,2 мг/л ІОК. Живильне середовище доцільно доповнити 6, 9 або 12% сахарози (Burbulis et al., 2005; Burbulis, Blinstrubienė, 2011; Burbulis et al., 2012). В інших дослідженнях також наголошується, що температура культивування пиляків впливає на індукцію гаплоїдних новоутворень, а саме – кількість пиляків з калюсогенезом була більшою при температурі 28, порівняно з 33 і 6°С (Сорока, 2010).

Інший напрям досліджень – це отримання калюсної тканини із зародків (зав'язей) льону і подальша регенерація пагонів (Obert, 2005; Blinstrubienė et al., 2011; Blinstrubienė et al., 2017). При цьому частота калюсоутворення варіювала у широких межах залежно від сорту і складу середовища. Зокрема, частота утворення калюсу у п'яти чутливих сортів була в межах від 4,17 до 75,00%, тоді як у решти трьох сортів органогенез не відбувався. У більшості випадків найвища частота регенерації пагонів отримана на середовищі, доповненому 0,2 мг/л тідіазурону і 0,1 мг/л НОК. Цитологічний аналіз показав, що 21,88% рослин-регенерантів були гаплоїдами, а 78,12% регенерантів – диплоїдами або міксоплоїдами (Blinstrubienė et al., 2017).

Таким чином, технології *in vitro* для льону досить добре розроблені, однак у проаналізованих джерелах у ролі об'єкта досліджень здебільшого використано зразки, які за поширеною класифікацією (Diederrichsen, Richards, 2003) належать до *L. usitatissimum* L. convar.

mediterraneum (так званого крупнонасінного або олійного льону), а не *L. usitatissimum* L. convar. elongatum (так званого льону-довгунця), який значно відрізняється від першого різновиду за морфологічними, фізіологічними і генетичними ознаками та властивостями. Для індукції калюсогенезу і формування пагонів дослідниками, як правило, застосовуються певні співвідношення ауксинів і цитокінінів, тому виникає питання, чи здатний льон-довгунець до утворення калюсних тканин і в подальшому до регенерації пагонів на середовищах без ауксинів, а лише з цитокінінами екзогенного походження.

У зв'язку з викладеним, метою нашої роботи було вивчення впливу концентрації БАП у живильному середовищі як у поєднанні з ауксином, так і без нього, на інтенсивність калюсоутворення і органогенезу льону-довгунця, визначення оптимальної концентрації фітогормону.

МЕТОДИКА

У дослідженнях використано сорт *L. usitatissimum* L. convar. elongatum Глінум. Насіння стерилізували 3,0%-м водним розчином натрій гіпохлориту (NaOCl) з експозицією 12,5-15 хв, тричі промивали стерильною дистильованою водою. Зазначений інтервал експозиції виявився оптимальним під час відпрацювання методики, оскільки забезпечував близько 100% стерильних проростків без появи видимих морфологічних змін чи відхилень в процесах росту і розвитку. Коротша експозиція за 12,5 хв давала менший вихід стерильних проростків, а довша за 15 хв зменшувала схожість насіння та інколи викликала пригнічення росту пагонів. Насіння кожного зразка пророщували на агаризованому безгормональному живильному МС-середовищі (Murashige, Skoog, 1962) з 10 г/л сахарози. На 7-15-ту добу з проростків брали гіпокотильні сегменти довжиною 2-3 мм. Саме протягом даного проміжку часу гіпокотилі льону мали довжину, достатню для їх поділу на кілька фрагментів, і не спостерігався достовірний вплив на процеси калюсогенезу і в подальшому органогенезу. Сегменти гіпокотиля культивували на МС-середовищі з 30 г/л сахарози, доповненому ауксинами (НОК, ІОК, 2,4-Д) і цитокінінами (БАП, кінетин – КІН) з різними концентраціями і поєднаннями (табл. 1). Фотоперіод становив 16 год, відносна вологість – 60-80%, температура повітря – 22-24°С.

Обліки проводили на 35-ту добу культивування за ознаками: частота калюсогенезу (відсоток експлантів, на яких утворився калюс), маса калюсу з одного експланта, частота органогенезу (відсоток калюсів, на яких утворились пагони), кількість пагонів, що утворились (без урахування меристематичних зон і зачаткових пагонів), і висота нормально розвинених пагонів. Вибірка – не менше 30 експлантів і спостережень для кожного варіанта. Статистичну обробку даних проводили методами варіаційного і кореляційно-регресійного аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ

Льон звичайний виявився дуже чутливим до умов *in vitro*, зокрема 70-75% гіпокотильних експлантів формували калюсну тканину при культивуванні на середовищі лише з ауксинами НОК, ІОК чи 2,4-Д. При цьому частота органогенезу була незначною: 6,25 і 12,90% у варіантах з 0,5 і 1,0 мг/л ІОК відповідно, 12,50 і 12,12% у варіантах з 0,05 і 0,1 мг/л НОК відповідно і регенерація пагонів майже не відбувалась у варіантах з 2,4-Д. Також калюс добре формувався на середовищах виключно з цитокінінами БАП (1,0 і 2,0 мг/л) і КІН (0,3 мг/л). Частота калюсогенезу відповідно становила 100, 93,94 і 83,87%, а органогенезу – 93,55, 50,00 і 48,38% (табл. 1).

Поєднання ауксинів і цитокінінів (0,05 НОК і 1,0 мг/л БАП, 0,05 НОК і 0,3 мг/л КІН, 0,5 ІОК і 1,0 мг/л БАП, 0,5 ІОК і 0,3 мг/л КІН, 0,3 2,4-Д і 0,3 мг/л КІН) сприяло утворенню калюсу у 100% експлантів, у варіанті з 0,3 2,4-Д і 1,0 мг/л БАП частота калюсоутворення була дещо нижчою (96,67%). При цьому частота органогенезу мала досить суттєвий розмах варіації (від 3,12 до 96,88%). Найкращим поєднанням для ініціації утворення пагонів був варіант НОК і БАП (звичайно, в межах досліджуваних концентрацій), що і визначило вибір даних фітогормонів для проведення подальших досліджень з ширшим варіаційним рядом їх доз у середовищі. Не вдалими виявились поєднання НОК і КІН, ІОК і КІН, 2,4-Д і БАП, а також 2,4-Д і КІН.

Очевидно, що БАП є важливим фітогормоном для росту і розвитку льону, а також диференціації клітин *in vitro*, що активізує перебіг відповідних фізіологічних процесів у клітинах і тканинах, тому у подальшому було встановлено залежність інтенсивності калюсоутворення і органогенезу від концентрації БАП за наявності чи відсутності ауксину НОК.

У результаті проведених досліджень виявлено, що калюс утворювався на середовищах з БАП від 0,25 до 3,0 мг/л з високою частотою

Таблиця 1. Частота калюсоутворення і органогенезу льону залежно від співвідношення фітогормонів у живильному середовищі

Ауксини, мг/л			Цитокініни, мг/л		Частота калюсогенезу, %	Частота органогенезу, %
НОК	ІОК	2,4-Д	БАП	КІН		
0,05	–	–	–	–	71,88	12,50
0,10	–	–	–	–	69,70	12,12
–	0,50	–	–	–	71,88	6,25
–	1,00	–	–	–	74,19	12,90
–	–	0,15	–	–	75,00	3,12
–	–	0,30	–	–	75,00	0,00
–	–	–	1,00	–	100,00	93,55
–	–	–	2,00	–	93,94	50,00
–	–	–	–	0,30	83,87	48,38
–	–	–	–	0,60	25,00	12,50
0,05	–	–	1,00	–	100,00	96,88
0,05	–	–	–	0,30	100,00	6,25
–	0,50	–	1,00	–	100,00	93,55
–	0,50	–	–	0,30	100,00	3,12
–	–	0,30	1,00	–	96,67	10,00
–	–	0,30	–	0,30	100,00	15,60

Таблиця 2. Вплив концентрації БАП за умови відсутності ауксину у живильному середовищі на інтенсивність калюсоутворення і органогенезу льону

Концентрація БАП, мг/л	Інтенсивність калюсогенезу		Інтенсивність органогенезу		
	Частота калюсогенезу, %	Маса калюса з експланта, г	Частота органогенезу, %	Кількість пагонів, шт.	Висота пагонів, см
0,25	75,00	0,16 ± 0,015	12,50	2,0 ± 0,13	1,93 ± 0,080
0,50	93,75	1,98 ± 0,115	81,25	2,8 ± 0,15	1,95 ± 0,304
1,00	100,00	3,00 ± 0,157	93,55	4,0 ± 0,22	3,10 ± 0,377
1,25	100,00	2,50 ± 0,109	100,00	5,0 ± 0,11	2,88 ± 0,174
1,50	96,88	1,02 ± 0,173	93,75	3,0 ± 0,20	1,79 ± 0,228
1,75	100,00	0,80 ± 0,058	90,62	2,4 ± 0,15	1,19 ± 0,056
2,00	93,94	0,76 ± 0,048	50,00	1,6 ± 0,17	0,80 ± 0,049
2,50	90,62	0,82 ± 0,083	31,25	1,9 ± 0,25	0,84 ± 0,064
3,00	81,25	0,15 ± 0,020	3,12	1,5 ± 0,12	0,80 ± 0,049

(у 75-100% експлантів). Слід зазначити, що в межах досліджуваної вибірки частота калюсоутворення становила 100% у варіантах з 1,0, 1,25 і 1,5 мг/л БАП. Найнижча частота калюсоутворення була у варіантах з 0,25 і 3,0 мг/л даного цитокініну. Таким чином, подальше зниження концентрації (< 0,25 мг/л) чи її підвищення (> 3,0 мг/л) з метою індукції калюсогенезу є недоцільним. Найвищу масу калюсу з одного експланта виявлено у варіанті з 1,0 мг/л БАП, вона у середньому становила 3 г. Дещо нижчу інтенсивність формування калюсних тканин спостерігали у варіантах з 0,5 і 1,25 мг/л БАП, а найнижчу – у варіантах з крайніми значеннями концентрацій: 0,16 г при 0,25 мг/л БАП і 0,15 г при 3,0 мг/л БАП (табл. 2).

Частота органогенезу також залежала від концентрації БАП у живильному середовищі. У 100% випадків з калюсу формувалися пагони на середовищі, що містило 1,25 мг/л досліджуваного фітогормону. У цілому, висока інтенсивність органогенезу характерна для варіантів, де вміст БАП становив від 1,0 до 1,75 мг/л, що підтверджує аналіз ознак кількості і висоти утворених пагонів (2,4-5,0 шт. і 1,19-3,10 см відповідно). Концентрація БАП 3 мг/л не сприяла (або й пригнічувала) диференціації калюсних тканин і в подальшому появі меристематичних зон вегетативних органів льону.

Дослідження впливу різних концентрацій БАП на частоту та інтенсивність калюсо- і органогенезу за умови присутності у середовищі

Таблиця 3. Вплив концентрації БАП за умови наявності НОК у живильному середовищі на інтенсивність калюсоутворення і органогенезу льону

Фітогормони, мг/л		Інтенсивність калюсогенезу		Інтенсивність органогенезу		
НОК	БАП	Частота калюсогенезу, %	Маса калюса з експланта, г	Частота органогенезу, %	Кількість пагонів, шт.	Висота пагонів, см
0,05	0,25	92,62	0,48 ± 0,085	6,25	2,6 ± 0,18	1,66 ± 0,085
0,05	0,50	96,88	1,71 ± 0,104	87,50	2,9 ± 0,12	1,76 ± 0,172
0,05	1,00	100,0	2,22 ± 0,099	96,88	4,4 ± 0,14	1,62 ± 0,205
0,05	1,25	100,0	1,32 ± 0,081	96,88	4,4 ± 0,14	2,00 ± 0,173
0,05	1,50	100,0	1,98 ± 0,071	100,00	5,0 ± 0,19	2,02 ± 0,211
0,05	1,75	100,0	1,95 ± 0,070	93,75	3,6 ± 0,15	1,74 ± 0,112
0,05	2,00	96,88	2,82 ± 0,145	62,50	1,6 ± 0,14	1,75 ± 0,183
0,05	2,50	96,00	2,14 ± 0,076	48,00	1,6 ± 0,14	1,52 ± 0,107
0,05	3,00	93,75	0,60 ± 0,090	6,25	1,1 ± 0,07	1,58 ± 0,069

НОК з однаковою концентрацією 0,05 мг/л засвідчило, що у цілому частота утворення калюсу і появи пагонів зростає, порівняно з відповідними варіантами, в яких був лише цитокінін. Одночасно оптимальні концентрації БАП розширюються від 0,5 до 2,0 мг/л. Калюс утворився на 100% експлантів у варіантах з 1,0, 1,25, 1,5 і 1,75 мг/л БАП, а органогенез спостерігали у 100% калюсів у варіанті з 1,5 мг/л зазначеної сполуки. Низька (0,25 мг/л) або ж висока (3,0 мг/л) доза БАП за умови додавання до середовища 0,05 мг/л НОК давали низьку частоту регенерації пагонів. Вона становила лише 6,25% (табл. 3).

Ознаки маси калюсу з експланта, кількості і висоти пагонів на середовищах, які містили НОК, порівняно з середовищами без ауксину екзогенного походження, відрізнялись несуттєво. Межі їх варіювання становили 0,48-2,82 г, 1,1-5,0 шт. і 1,52-2,02 см, відповідно.

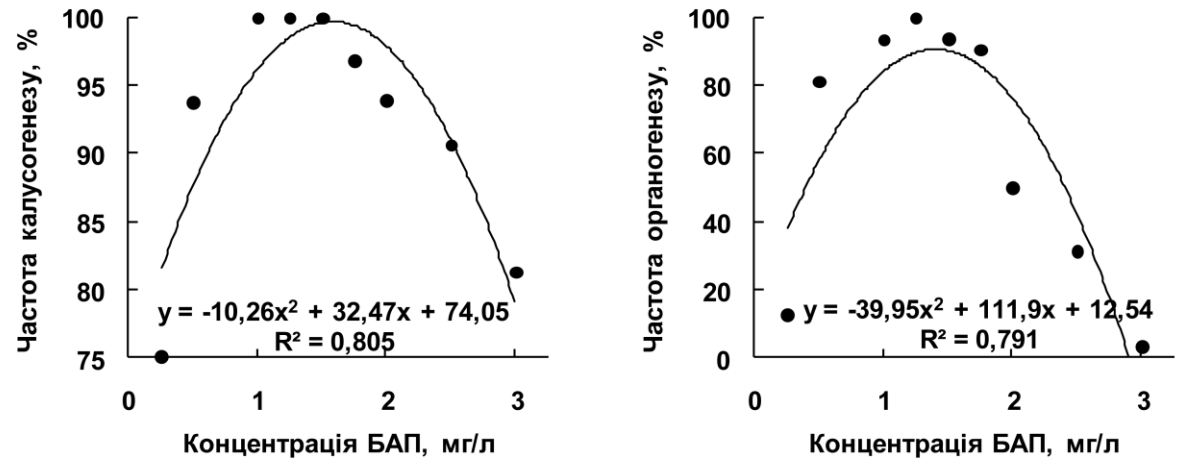
Аналіз експериментальних даних свідчить, що залежність між концентрацією БАП у живильному середовищі та інтенсивністю калюсоутворення і органогенезу є нелінійною. Можна побудувати графіки та рівняння нелінійної регресії (за типом параболи), які дозволяють прогнозувати збільшення чи зменшення частоти калюсоутворення і частоти органогенезу від зменшення чи збільшення величини вмісту фітогормону у середовищі, виділити оптимальну його концентрацію для індукції зазначених явищ і отримання сомаклонів (рисунок).

ОБГОВОРЕННЯ

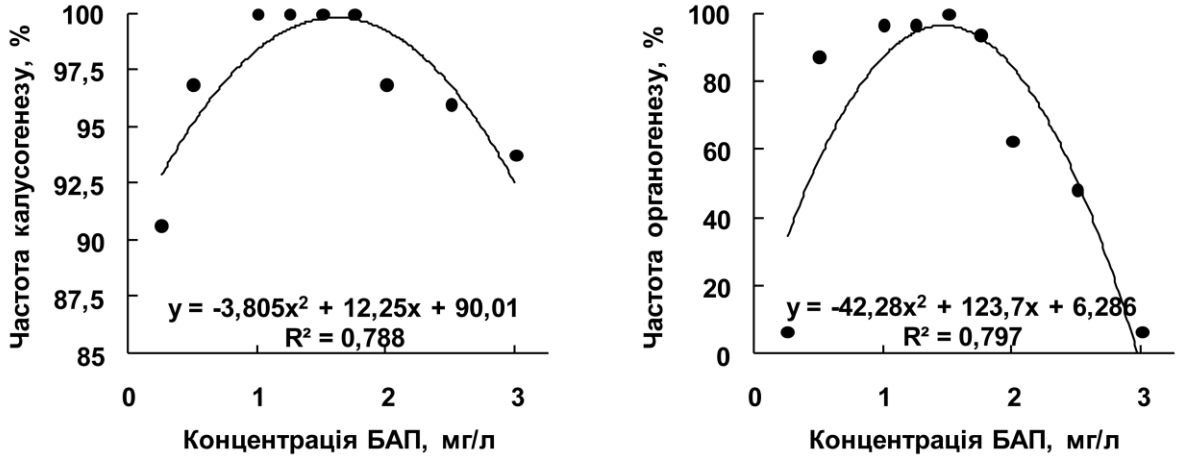
Нашими дослідженнями на прикладі сорту Глінум установлено, що *L. usitatissimum* L. convar. elongatum значною мірою здатний до утворення калюсу на гіпокотильних сегментах під впливом: 1) лише ауксинів, 2) лише цитокінінів, 3) комбінації ауксинів і цитокінінів екзогенного походження. Однак, висока частота органогенезу спостерігається під впливом цитокінінів (1,0 мг/л БАП чи 0,3 мг/л КІН), або комбінації таких фітогормонів як НОК і БАП, ІОК і БАП. У відомих нам джерелах літератури для калюсоутворення і органогенезу здебільшого рекомендують використовувати поєднання НОК і БАП (Blinstrubienė et al., 2009; Burbulis, Blinstrubienė, 2011; Seta Koselska, Skórzyńska Polit, 2017).

Проведені дослідження із залученням ширшого варіаційного ряду концентрацій БАП свідчать про те, що за наявності ауксину НОК (0,05 мг/л) ефективність калюсогенезу і регенерації пагонів була вищою. Разом з тим, застосування лише БАП може бути цілком самостійним прийомом для індукції зазначених процесів. Лише збільшення концентрації БАП до 3,0 мг/л пригнічувало ріст калюсу і регенерацію пагонів. Подібну закономірність було відзначено і в культурі клітинної суспензії (Seta Koselska, Skórzyńska Polit, 2017), коли оптимальним було додавання 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК, а висока концентрація БАП у рідкому середовищі обмежувала проліферацію клітин і зменшувала утворення біомаси. Можна припустити, що для досліджуваного виду в цілому і даного генотипу зокрема достатнім для органогенезу є синтез ауксинів ендогенного походження за наявності цитокінінів екзогенного походження, однак це питання потребує подальшого вивчення і встановлення фізіологічних механізмів відповідних процесів у рослинних клітинах і тканинах.

Оптимальні концентрації даного фітогормону можна виразити нерівністю $1,0 \leq$ БАП $\leq$



I



II

Нелінійна регресійна залежність частоти калюсоутворення і органогенезу льону від концентрації БАП у живильному середовищі.
I – за відсутності ауксину, II – за наявності НОК.

1,75, а за умови додавання до середовища 0,05 мг/л НОК нерівністю 0,5 ≤ БАП ≤ 2,0. Найбільша результативність калюсогенезу і органогенезу нами виявлена у варіантах: 1) 1,5 мг/л БАП, 2) 1,25 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК. Слід зазначити, що у літературних джерелах описані як ефективні концентрації БАП нижчі (Janowicz et al., 2012) або вищі (Blinstrubienė et al., 2009; Burbulis, Blinstrubienė, 2011) від встановлених нами 1,5 і 1,25 мг/л. Реакція *L. usitatissimum* L. convar. elongatum на вплив фітогормонів є відмінною від *L. usitatissimum* L. convar. mediterraneum.

Встановлені закономірності доцільно використовувати в селекційно-біотехнологічних дослідницьких програмах.

ЛІТЕРАТУРА

Поляков А.В. 2000. Биотехнология в селекции льна. Тверь : 180 с.

Сорока А.И. 2010. Особенности подготовки материала и культивирования in vitro пыльников льна при получении гаплоидных растений. Вісн. Запорізьк. нац. ун-ту. Біологічні науки. 2 : 13-18.

Chen Y., Dribnenki P. 2002. Effect of genotype and medium composition on flax Linum usitatissimum L. anther culture. Plant Cell Rep. 21 (3) : 204-207. doi: 10.1007/s00299-002-0500-x

Blinstrubienė A., Burbulis N., Kuprienė R. 2009. Regeneration of adventitious shoots of linseed (Linum usitatissimum L.) from hypocotyl explants. Zemdirbyste-Agriculture. 96 (3) : 168-175.

Blinstrubienė A., Burbulis N., Kuprienė R. 2011. Effect of genotype and medium composition on linseed

(Linum usitatissimum) ovary culture. Biologia. 66 (3) : 465-469. doi: 10.2478/s11756-011-0028-z

Blinstrubienė A., Burbulis N., Masienė R. 2017. Genotypic and exogenous factors affecting linseed ovary culture. Zemdirbyste-Agriculture. 2017. 104 (3) : 243-248. doi: 10.13080/z a.2017.104.031

Burbulis N., Blinstrubienė A., Sliesaravičius A., Venskutonienė E. 2005. Influence of genotype, growth regulators, sucrose level and preconditioning of donor plants on flax (Linum usitatissimum L.) anther culture. Acta Biologica Hungarica. 56 (3-4) : 323-331. o i: 10.1556/ABiol.56.2005.3 4.15

Burbulis N., Blinstrubienė A. 2011. Genotypic and exogenous factors affecting linseed (Linum usitatissimum L.) anther culture. J. Food Agricult. Environ. 9 (3-4) : 364-367. doi: 10.1234/4.2011.2285

Burbulis N., Blinstrubienė A., Masienė R., Jonytienė V. 2012. Influence of genotype, growth regulators and sucrose concentration on linseed (Linum usitatissimum L.) anther culture. J. Food, Agricult. Environ. 10 (3-4) : 764-767. doi: 10.1234/4.2012.3509

Diederrichsen A., Richards K. 2003. Taxonomy and germplasm conservation. In: Flax: The genus Linum (Ed. by A.D. Muir and N.D. Westcott). Boca Raton, USA, CRC Press : 39-42.

Evtimova M., Vlahova M., Atanassov A. 2005. Flax improvement by biotechnology means. J. Natural Fibers. 2 (2) : 17-34. doi: 10.1300/J395v02n02_02

Janowicz J., Niemann J., Wojciechowski A. 2012. The effect of growth regulators on the regeneration ability of flax (Linum usitatissimum L.) hypocotyl explants in in vitro culture. BioTechnologia. 93 (2) : 135-138. doi: 10.5114/bta.2012.46578

Millam S., Davidson D., Powell W. 1992. The use of flax (Linum usitatissimum) as a model system for studies on organogenesis in vitro: the effect of different carbohydrates. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 28 (2) : 163-166. Doi : 10.1007/BF00055512

Millam S., Obert B., Pretová A. 2005. Plant cell and biotechnology studies in Linum usitatissimum – a review. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 82 (1) : 93-103. doi: 10.1007/s11240-004-6961-6

Mundhara R., Rashid A. 2006. TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedlings of Linum, putative role of ethylene in regeneration. Plant Sci. 170 (2) : 185-190. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.06.015

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 (3) : 473-497. doi: 10.1111/j.1399 3054.1962.tb08052.x

Obert B., Bartosova Z., Pretova A. 2005. Dihaploid production in flax by anther and ovary cultures. J. Natural Fibers. 1 (3) : 1-14. doi: 10.1300/J395v01n03_01

Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J. 2003. Regeneration of flax (Linum usitatissimum L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to Fusarium oxysporum. Plant Cell Rep. 22 (2) : 110-116. doi: 10.1007/s00299 003 0662-1

Seta-Koselska A., Skórzyńska-Polit E. 2017. Optimization of in vitro culture conditions for obtaining flax (Linum usitatissimum L. cv. Modran) cell suspension culture. BioTechnologia. 98 (3) : 183-188. doi: 10.5114/bta.2017.70796

Siegień I., Adamczuk A., Wróblewska K. 2013. Light affects in vitro organogenesis of Linum usitatissimum L. and its cyanogenic potential. Acta Physiol. Plant. 35 (3) : 781-789. doi: 10.1007/s11738-012-1118-4

Yildiz M., Özgen M. 2004. The effect of a submersion pretreatment on in vitro explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (Linum usitatissimum). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 77 (1) : 111-115. Doi : 10.1023/B:TICU.0000016493.03592.c3

Yildiz M., Sağlik C., Telci C., Erkilich E.G. 2011. The effect of in vitro competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of Linum usitatissimum. Turk. J. Bot. 35 (2) : 211-218. doi: 10.3906/bot-1005-26

REFERENCES

Polyakov A.V. 2000. Biotechnology in flax breeding. Tver : 180 p.

Soroka A.I. 2010. Peculiarities of donor plant preparation and flax anther cultivation in vitro for haploid plant production. Visnyk Zaporizkogo Nationalnogo Universytetu. Biologichni Nauky. 2 : 13-18.

Chen Y., Dribnenki P. 2002. Effect of genotype and medium composition on flax Linum usitatissimum L. anther culture. Plant Cell Rep. 21 (3) : 204-207. doi: 10.1007/s00299-002-0500-x

Blinstrubienė A., Burbulis N., Kuprienė R. 2009. Regeneration of adventitious shoots of linseed (Linum usitatissimum L.) from hypocotyl explants. Zemdirbyste-Agriculture. 96 (3) : 168-175.

Blinstrubienė A., Burbulis N., Kuprienė R. 2011. Effect of genotype and medium composition on linseed (Linum usitatissimum) ovary culture. Biologia. 66 (3) : 465-469. doi: 10.2478/s11756-011-0028-z

Blinstrubienė A., Burbulis N., Masienė R. 2017. Genotypic and exogenous factors affecting linseed ovary culture. Zemdirbyste-Agriculture. 2017. 104 (3) : 243-248. doi: 10.13080/z a.2017.104.031

Burbulis N., Blinstrubienė A., Sliesaravičius A., Venskutonienė E. 2005. Influence of genotype, growth regulators, sucrose level and preconditioning of donor plants on flax (Linum usitatissimum L.) anther culture. Acta Biologica Hungarica. 56 (3-4) : 323-331. doi: 10.1556/ABiol.56.2005.3 4.15

Burbulis N., Blinstrubienė A. 2011. Genotypic and exogenous factors affecting linseed (Linum usitatissimum L.) anther culture. J. Food Agricult. Environ. 9 (3-4) : 364-367. doi: 10.1234/4.2011.2285

Burbulis N., Blinstrubienė A., Masienė R., Jonytienė V. 2012. Influence of genotype, growth regulators and sucrose concentration on linseed (Linum usitatissimum L.) anther culture. J. Food Agricult. Environ. 10 (3-4) : 764-767. doi: 10.1234/4.2012.3509

Diederrichsen A., Richards K. 2003. Taxonomy and germplasm conservation. In: Flax: The genus Linum (Ed. by A.D. Muir and N.D. Westcott). Boca Raton, USA, CRC Press : 39-42.

Evtimova M., Vlahova M., Atanassov A. 2005. Flax improvement by biotechnology means. J. Natural Fibers. 2 (2) : 17-34. doi: 10.1300/J395v02n02_02

Janowicz J., Niemann J., Wojciechowski A. 2012. The effect of growth regulators on the regeneration ability of flax (Linum usitatissimum L.) hypocotyl explants in in vitro culture. BioTechnologia. 93 (2) : 135-138. doi: 10.5114/bta.2012.46578

Millam S., Davidson D., Powell W. 1992. The use of flax (Linum usitatissimum) as a model system for studies on organogenesis in vitro: the effect of different carbohydrates. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 28 (2) : 163-166. Doi : 10.1007/BF00055512

Millam S., Obert B., Pretová A. 2005. Plant cell and biotechnology studies in Linum usitatissimum – a review. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 82 (1) : 93-103. doi: 10.1007/s11240-004-6961-6

Mundhara R., Rashid A. 2006. TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedlings of Linum, putative role of ethylene in regeneration. Plant Sci. 170 (2) : 185-190. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.06.015

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 (3) : 473-497. doi: 10.1111/j.1399 3054.1962.tb08052.x

Obert B., Bartosova Z., Pretova A. 2005. Dihaploid production in flax by anther and ovary cultures. J. Natural Fibers. 1 (3) : 1-14. doi: 10.1300/J395v01n03_01

Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J. 2003. Regeneration of flax (Linum usitatissimum L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to Fusarium oxysporum. Plant Cell Rep. 22 (2) : 110-116. doi: 10.1007/s00299 003 0662-1

Seta-Koselska A., Skórzyńska-Polit E. 2017. Optimization of in vitro culture conditions for obtaining flax (Linum usitatissimum L. cv. Modran) cell suspension culture. BioTechnologia. 98 (3) : 183-188. doi: 10.5114/bta.2017.70796

Siegień I., Adamczuk A., Wróblewska K. 2013. Light affects in vitro organogenesis of Linum usitatissimum L. and its cyanogenic potential. Acta Physiol Plant. 35 (3) : 781-789. doi: 10.1007/s11738-012-1118-4

Yildiz M., Özgen M. 2004. The effect of a submersion pretreatment on in vitro explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (Linum usitatissimum). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 77 (1) : 111-115. Doi : 10.1023/B:TICU.0000016493.03592.c3

Yildiz M., Sağlik C., Telci C., Erkilich E.G. 2011. The effect of in vitro competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of Linum usitatissimum. Turk. J. Bot. 35 (2) : 211-218. doi: 10.3906/bot-1005-26

Надійшла до редакції
13.02.2019 р.

INFLUENCE OF 6-BENZYLAMINOPURINE ON THE INTENSITY OF CALUS FORMATION AND ORGANOGENESIS OF *LINUM USITATISSIMUM* L. *IN VITRO* CONDITIONS

S. V. Mishchenko

Institute of Bast Crops of National Academy of Agrarian Science of Ukraine
(Hlukhiv, Sumy region, Ukraine)
E-mail: serhii-mishchenko@ukr.net

Linum usitatissimum L. convar. elongatum (Hlinum variety) is mostly capable to form the callus on the hypocotyl segments provided that it is cultivated on a Murashige and Skoog medium supplemented with 30 g/L sucrose, a 16 h photoperiod, a 60–80% relative humidity, an 22-24°C air temperature, and under the influence of only auxins (i), only cytokinins (ii) and combinations of auxins and cytokinins (iii) of exogenous origin. The highest frequency of organogenesis was in the variant with 1,0 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), 0.3 mg/L kinetine (cytokinins only), a combination of 1-naphthylacetic acid (NAA) and BAP, indole-3-acetic acid (IAA) and BAP. Studies with a large variation range of BAP concentrations indicate that in the presence of auxin NAA (0.05 mg/L in all variants) the efficiency of callus formation and shoots regeneration was higher. However, the use of only BAP can be quite a distinct technique for the induction of callus and organogenesis. For the

studied species in general and this genotype in particular the synthesis of auxins of endogenous origin in the presence of cytokinins of exogenous origin is sufficient for organogenesis. Increasing of the concentration of BAP up to 3.0 mg/L inhibited the callus formation and shoots regeneration. The optimal concentrations of phytohormones can be expressed by inequality $1.0 \leq BAP \leq 1.75$, and when 0.05 mg/L of NAA is added to the medium, inequality $0.5 \leq BAP \leq 2.0$. The greatest efficiency of callus formation and organogenesis was found in variants 1.5 mg/L BAP (i), 1.25 mg/L BAP and 0.05 mg/L NAA (ii). Reaction of *L. usitatissimum* L. convar. elongatum on the effect of phytohormones compared to *L. usitatissimum* L. convar. mediterraneum was different.

Key words: *Linum usitatissimum, in vitro, phytohormones, 6-benzylaminopurine, callus, organogenesis*

ВЛИЯНИЕ 6-БЕНЗИЛАМИНОПУРИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ КАЛЛУСОГЕНЕЗА И ОРГАНОГЕНЕЗА LINUM USITATISSIMUM L. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

С. В. Мищенко

Институт лубяных культур
Национальной академии аграрных наук Украины
(Глухов, Сумская обл., Украина)
E-mail: serhii-mishchenko@ukr.net

Linum usitatissimum L. convar. elongatum (сорт Глинум) в значительной степени способен к образованию каллуса на гипокотильных сегментах при условии культивирования на питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы, при фотопериоде 16 ч, относительной влажности воздуха 60–80%, температуре воздуха 22-24°С и под влиянием: 1) только ауксинов, 2) только цитокининов, 3) комбинации ауксинов и цитокининов экзогенного происхождения. Самая высокая частота органогенеза наблюдалась под влиянием 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,3 мг/ кинетина (т. е. только цитокининов), сочетания 1-нафтилуксусной кислоты (НУК) и БАП, индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и БАП. Проведенные исследования с привлечением сравнительно большого вариационного ряда концентраций БАП свидетельствуют о том, что при наличии ауксина (0,05 мг/л НУК во всех вариантах) эффективность каллусогенеза и регенерации побегов была выше. Вместе с тем применение только БАП может быть вполне самодостаточным приемом для индукции каллусо- и органогенеза. Для изучаемого вида в целом и данного генотипа в частности достаточным для органогенеза является синтез ауксинов эндогенного происхождения при наличии цитокининов экзогенного происхождения. Увеличение концентрации БАП до 3,0 мг/л угнетало рост каллуса и регенерацию побегов. Оптимальные концентрации фитогормона можно выразить неравенством $1,0 \leq БАП \leq 1,75$, а при добавлении в среду 0,05 мг/л НУК неравенством $0,5 \leq БАП \leq 2,0$. Наибольшая результативность каллусогенеза и органогенеза обнаружена в вариантах: 1) 1,5 мг/л БАП, 2) 1,25 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК. Реакция *L. usitatissimum* L. convar. elongatum на влияние фитогормонов отличалась от таковой у *L. usitatissimum* L. convar. mediterraneum.

Ключевые слова: *Linum usitatissimum, in vitro, фитогормоны, 6-бензиламинопурин, каллус, органогенез*