

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИ БЛИЗКИХ ФОРМ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

<sup>2</sup>Белорусский государственный технологический университет, Минск

**Актуальность.** Методы физико-химического анализа биологических полимеров получили широкое распространение в научных исследованиях и производственной практике благодаря высокой чувствительности и объективности. Электронная микроскопия, термогравиметрия, энергодисперсионный анализ и другие методы позволяют получить точные характеристики компонентов, формирующих биологические объекты. При анализе конкретных образцов в решении задач различных направлений сельского хозяйства необходимо учитывать сложность строения и структурную неоднородность исследуемого материала. Изучение признаков продуктивности и качества волокна льна-долгунца – важнейшей технической культуры – долгое время базировалось на морфологических характеристиках (высота, техническая длина и др.), анатомическом строении стебля, а чаще всего на органолептической оценке льнопродукции. Все перечисленные показатели в той или иной степени зависят от климатических условий и агротехнических приемов выращивания, что необходимо учитывать при их использовании. В настоящее время представляется актуальным подбор и адаптация методов, позволяющих проводить скрининг селекционных и промышленных образцов льна-долгунца для идентификации высококачественных объектов и выявления структурно-функциональных характеристик волокна [1].

Лен-долгунец является культурой с узким генетическим фоном, что является следствием автогамного типа размножения, и использования в скрещивании на протяжении длительного времени ограниченной группы сортов [2]. Получение новых форм льна различными способами, в том числе с использованием биотехнологических методов, приводит в результате к получению близких в генетическом отношении генотипов. Соматональные вариации или генетически модифицированные формы отличаются от исходных сортов небольшим количеством генов. Дальнейшее их использование в селекционных программах имеет смысл только при условии точной идентификации генотипов и объективной оценке фенотипических характеристик.

**Цель** проводимого нами исследования состояла в подборе и использовании физико-химических методов оценки генетически близких форм льна-долгунца, полученных в культуре *in vitro*. Исследовали возможность применения электронной микроскопии и термогравиметрии для анализа состава и строения клеточной стенки исходных и генетически измененных образцов.

**Материалом для исследования** служили полученные на основе сорта К-65 линии трансформантов льна-долгунца (образцы № 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 14, 16).

**Методы исследования.** Для выявления структурно-морфологических различий образцов волокна растений-трансформантов была использована сканирующая электронная микроскопия, позволяющая производить неразрушающий качественный и количественный элементный анализ участков исследуемого объекта. Термогравиметрический анализ (ТГ) проводили на лубяном волокне льна выделенного из льносолломки щелочным методом [3].

**Результаты и обсуждение.** В основе каждого признака продуктивности и качества льна-долгунца лежат морфологические, анатомические и биохимические особенности строения волокна, поэтому структура и химический состав элементарных волокон являются эффективными характеристиками, позволяющими дать предварительный прогноз продуктивности и качества.

Метод термогравиметрии позволяет идентифицировать основные полимерные компоненты: целлюлозу, лигнин, гемицеллюлозы, пектиновые вещества, а также воду и зольные элементы. Вычисление энергии активации термоокислительной деструкции ( $E_a$ ) дает возможность оценивать качество льноволокна. ТГ-анализ волокна, выделенного из стеблей растений-трансформантов льна-долгунца, проводили на термоанализаторе ТА-4000 (модуль ТГ-50) (Mettler Toledo STAR<sup>e</sup> System, Швейцария), в интервале 25-550°C при скорости нагревания 5°C/мин и расходе воздуха 200 мл/мин. Кривые потери массы были рассчитаны при помощи программного обеспечения STAR<sup>e</sup>. Данные ТГ-анализа исследуемых образцов сравнивали с ТГ стандартных образцов льна чесаного марок цветности А и Б, полученных при аналогичных условиях.

ТГ-анализ образцов волокна растений-трансформантов льна-долгунца выявил различия в составе компонентов вторичной клеточной стенки и энергии активации термоокислительной исследуемых образцов. Содержание целлюлозы в образцах (в % от массы навески) составляло 54,97-57,94 %, нецеллюлозных полисахаридов – 21,81-27,12 % (таблица 1).

*Таблица 1- Компонентный состав образцов (%) и энергия активации ( $E_a$ , кДж/моль) при термогравиметрическом анализе растений-трансформантов льна-долгунца*

Образец льна	Навеска, мг	Вода, % (25-185°C)	Целлюлоза, % (185-385°C)	Лигнин, %		Зола, % (550°C)	$E_a$ , кДж/моль
				(385-430°C)	(430-550°C)		
№ 1	10,16	8,24	57,88	9,92	23,08	0,88	100
№ 2	10,22	8,33	56,50	9,21	25,26	0,71	95
№ 3	10,21	7,97	57,94	10,07	22,67	1,36	93
№ 4	10,38	7,99	55,86	8,94	26,03	1,18	92
№ 6	10,60	7,24	57,47	9,34	24,88	1,09	97
№ 7	10,17	9,02	55,81	8,45	25,62	1,10	94
№ 8	10,53	8,10	56,07	9,25	25,55	1,03	94
№ 10	10,18	8,76	57,62	10,66	21,81	1,15	99

№ 14	10,32	9,59	54,97	8,77	25,50	1,17	89
№ 16	10,58	7,93	55,23	8,21	27,12	1,52	92

По относительному содержанию целлюлозы образцы № 1, 3, 6, 10 превосходили остальные анализируемые образцы, при этом содержание нецеллюлозных полисахаридов (гемицеллюлозы и пектиновых веществ) в данных образцах были минимальными в анализируемой группе растений. Содержание лигнина в указанных образцах было также достаточно высоким – 9,92; 10,07; 9,34 и 10,66 % соответственно. Максимальное количество лигнина обнаружено у образца № 10. Образцы № 2, 4, 7, 8, 14 и 16 характеризуются невысокой степенью лигнификации и повышенным содержанием нецеллюлозных полисахаридов в клеточной стенке.

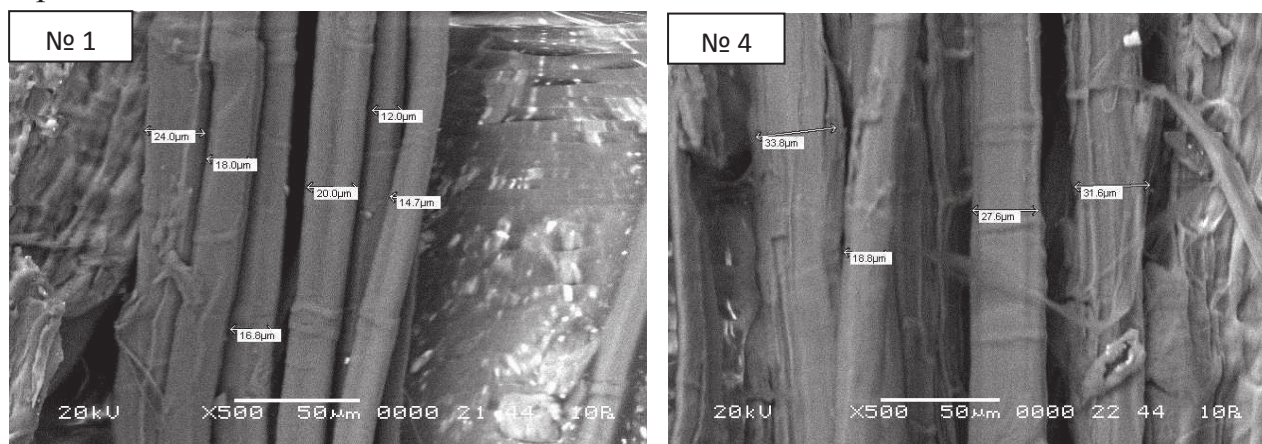
Результаты ТГ-анализа свидетельствуют о различии исследуемых образцов по величине  $E_a$ . Выявлено, что наибольшая величина этого показателя обнаружена у образцов № 1, 6 и 10 (100; 97 и 99 кДж/моль, соответственно). Так как величина  $E_a$  равна разности энергий переходного и исходного состояний реакции горения, то максимальные ее значения у образцов льняного волокна свидетельствуют о значительной структурной гомогенности и высокой степени полимеризации целлюлозы. Степень полимеризации является важнейшей характеристикой целлюлозы и в значительной степени определяет области практического использования целлюлозного сырья и физико-механические свойства получаемых из нее волокон.

Образцы волокна растений-трансформантов № 1, 6 и 10, имея относительно высокое содержание целлюлозы и высокие значения  $E_a$ , соответствуют по качеству образцам льна чесанного марок № 10А-13А. Полученные данные свидетельствует о том, что указанные образцы обладают достаточной прочностью ввиду высокой степени полимеризации целлюлозы. Значения технической длины стебля у данных генотипов имели самые высокие значения среди исследуемых образцов, что является показателем хорошей продуктивности.

Таким образом, инструментальный метод ТГ-анализа позволил дифференцировать исследуемые образцы в соответствии со стандартными технологическими характеристиками качества льняного волокна. Показано, что величина  $E_a$  отражает содержание целлюлозы в исследуемых образцах, позволяет судить о ее структуре и указывает на присутствие других полисахаридов и минеральных компонентов.

Для выявления структурно-морфологических различий образцов волокна растений-трансформантов была использована сканирующая электронная микроскопия, позволяющая производить неразрушающий качественный и количественный анализ участков исследуемого объекта. На рисунке 1 представлены микрофотографии, полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа ( $\times 500$ ), показаны элементарные лубяные волокна и их реальные морфометрические параметры.

Проведенные исследования показали, что наиболее тонкие и однородные элементарные волокна со средним диаметром от 11 до 21 мкм получены у образцов № 1 и 10. Анализ микрофотографий волокон выявил наличие инкрустации микрофибрилл у всех образцов, что обусловлено присутствием нецеллюлозных полисахаридов и пектина. Однако наиболее тонкие и однородные элементарные волокна со средним диаметром от 11 до 21 мкм получены у образцов № 1 и 10. Таким образом, показана взаимосвязь структурно-морфологических показателей строения стебля у исследуемых генотипов с одной стороны и содержанием и качеством волокна с другой стороны.



**Рисунок 1 – Ультроструктуры и морфологические показатели волокна растений-трансформантов образцов № 1, 4**

**Выводы.** Использование метода динамической термогравиметрии при изучении образцов растений-трансформантов льна-долгунца позволило с высокой точностью идентифицировать основные полимерные компоненты клеточной стенки льна: целлюлозу, лигнин, воду и зольные элементы. Получаемая в результате проведения термогравиметрического анализа кривая зависимости изменения массы от температуры и величина энергии активации термической деструкции образцов позволила оценить качество исследуемого льноволокна. Установлена взаимосвязь между структурно-функциональными параметрами элементарных волокон, полученными методом сканирующей электронной микроскопии, и результатами, полученными с помощью динамической термогравиметрии. Методы термогравиметрии и электронной микроскопии могут быть использованы для выявления технологических критериев оценки качества волокна растений-трансформантов.

Среди исследуемых образцов выделены растения-трансформанты № 1, 6 и 10, характеризующиеся высоким содержанием и качеством целлюлозы, кроме того, образцы № 1 и 10 имеют тонкие и однородные элементарные волокна. Данные образцы планируется вовлечь в селекционный процесс для закладки нового поколения конкурентоспособных сортов льна.

#### *Литературные источники*

1. Термический анализ и сканирующая электронная микроскопия с электронно-зондовым анализом в комплексных исследованиях структуры биологических объектов /

В.Н. Леонтьев [и др.] // Материалы, технологии, инструменты. – 2005. – Т. 10, № 4. – С. 109-115.

2. Шаптуренко, М.Н. Межсортовой полиморфизм льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) различного эколого-географического происхождения / М.Н. Шаптуренко, С.В. Кубрак // Весці НАН Беларусі. Сер. біял.наук. – 2011. № 1. С. 33-36.

3. Van der Oever, M.J.A. Improved method for fiber content and quality analysis and their application to flax genetic investigations / M.J.A. Van der Oever, N. Bas, L.J.M. van Soest // Industrial crop and products. – 2003. – V. 18. – P. 231-243.

*S.V. Kubrak<sup>1</sup>, E.A. Flyurik<sup>2</sup>, E.V. Feskova<sup>2</sup>*

**THE USE OF PHYSICAL AND CHEMICAL METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF THE GENETICALLY RELATED FORMS OF FLAX**

*<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences, Minsk*

*<sup>2</sup>Belarusian State Technological University, Minsk*

**Summary**

The method of the dynamic thermogravimetry has allowed to identify with high precision the basic polymer components of the cell wall of flax: cellulose, lignin, water and ash elements. Thereby this method allows to evaluate the quality of researched flax fiber. The relationship between the structural and functional parameters of the fibers obtained by scanning electron microscopy, and the results obtained by dynamic thermogravimetry was established.

Methods of thermogravimetry and electron microscopy can be used to identify the technological criteria of fiber quality of plant transformants.