

С. В. Кубрак, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси; В. Н. Леонтьев, доцент; Л. А. Филонова, ст. лаборант ИГиЦ НАН Беларуси; С. И. Юренкова, вед. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси; В. В. Титок, зав. лабораторией ИГиЦ НАН Беларуси

ПОДБОР СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА (*LINUM USITATISSIMUM* L.) ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Object of research were 10 cultivars of long-fibred flax (*Linum usitatissimum* L.) of the Belarusian selection. The purpose of research consisted in analysis of regenerative ability of cultivars of long-fibred flax for their further use in work on genetical transformation. Regenerative ability of fiber flax cultivars of Belarusian breeding was analyzed in the *in vitro* culture using seed lobes as explants. The possibility of using cultivars K-6, K-65 and Dashkovsky for biotechnological jobs on genetic transformation was shown.

Введение. В настоящее время одним из активно развивающихся направлений биотехнологии сельскохозяйственных культур является получение трансгенных растений. Успешное проведение генетической трансформации требует большой предварительной работы по оптимизации условий выращивания растительных тканей в культуре *in vitro* и подбору сортов с максимально высоким морфогенным потенциалом.

Для многих сельскохозяйственных культур разработаны методы выращивания растительных тканей, и, как правило, это методы индивидуальны для каждого вида растений. Кроме того, в пределах вида наблюдается специфичность сортов по отзывчивости к той или иной методике [1]. В связи с этим существует понятие морфогенного потенциала сорта, которое означает способность растений данного сорта регенерировать из каллуса в условиях *in vitro*. Чем выше способность сорта к регенерации, тем он более перспективен для биотехнологических работ. Выяснение морфогенного потенциала является обязательным предварительным этапом в любой работе с культурой тканей.

Основная часть. Объектом нашего исследования являлись 10 сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) белорусской селекции: Родник, Оршанский-2, Лазер, К-65, Дашковский, Призыв-2, Могилевский-1, Л-41, К-6, Вита.

Цель исследования состояла в анализе регенерационной способности сортов льна-долгунца для дальнейшего использования их в работе по генетической трансформации.

Морфогенный потенциал сортов зависит от ряда факторов, которые необходимо учитывать при культивировании изолированных клеток и тканей. Наиболее значительно на регенерационную способность оказывают влияние состав питательных сред и выбор экспланта. В работах по биотехнологии льна-долгунца в качестве эксплантов используются разнообразные фрагменты растения: верхушечные меристемы, пыльники, семяпочки, участки стебля, листья, сегменты гипокотили, семядоли, а также изоли-

рованные протопласты [2, 3]. Чаще всего эксплантами служат гипокотили, пыльники и семядоли. Каждый из этих эксплантов имеет свои преимущества и недостатки, поэтому их выбор определяется целью исследования [2]. Сегменты гипокотили наиболее удобны для микрочлонального размножения льна, так как дают морфогенный каллус, большое количество почек и побегов, характеризуются высоким морфогенным потенциалом, который практически одинаков для любого сорта. Несмотря на высокую регенерационную способность, для генетической трансформации больше подходят слабо дифференцированные ткани, в которых большая часть клеток открыта для взаимодействия с трансформирующими агентами. Кроме того, регенеранты, полученные из гипокотилей, обычно образуются более чем из одной клетки, в результате эффективность трансформации значительно снижается. Культивирование изолированных пыльников помогает избежать этой проблемы, а также позволяет получать гаплоиды, которые широко используются в клеточной инженерии для создания новых форм и сортов растений. Однако сложности с выделением эксплантов такого типа (растения должны находиться в фазе бутонизации) и низкая способность самого экспланта к каллусогенезу и регенерации делают его сложным объектом культивирования.

В используемой нами методике эксплантом служили семядоли или первые зародышевые листья. Выбор данного экспланта основан на том, что семядоли образованы слабо дифференцированными тканями: паренхимой и тремя слабо развитыми прожилками. Семядоли легко получать в большом количестве, так как они удаляются у стерильных проростков на ранних стадиях развития растений льна. Семядоли являются удобными объектами для агробактериальной трансформации, поскольку агробактерии легко проникают по срезам в паренхиму экспланта. Побегов, полученных на основе семядольных эксплантов, как правило, образуются из одной клетки. Методика регенерации из семядольных эксплантов, используемая в на-

ших исследованиях, разработана в Институте физиологии растений РАН Г. Н. Радугиной для регенерации рапса [4]. Позже ее адаптировали для регенерации льна-долгунца на сортах российской селекции. Методика была представлена авторами для выяснения регенерационной способности сортов льна-долгунца белорусской селекции. Данная методика характеризуется рядом преимуществ по сравнению с аналогичными, описанными в литературе [3].

Для получения стерильных проростков семена растений льна-долгунца стерилизовали 70%-ным раствором этанола и 0,1%-ным раствором диацета с последующей 4-кратной промывкой стерильной водой. Проращивали семена на безгормональной среде MS [5], содержащей половинный набор макросолей, 0,7% агар, 1% сахарозы, pH 5,8. Семядоли отделяли у 5–6-дневных проростков и помещали на среду для каллусогенеза. Среда для индукции каллуса помимо полного набора солей среды MS содержала витамины (тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота, инозитол) и следующие фитогормоны: 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 100 мкг/л; нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 2 мг/л; кинетин (4 мг/л). Ауксины 2,4-Д и НУК добавляются для стимуляции дедифференциации паренхимных клеток. Для усиления неограниченного деления дедифференцированных клеток в питательную среду добавляется кинетин. Полученная в результате неорганизованного роста каллусная ткань образуется по краям срезов эксплантов в местах, где гормоны из питательной среды проникают к клеткам. В слабо дифференцированных тканях (таких как семядоли) легче протекают процессы дедифференциации и каллусообразования.

В ходе эксперимента было проанализировано около 200 эксплантов каждого сорта. Обнаружено, что все выбранные нами сорта имеют высокую способность к образованию каллуса: от 78,1% у сорта Л-41 до 85,2% у сорта К-65 (табл. 1).

Для регенерации из каллуса полноценных побегов экспланты переносили на среду для морфогенеза, которая содержала полный набор солей среды MS, витамины (тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота, инозитол) и фитогормоны 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрации 2 мг/л и НУК в концентрации 0,05 мг/л (среда Д2/0,05) или только БАП в концентрации 1 мг/л (среда Д1/0). На этапе индукции морфогенеза проявляется недостаток выбранного нами экспланта, который заключается в том, что семядоли дают неморфогенный каллус. Обычно на семядолях вырастают тонкие корешки и малое количество почек, которые далее не развиваются. Чтобы индуцировать побегообразование из каллуса, методикой предусмотрено добавление еще одного фитогормона абсцизовой кислоты, которая оказывает стимулирующее действие на органогенез.

На начальном этапе органогенеза можно предварительно оценить морфогенную способность сортов по количеству точек инициации – меристематических зон, из которых развиваются побеги. Они представляют собой мелкие зернистые бугорки, хорошо заметные на фоне каллуса. Количество точек инициации на один каллус варьировало в пределах от 1 до 6 у сортов К-6 и Л-41; от 1 до 5 у сортов Родник, К-65, Дашковский; от 0 до 4 у сортов Оршанский-2, Лазер, Вита; от 0 до 3 у сортов Призыв-2 и Могилевский-1. По предварительным данным можно сделать вывод, что сорта К-6, Л-41, Родник, К-65 и Дашковский имеют более высокий морфогенный потенциал.

На последующих этапах культивирования, после появления из точек инициации почек и побегов, изучаемые сорта резко разделились по способности к регенерации (табл. 2). С появлением побегов морфогенный потенциал оценивался по двум показателям: частоте регенерации и эффективности регенерации.

Таблица 1

Каллусообразование на семядольных эксплантах сортов льна-долгунца

Сорт	Количество эксплантов	Количество каллусов	Процент каллусообразования
Родник	198	164	82,8
Оршанский-2	207	167	80,7
Лазер	201	171	85,1
К-65	210	179	85,2
Дашковский	195	160	82,0
Призыв-2	190	152	80,0
Могилевский-1	202	168	83,2
Л-41	187	146	78,1
К-6	188	154	81,9
Вита	186	155	83,3

Частота регенерации и эффективность регенерации 10 сортов льна-долгунца

Сорт	Среда Д 1/0		Среда Д 2/0,05	
	Частота регенерации	Эффективность регенерации	Частота регенерации	Эффективность регенерации
Родник	0,13	2,2	0,28	1,4
Оршанский-2	0,02	1,0	–	–
Лазер	0,06	1,3	0,41	1,9
К-65	0,66	1,5	0,11	1,3
Дашковский	0,56	1,9	–	–
Призыв-2	0,03	2,0	–	–
Могилевский-1	–	–	0,01	1,0
Л-41	0,11	3,0	–	–
К-6	0,86	3,1	0,78	3,1
Вита	0,11	1,8	–	–

Частота регенерации – отношение количества побегов к общему количеству эксплантов данного сорта; эффективность регенерации – среднее число побегов на экспланте. Нами применялись два варианта среды для морфогенеза (среда с добавлением БАП и НУК и среда с добавлением только БАП). Полученные данные показали, что по частоте регенерации на среде Д1/0 наибольшей регенерационной способностью характеризовались сорта К-6, К-65 и Дашковский, у которых отмечены высокие значения частоты регенерации, а также средние и высокие показатели эффективности регенерации. Сорта Л-41, Вита и Родник характеризуются высокой эффективностью регенерации, но низким значением частоты регенерации (от 0,11 до 0,13), что затрудняет их использование при данных условиях культивирования. Сорта Оршанский-2, Призыв-2 и Лазер имели очень низкие значения частоты регенерации, у сорта Могилевский-1 на среде Д1/0 не отмечена способность к морфогенезу. На среде Д2/0,05 наибольшие показатели морфогенного потенциала выявлены у сортов К-6 и Лазер. Высокая эффективность регенерации отмечена у сортов К-6 и Л-41. Более высокие показатели регенерационной способности на среде без добавления НУК можно объяснить высоким

содержанием эндогенных ауксинов и, соответственно, более оптимальным соотношением ауксинов и цитокининов в семядольных эксплантах.

Заключение. Таким образом, нами были отобраны три сорта, морфогенный потенциал которых оказался наиболее высоким: К-6, К-65 и Дашковский.

Литература

1. Влияние генотипа на индукцию и регенерацию растений у льна-долгунца / Л. В. Хотылева [и др.] // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. – 1996. – № 2. – С. 60–61.
2. Поляков, А. В. Биотехнология в селекции льна / А. В. Поляков. – Тверь: Формат, 2000. – 180 с.
3. Сорока, А. И. Каллюсообразование у некоторых однолетних видов льна / А. И. Сорока // Физиол. и биох. культ. раст. – 2005. – Т. 37, № 5. – С. 413–421.
4. Ралдугина, Г. Н. Получение и исследование трансгенных растений рапса: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Г. Н. Ралдугина. – М., 1997. – 35 с.
5. Murashige, T. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.