

УДК 633.521:631.527

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ И КАЛЛУСОГЕНЕЗ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Е.А. ГОНЧАРУК, Е.А. КАЛАШНИКОВА

(Кафедра сельскохозяйственной биологии)

Приводятся результаты исследования физиологических реакций растений разных сортов льна-долгунца в условиях *in vitro*. Указываются оптимальные концентрации гормонов ауксинового и цитокининового действия для получения первичной и пересадочной каллусной ткани.

Широкий спектр задач, стоящих перед льноводством, определяет необходимость изучения культуры льна в условиях *in vitro* [2, 3]. При этом особое значение имеет определение оптимальных условий культивирования изолированных тканей льна с последующим применением результатов данного эксперимента в клеточной селекции. Это, в свою очередь, может способствовать расширению генетического потенциала данной культуры. Однако эксперименты в указанном направлении с культурой льна не проводились.

В литературе имеются данные, свидетельствующие лишь о получении культуры гибрида-зародыша, позволяющей преодолеть

постгамную несовместимость, возникающую после оплодотворения при отдаленной гибридизации [1], а также гибридов-протопластов, позволяющих скрещивать филогенетически отдаленные виды льна, которые невозможно скрестить обычным половым путем [5]. Немецкие ученые изучали возможности регенерации растений льна из культуры пыльников, включая при межвидовом скрещивании культурные и дикие виды [5]. Исследователями рассматривались также возможности проведения клеточной селекции льна с использованием культуры изолированных протопластов с последующим получением из них растений-регенерантов [7]. Проводи-

лись эксперименты по получению растений-регенерантов после трансформации с помощью *A.tumefaciens*, несущей Ti-плазмиду [6]. Исследователями Института льноводства (г.Торжок) также проводились эксперименты по созданию новых форм льна-долгунца с использованием методов генетической инженерии [4].

Учитывая области применения биотехнологических методов к культивируемым растениям льна, следует отметить, что основные аспекты, предлагаемые в данной работе, затрагивают проблемы культивирования льна-долгунца в условиях *in vitro* с последующим использованием отработанной методики в селекции на клеточном уровне. В работе представлены результаты исследований по подбору и выявлению условий культивирования, которые оптимально соответствуют требованиям культуры с учетом последующих индуцируемых процессов каллусогенеза и морфогенеза.

Методика

Объектом исследования служили 10 сортов льна — ВНИИЛ 11, К6, Лазурный, Крым (дикорастущий), Торжокский 4, Псковский 359, Спартак, Бахмальский, Призыв 81, Тверца. Для получения стерильных проростков семена стерилизовали 0,1% раствором сулемы в течение 10—12 мин, промывали их в 3 порциях стерильной дистиллированной воды, после чего семена помещали на агаризованную питательную среду Мурасиге — Скуга (МС) без регуляторов роста. Последующую работу проводили на сегментах ги-

покотилей, изолированных с 5—15-дневных проростков.

Для получения первичной и пересадочной каллусной ткани использовали модифицированную питательную среду МС, содержащую 2% сахарозы, а также гормоны ауксинового и цитокининового действия. Было изучено влияние 2,4-Д в концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/л и НУК в концентрации 1 мг/л на процесс каллусогенеза и сочетания БАП (1 мг/л) и НУК (0,1 мг/л) — на процесс морфогенеза каллусной ткани.

Пересадку каллусной ткани осуществляли 1 раз в месяц, при этом учитывали следующие показатели: интенсивность роста каллуса, его плотность, формирование морфогенных структур.

Стерильные проростки и каллусную ткань выращивали в световой комнате, где поддерживали температуру $25 \pm 1^\circ \text{C}$, 70% относительную влажность воздуха, 24-часовое освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью освещения 3 000 лк.

Результаты

В первой части экспериментов необходимо было выяснить способность семян разных генотипов льна формировать стерильные, нормальные по морфологии проростки. Было установлено, что этот процесс в основном зависит от исследуемого генотипа. Так, семена сортов К6, Лазурный, Крым, Бахмальский, Тверца при проращивании на безгормональной питательной среде через 3—5 дней образовывали слабые проростки с физиологическими нарушениями: растения имели утол-

щенный, укороченный гипокотиль, слабо развитую корневую систему, в ряде случаев у них отсутствовали листья при гипертрофированно развитом и очень плотном гипокотиле. В то же время семена сортов ВНИИЛ 11, Торжокский 4, Псковский 359, Спартак, Призыв 81 в течение 7 дней формировали проростки нормальные по морфологии.

Из литературных данных известно, что процесс каллусогенеза зависит от ряда факторов, в частности от генотипа и возраста первичного экспланта, а также от гормонального состава питательной среды [4, 6]. Было установлено, что возраст проростков оказывает немаловажное влияние на процесс формирования первичной и пересадочной каллусной ткани. Так, если сегменты гипокотилей с 5—7-дневных проростков в 100% случаев образовывали ярко-желтый среднеплотный каллус, который можно было использовать в дальнейшей работе, то у 10—15-дневных проростков каллусная ткань не образовывалась, растительный материал, помещенный на питательную среду с 2,4-Д, обесцвечивался и наблюдалось отмирание тканей. Поэтому в последующих экспериментах в качестве первичного экспланта использовали сегменты гипокотилей, изолированные с 5—7-дневных проростков.

В связи с тем, что в ходе проведения экспериментов наблюдалось развитие внутритканевой инфекции на питательной среде из растительного материала, непосредственно перед помещением гипокотилей на среду МС приме-

няли антибиотик ампициллин в концентрации 100 мг/л двумя способами. При первом способе сегменты гипокотилей помещали в раствор антибиотика и выдерживали в нем 10—15 с, затем растительный материал переносили на питательную среду. При втором способе антибиотик вводили сразу в питательную среду, на которую высаживали сегменты гипокотилей. И в том и в другом случае достигалась 100% стерильность растительного материала. В связи с тем, что второй способ менее трудоемкий, в последующих экспериментах антибиотик вводили непосредственно в питательную среду перед посадкой изолированных сегментов гипокотилей.

При изучении действия различных концентраций 2,4-Д на каллусогенез было установлено, что этот процесс зависит не только от концентрации используемого гормона, но и от изучаемого генотипа. Так, изолированные сегменты гипокотилей сортов К6, Лазурный, Бахмальский, Тверца во всех изучаемых вариантах не были способны формировать первичный каллус, а сорта ВНИИЛ 11, Торжокский 4, Псковский 359, Спартак, Призыв 81 образовывали хорошо пролиферирующую каллусную ткань, которая могла быть использована в последующих экспериментах.

Особо следует выделить сорт Крым (дикорастущий), семена которого прорастали лишь на 7%, но при этом изолированные сегменты гипокотилей обладали очень высокой морфогенетической активностью: каллусная ткань была ярко-зеленого цвета с

множеством темно-зеленых почек. Однако последующее культивирование такой высокоморфогенной каллусной ткани не дало положительных результатов. К концу первого пассажа каллусные клетки начинали буреть и некротизироваться, что привело к полной гибели всей ткани.

Исходя из того, что на первых этапах культивирования семян и сегментов гипокотилей проростков была выявлена зависимость морфогенетического процесса от исходного генотипа, то последующие эксперименты были проведены лишь на 5 сортах (ВНИИЛ 11, Торжокский 4, Псковский 359, Спартак, Призыв 81), которые обладали постоянной повышенной морфогенетической активностью в условиях *in vitro*.

Помимо зависимости формирования каллусной ткани от исследуемого генотипа выявлено также влияние на него состава питательной среды, в частности наличие в ней ауксина в разных концентрациях. Наши эксперименты показали, что оптимальная концентрация 2,4-Д составила 1 мг/л. В этих условиях формировался каллус светло-желтого цвета средней плотности. Наиболее интенсивно данный процесс происходил у сорта Спартак, причем образующийся каллус имел высокую плотность и на поверхности каллуса были заметны меристематические очаги зеленого цвета. При концентрации 2,4-Д 2 мг/л отмечалось отмирание тканей сегментов гипокотили и листа. Введение в среду гормона в концентрации 0,5 мг/л не индуцировало процесс каллусогенеза. Добавление в пи-

тательную среду НУК в концентрации 1 мг/л приводило к формированию каллусной ткани с одновременной активизацией процесса ризогенеза у растительных тканей. Так, наиболее высокая интенсивность процесса наблюдалась у сортов Торжокский 4 и Псковский 359, что, видимо, связано с сортовыми особенностями данных генотипов.

Таким образом, экспериментальным путем было установлено, что для индуцирования каллусогенеза у изолированных сегментов гипокотилей 7-дневных проростков льна наиболее эффективно использование гормона 2,4-Д, так как процесс ризогенеза, вызываемый у растений введением в среду гормона НУК, на этапе формирования каллусной ткани нежелателен для последующих исследований. Поэтому полученный первичный каллус был перенесен для дальнейшего культивирования на питательную среду МС, содержащую 1 мг 2,4-Д на 1 л.

Одновременно с экспериментом по наращиванию каллусной массы часть каллусной ткани была перенесена на среду МС с БАП (1 мг/л) и НУК (0,1 мг/л) с целью получения растений регенерантов. В результате установлено, что каллус всех изучаемых генотипов способен к морфогенезу, причем наиболее интенсивно этот процесс происходил у сорта Спартак. Визуальные наблюдения позволили установить, что морфогенез идет по пути соматического эмбриогенеза. Это четко проявлялось в формировании по всей поверхности каллуса белых глобуло-

подобных структур. Для дальнейшего развития эмбрионидов в проростки эмбрионный каллус из всех вариантов был перенесен на безгормональную среду.

Выводы

1. Генотип влияет на прорастание семян, развитие проростков и формирование каллусной ткани в условиях *in vitro*.

2. Интенсивный каллусогенез у всех 10 испытываемых сортов льна наблюдался при введении в питательную среду гормона 2,4-Д в концентрации 1 мг/л.

3. При введении в питательную среду НУК в концентрации 0,1—0,5 мг/л отмечена тенденция к ризогенезу у растений льна сортов Псковский 359 и Торжокский 4.

4. Добавление в питательную среду БАП (1 мг/л) и НУК (0,1 мг/л) стимулировало морфогенез, причем наиболее интенсивный данный процесс был у сорта Спартак.

5. Морфогенез испытываемых сортов льна идет по пути соматичес-

кого эмбриогенеза, что выражается в возникновении глобулоподобных структур на поверхности каллусной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1988. — 2. Жученко А.А. Перспективные направления научных исследований в льноводстве России. М, 1995, с. 78—79. — 3. Жученко А.А. Льняное дело, 1994, № 1, с. 13—17. — 4. Чиркизова О.Ф. Создание форм льна-долгунца на основе генетической трансформации *Agrobacterium tumefaciens*. — Автореф. канд. дис. Торжок, 1997. — 5. Friedt W., Nichterlein M. — Flax: breed a. utilization.: Proc. EEC Flax Workshop, Brussels, 1989, p. 5—13. — 6. Zhan Xiangcan, Jones David A., Kerr Allen. — Plant molecular biology, 1988, N 5, p. 551—559. — 7. Barakat M., Cocking E. Plant protoplasts and genetics, Berlin, 1989, p. 160—172.

Статья поступила 28 января
1998 г.

SUMMARY

Ten varieties of fiber flax were taken for experiments. During the process of producing callus tissue 5 varieties — VNIIL-11, Torzhoksky-4, Pskovskiy-359, Spartak, Prizyv-81 — were selected; their seed formed normally developing sprouts *in vitro* the latter being used to produce callus. It has been found that genotype affects seed germination on nutrient medium, development and shape of callus tissue, and «Spartak» variety has high activity of plant material under conditions *in vitro*.

When determining optimum concentration of auxin and cytoquinine hormones for obtaining primary and transplanting callus tissue, it was found that using 2,4 D is most efficient with concentration of 1 mg/l. Using naphthyl acetic acid in the same concentration resulted in activation of rhisogenesis on produced callus tissue in Torzhoksky-4 and Pskovskiy-359 varieties. Combination of BAP (1 mg/l) and naphthyl acetic acid (0.1 mg/l) promoted the process of morphogenesis which followed the course of somatic embryogenesis.