УДК 633.854.54:581.143.6

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕОПЛОДОТВОРЕННЫХ СЕМЯПОЧЕК ЛЬНА МАСЛИЧНОГО ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ

Могилевская Л.А, аспирант, Сорока А.И., к.б.н., ст.научный сотрудник, Лях В.А., д.б.н., профессор

Институт масличных культур, г. Запорожье

В настоящей работе изучались условия ввода в культуру изолированных неоплодотворенных семяпочек льна масличного и их дальнейшего культивирования после опыления культурного льна пыльцой дикого вида *Linum grandiflorum* L. Оптимальный срок для введения в культуру in vitro незрелых семяпочек составил 6 суток после опыления. Выявлен состав фитогормонов, при использовании которых на средах LMA-1 и N_6 идет формирование эмбриогенного каллуса из неоплодотворенных семяпочек льна масличного.

Ключевые слова: лен масличный, Linum grandiflorum L., неоплодотворенные семяпочки, in vitro, каллус, эмбриогенез, питательная среда, фитогормоны.

Могилевська Л.О., Сорока А.І., Лях В.О. УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕЗАПЛІДНЕНИХ НАСІННИХ ЗАЧАТКІВ ЛЬОНУ ОЛІЙНОГО ДЛЯ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДНИХ РОСЛИН / Інститут олійних культур УААН, Україна

У цій роботі вивчали умови введення в культуру ізольованих незапліднених насінних зачатків льону олійного та їх подальшого культивування після запилення культурного льону пилком дикого виду *Linum grandiflorum* L. Оптимальний термін для введення в культуру in vitro незрілих насінних зачатків склав 6 діб після запилення. Виявлено склад фітогормонів, при використанні яких, на середовищах LMA-1 та N_6 йде формування ембріогенного калусу з незапліднених насінних зачатків льону олійного.

Ключові слова: льон олійний, Linum grandiflorum L., незапліднені насінні зачатки, in vitro, калус, ембріогенез, поживне середовище, фітогормони.

Mogilevska L.A., Soroka A.I., Lyakh V.A. CULTIVATING CONDITIONS OF ISOLATED UNFERTILIZED OVULES OF OIL FLAX FOR THE HAPLOID PLANTS PRODUCTION / Institute of Oilseed Crops UAAS, Ukraine

In the given paper the conditions of introduction of isolated unfertilized ovules of oil flax into *in vitro* culture and their further cultivating were studied. An optimum period for introduction of isolated unfertilized ovules into *in vitro* culture equaled 6 days after pollination. The composition of phytohormones was found for formation of embryogenic callus out of unfertilized ovules of oil flax on the LMA-1 and N_6 nutrient media.

Key words: oil flax, Linum grandiflorum L., unfertilized ovules, in vitro, callus, embryogenesis, nutrient medium, phytohormone.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы все более широкое применение в селекции культурных растений находят методы культуры изолированных тканей и органов, среди которых особое место занимает метод культивирования неоплодотворенных семяпочек вследствие возможности получать гаплоидные и дигаплоидные растения.

Интерес к получению гаплоидов определяется большими возможностями, которые они открывают для селекционных программ. Так, дигаплоиды представляют собой константные, нерасщепляющиеся формы, пригодные для использования в качестве сортов или как исходный материал для дальнейшей работы.

Впервые гаплоидные растения из культивируемых in vitro неоплодотворенных завязей, были получены во Франции в 1976 году у ячменя [1]. К настоящему времени гаплоиды соответствующего происхождения получены у целого ряда культур: ячменя, пшеницы, риса, табака, герберы, гевеи, сахарной свеклы, кукурузы, подсолнечника, а также хлопчатника и картофеля [цит. по 2]. На льне масличном работы подобного рода единичны [3, 4].

Селекция многих возделываемых культур невозможна без привлечения генофонда их дикорастущих сородичей. Однако число видов, вовлекаемых в отдаленную гибридизацию, ограничивается проблемами, связанными с прогамной и постгамной несовместимостью [5, 6]. В то же время, при межвидовых скрещиваниях используют пыльцу диких видов для стимуляции партеногенетического развития клеток зародышевого мешка [7]. Поэтому межвидовую гибридизацию нередко используют для получения гаплоидных растений.

Экспериментальные исследования ряда авторов показали, что способность завязей и семяпочек к индуцированному гиногенезу и каллусообразованию контролируется генетически [2, 8, 9], а также зависит от стадии развития зародышевого мешка [1, 9, 10].

Как отмечено многими исследователями, гиногенез in vitro идет двумя путями: образование эмбриоидов или же формирование каллусной ткани, а для некоторых культур характерны оба пути развития [2]. Существует мнение, что регенерация растения из каллуса, через соматический эмбриогенез более выгодна, чем органогенез, поскольку соматический зародыш происходит из одной клетки, тогда как при органогенезе побег может формироваться из многих клеток. Поэтому растения, полученные путем соматического эмбриогенеза, генетически однородны, в отличие от растений, полученных посредством органогенеза [11].

Для многих видов, как однодольных, так и двудольных растений, подобраны условия индуцирования каллусной ткани. Однако существуют виды, трудно регенерирующие в культуре и с низким выходом регенерантов. К их числу относятся и представители семейства *Linaceae*. Культивирование клеток и тканей *Linum usitatissimum* представляет, прежде всего, практический интерес, так как лен одна из важнейших технических культур, которая дает два очень важных для народного хозяйства продукта – волокно и масло.

В настоящей работе делается попытка изучить и оптимизировать условия ввода в культуру изолированных неоплодотворенных семяпочек льна масличного и их дальнейшего культивирования с целью получения гаплоидных и дигаплоидных растений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материнской формы для культуры семяпочек использовали гибриды льна масличного (*Linum usitatissimum* L.*)* М12 × М24 и М24 × М12, а также сорт Айсберг. Для стимуляции партеногенетического развития клеток зародышевого мешка применяли пыльцу однолетнего дикого вида *Linum grandiflorum* L., а также многолетних диких видов *L.Komarovii* Juz*., L.violascens* Bge*., L.hirsutum* L*., L.tenuifolium* L*., L.austriacum* L., *L.perenne* L.

Бутоны льна кастрировали за день до раскрытия цветков и изолировали ватными изоляторами. В день кастрации завязи опыляли чужеродной пыльцой. Через 6, 8 и 14 дней после опыления коробочки срывали, стерилизовали этанолом и раствором хозяйственного отбеливателя, а затем выделяли семяпочки в асептических условиях. Наименее травмированные семяпочки эксплантировали на питательную среду LMA-1 [12] с добавлением 1мг/л БАП и 0,05 мг/л ИУК, выдерживали в темноте двое суток (t=25±4°C), а затем культивировали при 16-ти часовом фотопериоде (t=25±4°C).

Для индукции органогенеза в культуре гаплоидной ткани, использовали питательные среды N_6 [13] и LMA-1 с различной концентрацией фитогормонов.

Для цитологического изучения эмбриогенную каллусную ткань фиксировали в фиксаторе Чемберлена и окрашивали препараты гематоксилином и ацетокармином [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Как видно из табл.1, опыление кастрированных бутонов культурного льна пыльцой однолетнего дикого вида стимулировало образование коробочек. Как правило, в трех из четырех случаев при нанесении пыльцы *Linum grandiflorum* L. на рыльца *Linum usitatissimum* L. наблюдали формирование коробочек.

Анализ показал, что семяпочки, выделенные через 14 дней после опыления, были непригодными для посадки на питательную среду. В большинстве случаев они были высохшими либо с видимыми погибшими зародышами, либо с недоразвитыми прозрачными структурами. Пригодными для

последующего культивирования были семяпочки, выделенные через 6 и 8 дней после опыления. В зависимости от комбинации скрещивания количество выделенных семяпочек на одну сформировавшуюся коробочку варьировало от 1,0 до 4,2.

Отличий в количестве семяпочек на одну коробочку, также как и визуальных отличий в развитии семяпочек, при выделении их через 6 и 8 дней не наблюдали. Вместе с тем, высаженные на питательную среду 8-ми дневные семяпочки не развивались, независимо от комбинации скрещивания, тогда как часть 6-ти дневных семяпочек в дальнейшем формировала либо эмбриогенный каллус, либо развивалась по пути эмбриогенеза.

При опылении культурного льна (сорт Айсберг) пыльцой других диких видов (L.Komarovii, L.violascens, L.hirsutum, L.tenuifolium, L.austriacum) коробочки не завязывались.

Всего через 6 и 8 дней после опыления нами было собрано 165 коробочек, из которых было выделено 331 семяпочку, пригодную для посадки на питательную среду, что составило 20,1% от общего количества семяпочек. Другие 1319 семяпочек были непригодными для дальнейшего культивирования. Из 113-ти 6-ти дневных семяпочек, высаженных на питательную среду, 10 (8,8%) сформировали эмбриогенный каллус и 2 (1,8%), развивались по пути эмбриогенеза (Табл.1).

Таблица 1. - Результаты развития неоплодотворенных семяпочек льна масличного при их культивировании на искусственной питательной среде.

Рост in vivo, дн.	Бутонов опылено, шт.	Коробочек собрано		Количество выделенных семяпочек		Кол-во высаженных на пит.среду семяпочек, шт.	Среда	Тип развития семяпочек		Образование соматических зародышей	Регенерация побегов из каллуса
		шт	% от опылен. бутонов	Всего, шт.	На одну короб., шт.			Каллусогенез, шт	Эмбриогенез, шт		
M12 x M 24											
6	15	14	93,3	23	1,6	10	LMA-1+	1	-	-	-
8	13	11	84,6	46	4,2	28	1мг/л	-	-	-	-
14	7	5	71,4	1	0,2	-	БАП+ 0,05мг/л ИУК	-	-	-	-
M24 x M12											
6	28	23	82,1	85	3,7	43		4	2	2	3
8	19	18	94,7	50	2,7	26	–"–	-	-	-	-
14	14	13	92,8	-	-	-		-	-	-	-
Сорт Айсберг											
6	61	50	81,9	108	2,1	60		5	-	5	5
8	23	17	73,9	18	1,0	-	–"–	-	-	-	-
14	17	14	82,3	-	-	-		-	-	-	-

Культивирование неоплодотворенных семяпочек на питательных средах приводило, в одном случае, к прямому гиногенезу, при котором гаплоидные зародыши формировали небольшой побег или корешок, в другом случае - к дедифференциации зародышей в клетки эмбриогенного каллуса (Табл.1).

В первом случае, у основания побега и корешка через некоторое время сформировался каллус белого цвета. После пересадки побега на питательную среду МС для укоренения, рост его прекратился. Каллус, образованный у корешка, пассировали на питательную среду N_6 с добавлением 1 мг/л БАП. При этом наблюдалось формирование зеленых морфогенных участков.

Во втором случае из всех каллусов, культивировавшихся в течение двух месяцев на питательной среде N_6 с 1мг/л БАП, начинали регенерировать побеги. В настоящее время материал находится в культуре *in vitro*.

В комбинации Айсберг × *Linum grandiflorum* каллусную ткань, полученную из незрелых зародышей на питательной среде LMA-1 с добавлением 1мг/л БАП и 0,05мг/л ИУК, некоторое время культивировали (I пассаж) на среде LMA-1 с гормонами (1-й вариант) и безгормональной среде N_6 (2-й вариант) (Табл.2).

Затем каллусы обоих вариантов в течение 9-ти дней культивировали на питательных средах LMA-1 и N_6 с повышенным содержанием фитогормонов (II пассаж), после чего материал переносили на среду N_6 с уменьшенным (3мг/л БАП) содержанием фитогормонов (III пассаж). После пассирования каллуса на питательную среду N_6, содержащую 3мг/л БАП, видно, что наилучшая регенерация была достигнута во втором варианте, в котором каллусную ткань в течение определенного времени культивировали на безгормональной среде N_6. В первом же варианте лишь в отдельных случаях наблюдали небольшие участки регенерации (Табл.2).

Таблица 2. - Влияние состава питательных сред на процессы развития каллуса и регенерации у льна масличного.

Вариант	Среда для роста зародышей	I пассаж	II пассаж	III пассаж	Регенерация, +/-	Развитие каллуса, +/+++
1	LMA-1+1мг/л БАП+0,05мг/л ИУК	LMA-1+1мг/л БАП+1мг/л ИУК	LMA-1+2мг/л кинетин +0,5мг/л ИУК+0,25мг/л НУК LMA-1+2мг/л БАП+0,5мг/л ИУК N_6+2мг/л кинетин +0,5мг/л ИУК+0,25 мг/л НУК N_6+2мг/л БАП+0,5мг/л ИУК	N_6+3мг/л БАП –"– –"– –"–	+ + - -	++ ++ +++ +++
2	LMA-1+1мг/л БАП+0,05мг/л ИУК	N_6	LMA-1+2мг/л кинетин +0,5мг/л ИУК+0,25мг/л НУК LMA-1+2мг/л БАП+0,5мг/л ИУК N_6+2мг/л кинетин +0,5мг/л ИУК+0,25 мг/л НУК N_6+2мг/л БАП+0,5мг/л ИУК	N_6+3мг/л БАП –"– –"– –"–	+ + + +	+ ++ ++ +++

Что касается характера развития каллусной ткани в процессе культивирования, было отмечено, что на средах LMA-1 и N_6 с 2мг/л БАП и 0,5мг/л ИУК она развивалась более интенсивно, чем на средах содержащих 2мг/л кинетина, 0,5мг/л ИУК и 0,25мг/л НУК, на которых наблюдалось значительное угнетение роста и развития каллуса (Табл.2). Однако после пересадки каллусов на новую среду (без кинетина, НУК и ИУК) частота регенерации побегов была выше в том случае, когда каллусную ткань в предыдущем пассаже культивировали на среде с добавлением кинетина.

Полученные результаты согласуются с литературными данными [15-17], согласно которым при увеличении срока культивирования ткани в условиях, индуцирующих стеблевой морфогенез, количество побегов, возникающих в ткани, возрастает, причем оно пропорционально увеличению срока действия экзогенных фитогормонов. Полагают, что компетенция основной массы клеток каллусной ткани, неорганизованно растущей в культуре in vitro, не позволяет им участвовать в морфогенетическом процессе. Однако компетентные клетки могут возникать в процессе культивирования каллуса в условиях, индуцирующих стеблевой морфогенез. Временной интервал, в течение которого происходит индукция компетентных клеток, а затем детерминация индуцированных клеток, является величиной постоянной, равной приблизительно 9-12 дням.

ВЫВОДЫ

1. Оптимальный срок для введения в культуру in vitro незрелых семяпочек культурного льна составил 6 суток после его опыления пыльцой дикого вида; 8-ми дневные семяпочки в культуре in vitro не развивались, а 14-ти дневные были нежизнеспособными уже в момент их выделения. В большинстве случаев (около 9%) развитие семяпочек *in vitro* шло по пути каллусогенеза, и лишь 1,8% семяпочек развивались по пути эмбриогенеза.

2. Регенерация из каллуса от незрелых зародышей была лучшей при его культивировании в одном из пассажей на безгормональной среде, чем на среде с постоянным наличием гормонов.

3. Развитие каллусной ткани было более интенсивным на средах с добавлением БАП и ИУК, чем с ИУК, НУК и кинетином, однако культивирование каллусной ткани на питательных средах, содержащих кинетин, в отдельных случаях усиливало процессы регенерации с образованием множества побегов.

ЛИТЕРАТУРА

1. San Noeum L.H., Haploids d`Hordeum, *Vulgare* L. par culture in vitro non fecondis //Animal Ameloior. Plantes.-1976.-№ 26.-P.751-754.

2. М.К. Павлова. Культура неоплодотворенных завязей и семяпочек: возможности и перспективы.// Сельскохозяйственная биология. - 1987, № 1. - С.27-33.

3. Поляков А.В., Кельнер Е.В., Лемешко И.И., и др. Органогенез и регенерация у льна-долгунца в культуре in vitro: Технические культуры: селекция, технология, переработка. - М.: Агропромиздат, 1991. – 272 с.

4. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И. Особенности регенерации льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Биотехнология. – 2000. - № 6 - С. 34-40.

5. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко, Г.И. Тихоненко, М.И. Прокофьев. - М.: ВО Агропромиздат, 1990. - 320 с.

6. Суриков И.М., Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., и др. К вопросу о преодолении и использовании межвидовой несовместимости сельскохозяйственных растений с помощью методов in vitro // Сельскохозяйственная биология. – 1986. - №4. - С. 3-9.

7. Никитина Н.И., Федоренко Т.С., Боровков А.Ю. Культура неоплодотворенных семяпочек подсолнечника // Научно-технич. бюлл. ВНИИМК. – 1989. – Вып. 3. - №106.- С. 14-16

8. Zhy Z.C., Liu Z.Y., Wu H.S. Development of embryoids from unpollinated *Nicotiana* ovaries cultured in vitro // Acta Botanica Sinica. – 1981. – Vol. 23. – P.499-501.

9. Zhou C., Jang H.Y. Induced of haploid rice plantlets by ovary culture // Plant Sci. – 1981. – Vol. 20. – P.231-237.

10. Huang Q.H., Jang H.Y., Zhou C. Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Horfeum vulgare* L. // Acta Botanica Sinica. – 1982. – Vol. 24, № 4. – P.295-300.

11. Антонова Т.С., Боровков А.Ю., Зезуль Т.Г., Краснянский Е.Ф. Соматический эмбриогенез в каллусе от незрелых зародышей подсолнечника // Сельскохозяйственная биология. – 1992. - №1. - С. 36-41.

12. Питательная среда для культивирования пыльников льна: ПАТ. 2120741 РФ. - 1988. - Бюлл. №30.

13. Chu C.C. The N_6 medium and its application to anther culture of cereal crops: Proc of Synp. on Plant Tissue Culture. - Peking: 1978. – 43p.

14. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. - 271с.

15. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М.: Наука,1991. – С. 166-185.

16. Christianson M.L., Warnick D.A. Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis // Ibid. - 1984. – Vol.1, № 101. - P.382-390.

17. Flinn B.S., Webb D.T., Newcamp W. The role of cell clusters and promeristomouds in determination and completens for caulogenesis by Pinus strobes cotuledons in vitro // Canad J. Bot. - 1988. - Vol. 66. - P.1556-1565.