

МІЩЕНКО С. В.[✉], КРИВОШЕЄВА Л. М., СРІБНИЙ М. В.

Інститут луб'яних культур НААН України,

Україна, 41400, Сумська обл., м. Глухів, вул. Терещенків, 45, ORCID: 0000-0002-1979-4002, 0000-0001-6688-6930, 0000-0001-7809-8448

[✉] serhii-mishchenko@ukr.netОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ СЕЛЕКЦІЙНИХ ОЗНАК
У СОМАКЛОНІВ *LINUM USITATISSIMUM* L.

Мета. Визначення рівня прояву, ступеня мінливості та характеру успадкування основних селекційних ознак соматоклонів льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.) у зв'язку з можливістю їх використання як вихідного матеріалу. **Методи.** Гіпокотильні й епікотильні сегменти для отримання калюсу і соматичного ембріогенезу культивували *in vitro* на живильному середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням 1,00 мг/л 6-бензиламінопурину і 0,05 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти, 30 г/л сахарози, фото-періоді 16 год, освітленості 2500 лк, відносній вологості повітря 60–80 %, температурі повітря 22–24°C. Соматоклони адаптували *in vivo*, а їх потомство вивчали у лунковому розсаднику. **Результати.** Отримані соматоклони сорту Глінум за випробування в польових умовах за основними селекційними ознаками істотно не відрізнялися від контрольного варіанта, однак серед потомства можна виділити окремі цінні індивідуальні рослини для подальшої селекції. **Висновки.** Характер кореляційних зв'язків між ознаками свідчить про можливість створення селекційного матеріалу одночасно з високими показниками волокнистості й насінневої продуктивності, високими масою волокна і його вмістом; дозволяють проводити добір на волокнистість за непрямими ознаками – загальною і/або технічною довжиною стебла, масою стебла. Перспективним напрямом є використання соматоклонів як джерел високого рівня прояву ознаки кількості коробочок на рослині (до 17 шт.).

Ключові слова: льон звичайний, *in vitro*, *in vivo*, соматоклони, селекція.

Льон звичайний (*Linum usitatissimum* L.) – традиційна сільськогосподарська культура зони Українського Полісся, яка може застосовуватися у різних напрямках, але здебільшого його вирощують для отримання натурального волокна, що може використовуватися у текстильній промисловості (довгунець), а також насіння, харчової або технічної олії (олійний або довгунець).

Незважаючи на те, що льон культивують декілька тисячоліть, він і сьогодні залишається предметом наукових пошуків, присвячених філогенезу і таксономії, генетиці та селекції, технології вирощування і перероблення тощо.

В останні роки цей вид знаходиться 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 в рослин-регенерантів, що створює основу для їх подальшого використання, перш за все, у селекції. З метою активізації селекційного процесу обґрунтовуються стратегії застосування явища мікроклонального розмноження, регенерації рослинних клітин і тканин льону звичайного, методів соматичного ембріогенезу, культури ізольованих протопластів, клітинних суспензій 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 й ін. [1, 2]. Останнім часом все більшої популярності набуває використання калюсних культур льону звичайного та інших видів роду *Linum* L. *in vitro*, отриманих на основі стеблових і листкових експлантів, а також суспензійної культури для синтезу цінних вторинних метаболітів – лігнанів, які використовують у медицині [3–6].

Ефективність використання культури *in vitro* для цього виду залежить від умов культивування: по-перше, фітогормонального складу живильного середовища, який індукуює інтенсивний калюсогенез і органогенез [7–10]; по-друге, від джерела вуглеводів – сахарози, глюкози, мальтози чи лактози [11, 12]; по-третє, від генотипу селекційного матеріалу [11–14]; по-четверте від попередньої підготовки експлантів, зокрема гіпокотильних сегментів, до інокуляції та конкуренції між ними [1, 15] тощо.

© МІЩЕНКО С. В., КРИВОШЕЄВА Л. М., СРІБНИЙ М. В.

Загалом, технології *in vitro* щодо льону звичайного досить добре розроблені, особливо щодо фітогормонального складу живильного середовища, який індукує інтенсивний калюсогенез і органогенез, однак у проаналізованих джерелах у ролі об'єкта досліджень здебільшого використано зразки олійного льону, а не льону-довгунця, який значно відрізняється від першого різновиду за морфологічними, фізіологічними і генетичними ознаками та властивостями. Для інтенсивного калюсоутворення та соматичного ембріогенезу льону-довгунця *in vitro* доцільно використовувати: 1) 6-бензиламінопурин (БАП); 2) БАП у поєднанні з 1-нафтилоцтовою кислотою (НОК) чи індол-3-оцтовою кислотою (ІОК) [1]. При цьому оптимальні концентрації в мг/л БАП знаходяться в межах $1,0 \leq \text{БАП} \leq 1,75$; оптимальні концентрації БАП за умови додавання до живильного середовища $0,05 \text{ мг/л НОК} - 0,5 \leq \text{БАП} \leq 2,0$; оптимальні концентрації НОК за умови додавання $1,0 \text{ мг/л БАП} - 0,025 \leq \text{НОК} \leq 0,150$; оптимальні концентрації ІОК за умови додавання $1,0 \text{ мг/л БАП} - 0,05 \leq \text{ІОК} \leq 0,50$ [1].

Разом з тим, актуальним залишається питання визначення рівня прояву, ступеня мінливості та характеру успадкування основних селекційних ознак соматклонів у зв'язку з можливістю їх використання як вихідного матеріалу.

Матеріали і методи

Об'єкт досліджень – сорт *L. usitatissimum* L. convar. *elongatum* Глінум. Його насіння стерилізували 3,0 %-м водним розчином натрій гіпохлориту (NaOCl) з експозицією 12,5–15 хв, тричі промивали стерильною дистильованою водою і пророщували на агаризованому безгормональному живильному середовищі Мурасіге і Скуга з 10 г/л сахарози. Фотоперіод – 16 год, освітленість – 2500 лк, відносна вологість – 60–80 %, температура повітря – 22–24°C. На 7–15-ту добу з проростків брали гіпокотильні й епикотильні експланти. Сегменти гіпокотилія та калюсу культивували на згаданому середовищі з 30 г/л сахарози, доповненому фітогормонами – 1,00 БАП і 0,05 мг/л НОК. Потім здійснювали мікроклональне розмноження рослин-регенерантів і адаптацію їх *in vivo*. Отримане насіння соматклонів оцінювали в польових умовах у лунковому розсаднику. Проводили обліки висоти рослин, технічної довжини стебла, кількості коробочок на рослині, маси стебла, маси волокна з рослини і його вміст. Статистичну обробку даних проводили методами варіаційно-

го і кореляційного аналізу.

Результати та обговорення

За середніми даними істотної різниці за t-критерієм Стьюдента між соматклонами і контрольним варіантом (сортом льону-довгунця Глінум) за основними селекційними ознаками не встановлено. Загальна довжина стебла відповідно становила $57,4 \pm 1,73$ і $57,9 \pm 1,19$ см, технічна довжина стебла – $47,1 \pm 1,25$ і $46,4 \pm 1,20$ см, кількість коробочок з рослини – $6,2 \pm 1,07$ і $7,0 \pm 0,70$ шт., маса стебла – $0,325 \pm 0,032$ і $0,364 \pm 0,031$ г, маса волокна з рослини – $0,065 \pm 0,007$ і $0,079 \pm 0,007$ г, вміст волокна – $20,20 \pm 1,094$ і $21,57 \pm 0,443$ %. Як бачимо, спостерігалась тенденція до перевищення контрольного варіанту за ознакою технічної довжини, що є позитивним для селекції, оскільки вона детермінує високий вміст і вихід довгого волокна у льону як волокнистої культури. Разом з тим, провівши індивідуальний аналіз серед потомства соматклонів, можна виділити окремі рослини за однією чи комплексом цінних ознак для подальшої селекції. Розмах варіації (різниця між максимальним і мінімальним значенням) досліджуваних селекційних ознак у соматклонів, порівняно з сортом, є значно нижчим за більшістю ознак: відповідно 23 і 32 см за загальною довжиною стебла, 19 і 38 см за технічною довжиною стебла, 0,46 і 0,62 г за масою стебла, 0,09 і 0,17 г за масою волокна, що свідчить про стабілізацію ознак у соматклонів у результаті соматичного ембріогенезу. Тенденцію до збільшення розмаху варіації спостерігали за ознаками кількості коробочок на рослині (16 і 14 шт.) і вмісту волокна (19,8 і 13,0 % відповідно), а, отже, соматклони доцільно використати для проведення подальшого поліпшуючого чи стабілізуючого добору за цими ознаками (табл. 1).

Як правило, коефіцієнти кореляції між основними селекційними ознаками були нижчі у соматклонів, порівняно з сортом, найчіткіше дана закономірність проявляється між ознаками загальної довжини стебла і кількістю коробочок (r становить 0,73 і 0,82 відповідно), технічною довжиною стебла і масою стебла (0,19 і 0,45), технічною довжиною стебла і масою волокна з рослини (0,41 і 0,50), кількістю коробочок і масою волокна (0,64 і 0,78), масою стебла і масою волокна (0,84 і 0,97), кількістю коробочок і вмістом волокна (–0,08 і –0,24), масою волокна і вмістом волокна в стеблі (0,27 і 0,43) тощо. Такі особливості взаємозв'язку між ознаками гіпоте-

тично сприяють полегшенню проведення добору для створення вихідного селекційного матеріалу і вираженню у фенотипі принципово нового комплексу цінних ознак та властивостей, наприклад одночасно з високими показниками волокнистості й насінневої продуктивності, високими масою волокна з рослини (а значить високим урожаєм волокна з одиниці площі) і його вмістом. А також дозволяють проводити добір на волокнистість за непрямим ознаками – загальною і/або технічною довжиною стебла, масою стебла тощо (табл. 2).

Найбільша цінність отриманих соматклонів із сорту Глінум полягала у виявленні рекордної кількості коробочок у потомстві одного соматклону – 17 шт. (за середнього значення у контролі 7 шт.). Кумулятивний графік частоти ознаки кількості коробочок на рослинах показує, що в першому поколінні соматклонів найбільша частота становила 25,05 % у класі 10 шт., у другому поколінні – 46,1 % у класі 8 шт., а в контрольному варіанті – по 16,7 % у класах 4 і 5 шт. (рис.).

Таким чином, ознака високої кількості коробочок певною мірою успадковувалася, а ство-

рений *in vitro* селекційний матеріал заслуговує на подальшу селекцію для створення сортозразка льону-довгунця з підвищеною насінневою продуктивністю (більше коробочок – більше насіння з рослини).

Висновки

Додавання до живильного середовища Мурасіге і Скуга 1,00 БАП і 0,05 мг/л НОК сприяло інтенсивному калюсогенезу на гіпокотильних й епікотильних сегментах льону-довгунця та в подальшому органогенезу. Отримані рослини-регенеранти вдалось мікроклонально розмножити й адаптувати *in vivo*. Отримані соматклони сорту Глінум за випробування в польових умовах за основними селекційними ознаками істотно не відрізнялися від контрольного варіанта, однак серед потомства можна виділити окремі цінні індивідуальні рослини за однією чи комплексом цінних ознак для подальшої селекції. Розмах варіації ознак у соматклонів, порівняно з сортом є значно нижчим за більшістю ознак, що свідчить про стабілізацію ознак у соматклонів у результаті соматичного ембріогенезу.

Таблиця 1. Мінливість селекційних ознак соматклонів льону-довгунця сорту Глінум

Селекційні ознаки	Контроль		Соматклони	
	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	R	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	R
Загальна довжина стебла, см	57,4 ± 1,73	23	57,9 ± 1,19	32
Технічна довжина стебла, см	47,1 ± 1,25	19	46,4 ± 1,20	38
Кількість коробочок, шт.	6,2 ± 1,07	16	7,0 ± 0,70	14
Маса стебла, г	0,325 ± 0,032	0,46	0,364 ± 0,031	0,62
Маса волокна, г	0,065 ± 0,007	0,09	0,079 ± 0,007	0,17
Вміст волокна, %	20,20 ± 1,094	19,8	21,57 ± 0,443	13,0

Примітка. R – розмах варіації ($R = \bar{x}_{\max} - \bar{x}_{\min}$).

Таблиця 2. Коефіцієнти парної кореляції селекційних ознак соматклонів льону-довгунця сорту Глінум (чисельник) у порівнянні з контролем (знаменник)

Кореляція (r)	ТДС	КК	МС	МВ	ВВ
ЗДС	$\frac{0,47^*}{0,45^*}$	$\frac{0,82^*}{0,73^*}$	$\frac{0,92^*}{0,91^*}$	$\frac{0,91^*}{0,86^*}$	$\frac{0,05}{0,08}$
ТДС		$\frac{0,09}{-0,19^*}$	$\frac{0,45^*}{0,19^*}$	$\frac{0,50^*}{0,41^*}$	$\frac{0,39^*}{0,31^*}$
КК			$\frac{0,87^*}{0,84^*}$	$\frac{0,78^*}{0,64^*}$	$\frac{-0,24^*}{-0,08^*}$
МС				$\frac{0,97^*}{0,84^*}$	$\frac{0,07}{-0,13}$
МВ					$\frac{0,43^*}{0,27^*}$

Примітки: ЗДС – загальна довжина стебла, ТДС – технічна довжина стебла, КК – кількість коробочок, МС – маса стебла, МВ – маса волокна, ВВ – вміст волокна; * – істотно на рівні значимості 0,05.

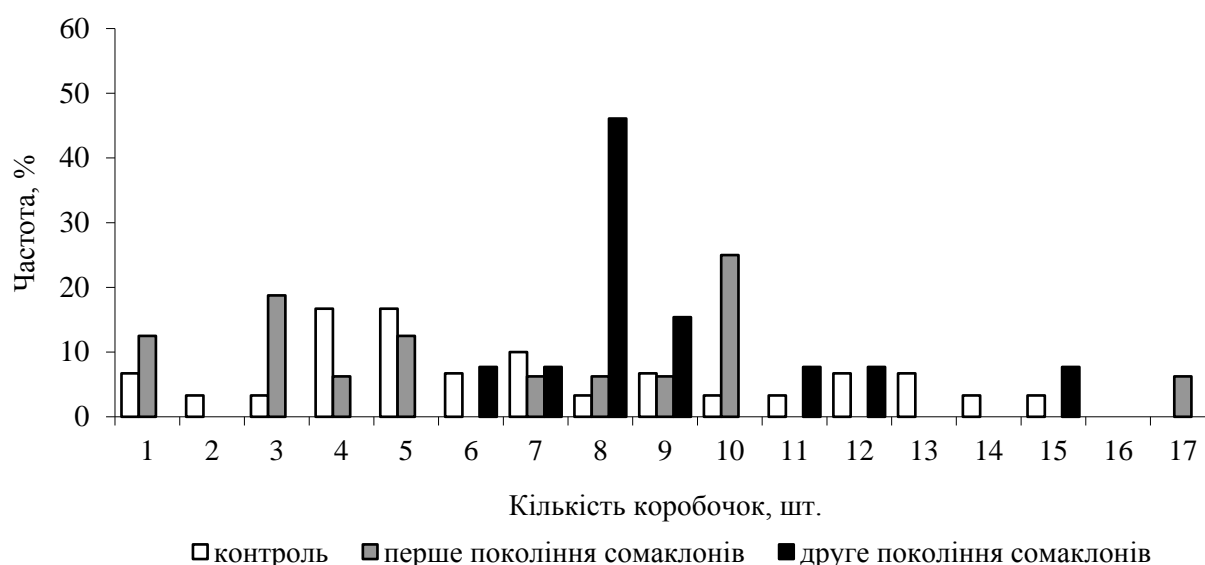


Рис. Кумулятивний графік частоти ознаки кількості коробочок на рослинах соматоклонів льону-довгунця сорту Гліну́м.

Тенденція до збільшення розмаху варіації спостерігали за ознаками кількості коробочок на рослині і вмісту волокна, тобто соматоклони доцільно використати для проведення подальшого поліпшуючого чи стабілізуючого добору за цими ознаками. Встановлений характер кореляційних зв'язків між селекційними ознаками свідчить про гіпотетичну можливість створення селекційного матеріалу одночасно з високими

показниками волокнистості й насінневої продуктивності, високими масою волокна з рослини і його вмістом, дозволяють проводити добір на волокнистість за непрямими ознаками – загальною і/або технічною довжиною стебла, масою стебла. Перспективним напрямом є використання соматоклонів як джерел високого рівня прояву ознаки кількості коробочок на рослині.

References

- Mishchenko S. V. Culture of isolated cells and tissues of flax (*Linum usitatissimum* L.) *in vitro*. In *The Current State of Fundamental and Applied Natural Sciences Research*. Riga : Baltija Publishing, 2022. P. 232–261. doi: 10.30525/978-9934-26-212-8-11 [in Ukrainian]
- Soroka A. I. Optimization of the callus formation process in flax *in vitro*. *Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Oil Crops of NAAS*. 2022. No. 32. P. 26–33. doi: 10.36710/IOC-2022-32-03. [in Ukrainian]
- Zahir A., Nadeem M., Ahmad W., Giglioli-Guivarc'h N., Hano C., Abbasi B. H. Chemogenic silver nanoparticles enhance lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2019. Vol. 136 (3). P. 589–596. doi: 10.1007/s11240-018-01539-6.
- Anjum S., Komal A., Drouet S., Kausar H., Hano C., Abbasi B. H. Feasible production of lignans and neolignans in root-derived *in vitro* cultures of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plants*. 2020. Vol. 9. 409. doi: 10.3390/plants9040409.
- Khan I., Khan M. A., Shehzad M. A. et al. Micropropagation and production of health promoting lignans in *Linum usitatissimum*. *Plants*. 2020. Vol. 9 (6), 728. P. 1–18. doi: 10.3390/plants9060728.
- Asad B., Khan T., Gul F. Z., Ullah M. A., Drouet S., Mikac S., Garros L.; Ferrier M., Bose S., Munsch T., Tungmunthum D., Lanoue A Giglioli-Guivarc'h N., Hano C., Abbasi B. H. Scarlet flax *Linum grandiflorum* (L.) *in vitro* cultures as a new source of antioxidant and anti-inflammatory lignans. *Molecules*. 2021. Vol. 26. 4511. doi: 10.3390/molecules26154511.
- Blinstrubienė A., Burbulis N., Kuprienė R. Effect of genotype and medium composition on linseed (*Linum usitatissimum*) ovary culture. *Biologia*. 2011. Vol. 66 (3). P. 465–469. doi: 10.2478/s11756-011-0028-z.
- Janowicz J., Niemann J., Wojciechowski A. The effect of growth regulators on the regeneration ability of flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl explants in *in vitro* culture. *BioTechnologia*. 2012. Vol. 93 (2). P. 135–138. doi: 10.5114/bta.2012.46578.
- Mishchenko S. V. Influence of 6-benzylaminopurine on intensity of callusogenesis and organogenesis of *Linum usitatissimum* L. under *in vitro* conditions. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*. 2019. Vol. 2 (47). P. 92–100. doi: 10.35550/vbio2019.02.092. [in Ukrainian]
- Mishchenko S. V. Effect of 1-naphthylacetic and indol-3-acetic acid on the intensity of callusogenesis and organogenesis of *Linum usitatissimum* L. *in vitro*. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 2021. Vol. 28. P. 100–105. doi: 10.7124/FEEO.v28.1383. [in Ukrainian]

11. Millam S., Obert B., Pret'ová A. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2005. Vol. 82 (1). P. 93–103. doi: 10.1007/s11240-004-6961-6.
12. Burbulis N., Blinstrubienė A. Genotypic and exogenous factors affecting linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *J. Food Agricult. Environ.* 2011. Vol. 9 (3). P. 364–367. doi: 10.1234/4.2011.2285.
13. Blinstrubienė A., Burbulis N., Masienė R. Genotypic and exogenous factors affecting linseed ovary culture. *Zemdirbyste-Agriculture.* 2017. Vol. 104 (3). P. 243–248. doi: 10.13080/z-a.2017.104.031.
14. Mishchenko S. V., Kryvosheeva L. M. *In vitro* callusogenesis and organogenesis of different of *Linum usitatissimum* L. accessions. *Plant Genetic Resources.* 2018. No. 23. P. 49–58. doi: 10.36814/pgr.2018.23.04. [in Ukrainian]
15. Yildiz M., Sağlık C., Telci C., Erkilich E. G. The effect of *in vitro* competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. *Turk. J. Bot.* 2011. Vol. 35 (2). P. 211–218. doi: 10.3906/bot-1005-26.

MISHCHENKO S. V., KRYVOSHEEVA L. M., SRIBNYI M. V.

*Institute of Bast Crops of the Natl. Acad. Agr. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 41400, Sumska obl., Hlukhiv, Tereshchenkiv str., 45*

FEATURES OF THE EXPRESSION OF BREEDING TRAITS IN *LINUM USITATISSIMUM* L. SOMACLONES

Aim. Determining the level of expression, variability and features of inheritance of the main breeding traits of flax somaclones (*Linum usitatissimum* L.) in connection with the possibility of their use as initial selection material was the aim of our research. **Methods.** Hypocotyl and epicotyl segments for the induction of callusogenesis and somatic embryogenesis were cultured *in vitro* on the nutrient medium of Murashige and Skoog with the addition of 1.00 mg/l 6-benzylaminopurine and 0.05 mg/l 1-naphthylacetic acid, 30 g/l sucrose, a photoperiod of 16 h, illumination 2500 lux, relative air humidity 60–80 %, air temperature 22–24°C. Somaclones were adapted *in vivo*, and their generations were studied in the field. **Results.** Somaclones of the Hlinum variety were tested in the field according to the main selection traits and were not significantly inferior to the control variant; however, among them it is possible to single out some valuable individual plants for further breeding. **Conclusions.** Peculiarities of correlations between traits indicate the possibility of creating breeding material with a high level of fibrousness and seed productivity at the same time, high fiber mass and its content, allow selection for fibrousness by indirect traits – total and/or technical stem length, stem mass. A promising direction is the use of somaclones as sources of a high level of manifestation of the trait of the number of capsules on a plant (up to 17 pcs.).

Keywords: flax, *in vitro*, *in vivo*, somaclones, breeding.