

МІЩЕНКО С. В.^{1✉}, МАЧУЛЬСЬКИЙ Г. М.²

¹ Інститут луб'яних культур НААН України,

Україна, 41400, Сумська обл., м. Глухів, вул. Терещенків, 45, ORCID: 0000-0002-1979-4002

² Національний університет «Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка,

Україна, 14013, м. Чернігів, вул. Гетьмана Полуботка, 53, ORCID: 0000-0002-7164-1695

✉ serhii-mishchenko@ukr.net

МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ ЗБІЛЬШЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ КАЛЮСОГЕНЕЗУ І ОРГАНОГЕНЕЗУ *LINUM USITATISSIMUM* L. В УМОВАХ *IN VITRO*

Мета. Удосконалення методичних прийомів збільшення ефективності отримання калюсних культур і соматиклонів льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.) *in vitro*. **Методи.** Гіпокотильні сегменти культивували на живильному середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням 30 г/л сахарози і різних концентрацій фітогормонів, фотоперіоді 16 год, освітленості 2500 лк, відносній вологості повітря 60–80%, температурі повітря 22–24°C. **Результати.** Здатність до утворення калюсу і соматичного ембріогенезу льону звичайного залежить від фітогормонального складу середовища, розміру експлантів та відстані між ними. **Висновки.** Для інтенсивного калюсоутворення та соматичного ембріогенезу *in vitro* оптимальні концентрації БАП в мг/л можна виразити нерівністю $1,0 \leq \text{БАП} \leq 1,75$; оптимальні концентрації БАП за умови додавання до живильного середовища 0,05 мг/л НОК – нерівністю $0,5 \leq \text{БАП} \leq 2,0$; оптимальні концентрації НОК за умови додавання 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,025 \leq \text{НОК} \leq 0,150$; оптимальні концентрації ІОК за умови додавання 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,05 \leq \text{ІОК} \leq 0,50$. Ефективним є додавання 0,5 мг/л ГК₃ до середовища з НОК і БАП. Оптимальним є використання гіпокотильних експлантів довжиною 3–6 мм та розміщення їх на відстані 1,5–2,5 см один від одного. Органогенність калюсу істотно знижується в процесі субкультивування.

Ключові слова: льон звичайний, *in vitro*, фітогормони, калюс, органогенез.

Льон звичайний (*Linum usitatissimum* L.) є важливою сільськогосподарською культурою комплексного використання. Здебільшого його вирощують для отримання натурального волокна, що може використовуватися у текстильній промисловості, а також насіння, харчової або технічної олії.

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, підкреслюючи перспективність цієї сільськогосподарської культури; при цьому для досягнення поставленої мети використовують досить різні поєднання фітогормонів та вуглеводів у живильному середовищі [1–8]. Культивування рослинних клітин і тканин саме *in vitro* супроводжується виникненням значного цитоморфологічного і генетичного різноманіття як у калюсних тканинах, так і в рослинах-регенерантах, що створює основу для їх подальшого використання в селекції.

Останнім часом все більшої популярності набуває використання льону звичайного та інших видів роду *Linum* L. у новому напрямі завдяки здатності цих рослин до синтезу вторинних метаболітів – лігнанів, які використовують для лікування різних типів онкологічних захворювань. Отримують такі сполуки з калюсних культур льону *in vitro* на основі стеблових і листкових експлантів, інокульованих на середовищі Мурасіге і Скуга, доповненому різними концентраціями 1-нафтилоцтової кислоти (НОК), тїдіазурону (ТДЗ) і 6-бензиламінопурину (БАП) [9], на основі гіпокотильних сегментів за впливу ТДЗ і кінетину (КІН) [10] або в клітинній суспензійній культурі [11]. Калюси, отримані із листків (1,0 мг/л НОК у середовищі), накопичують найбільшу біомасу і характеризуються найвищим рівнем антиоксидантної активності; у той же час найвищий рівень синтезу флавоноїдів і фенольних сполук спостерігають у калю-

© МІЩЕНКО С. В., МАЧУЛЬСЬКИЙ Г. М.

сах, які походять зі стеблових експлантів. Ці результати свідчать про те, що НОК по-різному впливає на продукування лігнанів і неолігнанів у калюсній культурі льону, що відкриває широкі можливості для розробки стратегій зі збільшення виробництва зазначених цінних метаболітів [9].

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 так званого олійного льону, а не льону-довгунця, що значно відрізняється від першого різновиду за морфологічними, фізіологічними і генетичними ознаками та властивостями. Окрім того, за даними наукової літератури, ефективність органогенезу залежить ще й від попередньої підготовки експлантів (гіпокотильних сегментів) та конкуренції між ними [12].

Зважаючи на недостатню розробленість проблеми удосконалення методичних прийомів збільшення ефективності отримання калюсних культур і соматиклонів, метою нашої роботи було: встановлення впливу співвідношення ауксинів і цитокінінів екзогенного походження, включення гіберелової кислоти (ГК₃) у живильне середовище, з'ясування впливу розмірів гіпокотильних експлантів і відстані між ними на інтенсивність калюсоутворення і органогенезу льону-довгунця, встановлення залежності органогенезу від тривалості субкультування калюсу.

Матеріали і методи

Об'єкт досліджень – сорт *L. usitatissimum* L. *convar. elongatum* Глінум. Насіння стерилізували 3,0% водним розчином гіпохлориту натрію (NaOCl) з експозицією 12,5–15 хв, тричі промивали стерильною дистильованою водою і пророщували на агаризованому безгормональному живильному середовищі Murashige T. and Skoog F. (1962) з 10 г/л сахарози. На 7–15 добу з проростків брали гіпокотильні експланти. Сегменти гіпокотилів та калюсу культивували на згаданому середовищі з 30 г/л сахарози, доповненому фітогормонами різних концентрацій і поєднань, що буде детально описано в ході викладу матеріалу. Фотоперіод – 16 год, освітленість – 2500 лк, відносна вологість – 60–80%, температура повітря – 22–24°C. Усі обліки, крім динаміки накопичення калюсу, проводили на 35 добу культивування, вибірка – не менше 30 експлантів і спостережень для кожного варіанта.

Статистичну обробку даних проводили методами варіаційного і кореляційно-регресійного аналізу.

Результати та обговорення

Льон звичайний дуже чутливий до культури *in vitro*, в результаті культивування гіпокотильних сегментів на безгормональному середовищі за окреслених кліматичних умов і фотоперіоду калюсогенез, хоча і досить слабкий, виявлено у 24,24% експлантів, частота органогенезу при цьому склала 6,06%. Слід зазначити, що 69,70–75,00% гіпокотильних експлантів формували калюсну тканину за культивування на середовищі лише з ауксинами НОК, ІОК чи 2,4-дихлорфеноксиоцтовою кислотою (2,4-Д). При цьому частота органогенезу була незначною: 6,25 і 12,90% у варіантах з 0,5 і 1,0 мг/л ІОК відповідно, 12,50 і 12,12% у варіантах з 0,05 і 0,1 мг/л НОК відповідно, регенерація пагонів майже не відбувалася у варіантах з 2,4-Д. Також калюс добре формувався на середовищах лише з цитокінінами БАП (0,5, 1,0 і 2,0 мг/л) і КІН (0,15 і 0,30 мг/л). Частота калюсогенезу відповідно становила 93,75, 100,00, 93,94, 66,66 і 83,87%, а органогенезу – 81,25, 93,55, 50,00, 48,71 і 48,38%. Поєднання ауксинів і цитокінінів, зокрема 0,05 НОК + 1,0 мг/л БАП, 0,05 НОК + 0,3 мг/л КІН, 0,5 ІОК + 1,0 мг/л БАП, 0,5 ІОК + 0,3 мг/л КІН, 0,15 2,4-Д + 0,3 мг/л КІН, 0,3 2,4-Д + 0,3 мг/л КІН і 0,3 2,4-Д + 0,6 мг/л КІН, значно сприяло утворенню калюсу у 100,00% експлантів; у варіантах з 0,15 2,4-Д + 1,0 мг/л БАП і 0,3 2,4-Д + 2,0 мг/л БАП частота калюсоутворення була дещо нижчою, але більшою від 96%. При цьому частота органогенезу мала досить суттєвий розмах варіації (від 3,12 до 96,88%). Найкращим поєднанням для ініціації утворення пагонів був варіант з НОК і БАП, а також ІОК і БАП (звичайно, в межах досліджуваних концентрацій) [8].

Таким чином, для соматичного ембріогенезу в культурі *in vitro* оптимальні концентрації БАП в мг/л можна виразити нерівністю $1,0 \leq \text{БАП} \leq 1,75$; оптимальні концентрації БАП за умови додавання до живильного середовища 0,05 мг/л НОК – нерівністю $0,5 \leq \text{БАП} \leq 2,0$; оптимальні концентрації НОК за умови додавання до середовища 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,025 \leq \text{НОК} \leq 0,150$; оптимальні концентрації ІОК за умови додавання до середовища 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,05 \leq \text{ІОК} \leq 0,50$ (табл. 1).

Таблиця 1. Оптимальні поєднання фітогормонів (мг/л) екзогенного походження для соматичного ембріогенезу льону звичайного в культурі *in vitro*

Постійна концентрація одного фітогормону	Змінна концентрація другого фітогормону у вигляді нерівності
–	$1,000 \leq \text{БАП} \leq 1,750$
0,05 НОК	$0,500 \leq \text{БАП} \leq 2,000$
1,00 БАП	$0,025 \leq \text{НОК} \leq 0,150$
1,00 БАП	$0,050 \leq \text{НОК} \leq 0,500$

Зазвичай ауксини та цитокиніни додають до живильного середовища у певному співвідношенні один до одного. Досить часто кратне збільшення чи зменшення різних груп фітогормонів до певної межі «урівноважує» протікання фізіологічних процесів, які вони детермінують, однак, як показують результати наших досліджень, у льону звичайного ця тенденція не простежується. Одне з найоптимальніших поєднань – 0,05 НОК + 1,0 мг/л БАП (співвідношення ауксин:цитокінін складає 1:20) – індукувало калусоутворення на 100,00% гіпокотильних експлантах і у 96,88% випадків – органогенез. За цього ж співвідношення (1:20) в умовах зменшення фітогормонів у п'ять разів (0,01 НОК + 0,2 мг/л БАП) калусоутворення спостерігали у 100,00% випадків, а органогенез відбувався лише на 15,62% калусів. У свою чергу додавання до живильного середовища лише 0,01 мг/л НОК або лише 0,2 мг/л БАП викликало доволі інтенсивне утворення калусу (69,70% і 74,19%) і дуже слабкий органогенез (12,12% і 9,68% відповідно). За цього ж співвідношення НОК:БАП (1:20), але за умови збільшення концентрації фітогормонів у п'ять разів (0,25 НОК + 5,0 мг/л

БАП) спостерігали поодинокі випадки калусоутворення (3,03%) і повну відсутність соматичного органогенезу (0,00%). При цьому слід відмітити, що за наявності у складі живильного середовища лише 0,25 мг/л ауксину НОК частота калусоутворення становила 62,50%, а органогенезу – 9,38%; за наявності у складі живильного середовища лише 5,0 мг/л цитокиніну БАП частота калусоутворення становила 6,25, а органогенезу – 0,00% (табл. 2).

Введення у живильне середовище фітогормонів зі співвідношенням ауксин:цитокінін 1:10 сприяло індукції інтенсивного калусогенезу, але утворення меристематичних зон і пагонів із них залишалося досить низьким. Так, за вмісту 0,01 НОК + 0,1 мг/л БАП (концентрація НОК без змін, концентрацію БАП зменшено у 10 разів порівняно з контрольним варіантом) частота калусоутворення склала 96,88%, а органогенезу – 12,50%; за вмісту 0,25 НОК + 2,5 мг/л БАП (концентрацію НОК збільшено у 5 разів, концентрацію БАП збільшено у 2,5 раза порівняно з контрольним варіантом) частота калусоутворення склала 100,00%, а органогенезу – 31,25%.

Таблиця 2. Вплив співвідношення НОК та БАП у живильному середовищі на частоту калусоутворення й органогенезу льону звичайного

Концентрація, мг/л		Співвідношення НОК:БАП	Частота, %	
НОК	БАП		калусоутворення	органогенезу
0,01	0,1	1 : 10	96,88	12,50
0,01	–	–	69,70	12,12
–	0,1	–	71,88	9,38
0,01	0,2	1 : 20	100,00	15,62
–	0,2	–	74,19	9,68
0,05	1,0	1 : 20	100,00	96,88
0,05	–	–	71,88	12,50
–	1,0	–	100,00	93,75
0,25	2,5	1 : 10	100,00	31,25
0,25	5,0	1 : 20	3,03	0,00
–	5,0	–	6,25	0,00
0,25	–	–	62,50	9,38
–	2,5	–	90,62	31,25

Примітка. Варіант 0,05 НОК + 1,0 мг/л БАП – контрольний.

За роздільного внесення НОК і БАП їх ефективність була нижчою. Таким чином, оптимальним для індукції калюсоутворення й органогенезу льону звичайного є додавання до живильного середовища визначених концентрацій регуляторів росту рослин – 0,05 НОК + 1,0 мг/л БАП, а не підбір їх за співвідношенням ауксин:цитокінін.

ГК₃ не дуже часто використовують у культурі *in vitro* (порівняно з ауксинами та цитокінінами), але вона сприяє подовженню пагонів, активує діяльність багатьох ферментів, поліпшує вуглеводний обмін, стимулює поділ і ріст клітин меристем. Дослідження показали, що поєднання 0,5 ГК₃ з 0,05 НОК і 1,0 мг/л БАП не впливало на частоту калюсогенезу (100,00% в обох варіантах досліду), однак збільшувало масу калюсу з експланта (2,29 г порівняно з 1,46 г), зменшувало частоту органогенезу (96,88% порівняно з 74,00%), але збільшувало кількість пагонів (4,5 порівняно з 3,0 шт.) і їх висоту (2,35 порівняно з 1,44 см у контрольному варіанті). Незважаючи на зниження частоти органогенезу, додавання ГК₃ у зазначеній дозі є ефективним, оскільки збільшується кількість

регенерантів, їх висота і відповідно кількість міжвузлів, тобто виникають можливості підвищення коефіцієнта подальшого розмноження соматклонів (табл. 3). При цьому істотні відмінності маси калюсу з експланта (за культивування у біологічних пробірках діаметром 20 мм) проявляються на 24 добу. З цього часу спостерігається і найбільший приріст біомаси калюсної тканини, який продовжується до 42 доби. На середовищі без додавання ГК₃ приріст маси калюсу фактично призупиняється на 35 добу культивування (рис. 1).

Інтенсивність калюсоутворення й органогенезу залежала від довжини гіпокотильного експланта, поміщеного на живильне середовище. Залежно від довжини експланта – 1–2, 3–4, 5–6, 7–8, 9–10 мм – частота калюсоутворення становила 81,25 %, 93,75 %, 100 %, 100 % і 96,88 % відповідно; маса калюсу майже не відрізнялася до варіанта з 7–8 і 9–10 мм; частота органогенезу становила 56,26 %, 59,38 %, 81,25 %, 96,88% і 93,75% відповідно; кількість пагонів істотно не відрізнялася, окрім варіанта з 9–10 мм; висота пагонів становила 0,78 см, 0,94 см, 1,09 см, 1,24 см і 1,56 см відповідно.

Таблиця 3. Вплив ГК₃ (0,5 мг/л) на інтенсивність калюсоутворення й органогенезу льону звичайного за умови наявності 0,05 НОК і 1,0 мг/л БАП у живильному середовищі

Варіант	Інтенсивність калюсогенезу		Інтенсивність органогенезу		
	частота калюсогенезу, %	маса калюсу з експланта, г	частота органогенезу, %	кількість пагонів, шт.	висота пагонів, см
Контроль (без ГК ₃)	100,0	1,46 ± 0,162	96,88	3,0 ± 0,15	1,44 ± 0,211
З додаванням ГК ₃	100,0	2,29 ± 0,217**	74,00	4,5 ± 0,15***	2,35 ± 0,239**

Примітки. ** – відмінності порівняно з контролем істотні за P < 0,01; *** – за P < 0,001.

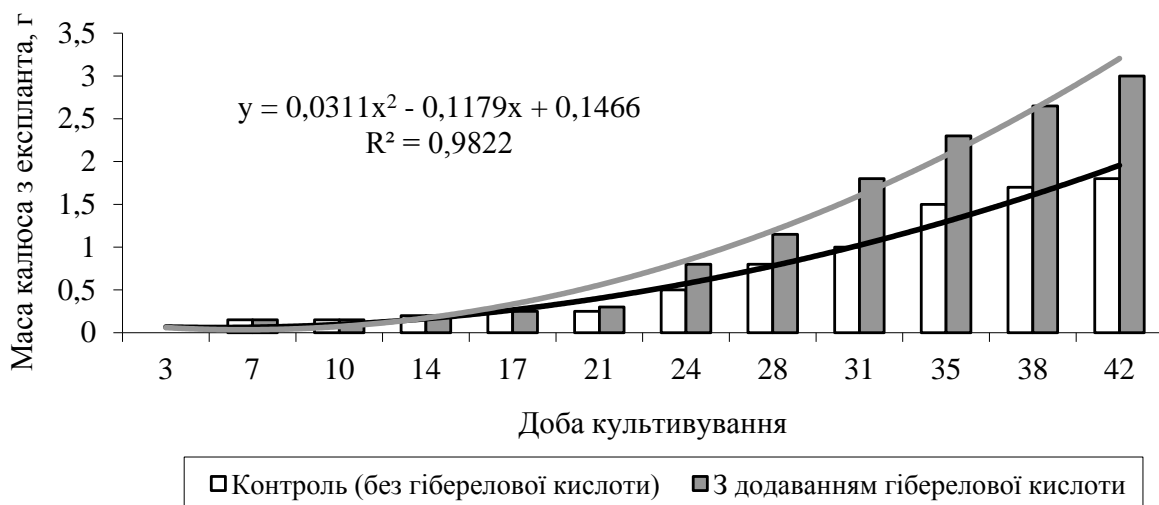


Рис. 1. Динаміка калюсоутворення за впливу ГК₃.

Як бачимо, більш довгі експланти (7–8 мм) давали найвищу частоту калусоутворення, органогенезу і кількість пагонів, але при цьому гіпокотилі можна поділити на меншу кількість сегментів, ніж, наприклад, за довжини експланта від 1 мм до 6 мм, а тому у підсумку можна отримати меншу кількість соматоклонів, що призведе до звуження соматоклональної мінливості і генетичного різноманіття матеріалу. Отже, оптимально використовувати гіпокотильні експланти довжиною від 3 до 6 мм (табл. 4).

Результативність отримання соматоклонів залежить і від ступеня конкуренції серед експлантів, який досягається різною відстанню між ними у чашках Петрі чи колбах. За розміщення гіпокотильних експлантів льону звичайного через 1,5 см, 2,0 см, 2,5 см збільшувалася інтенсивність калусоутворення, частота органогенезу, кількість пагонів, їх довжина і кількість міжвузлів. За розміщення експлантів через 1,0 см спостерігали явище стресу і зменшення частоти органогенезу та кількісних ознак утворених пагонів. За зменшення відстані між гіпокотиль-

ними експлантами до 0,5 см калус майже не утворювався, а органогенез взагалі не проходив. Збільшення відстані до 3,0 см і вище теж було недоцільним, оскільки ефективність калусоутворення і органогенезу різко знижувалася через відсутність конкуренції. Такі тенденції узгоджуються і з даними інших авторів [12]. Отже, гіпокотильні експланти льону звичайного доцільно розміщувати на відстані 1,5–2,5 см один від одного або культивувати їх по одному в біологічних пробірках діаметром 20 мм.

Органогенез залежав і від тривалості субкультивування (кількості пасажів) калусу на живильне середовище Мурасіге і Скуга, доповнене 0,05 НОК + 1,0 мг/л БАП. Вже за першого пасажу частота органогенезу із 96,77% впала до 54,83%, другого – до 22,58%, третього – до 12,90%. За четвертого і наступних пасажів меристематичні зони не виникали і органогенез не проходив. Таким чином, доцільно робити не більше одного пасажу калусу, бо його органогенність істотно знижується в процесі субкультивування (рис. 2).

Таблиця 4. Вплив довжини гіпокотильного експланта на калусоутворення й органогенез льону звичайного

Довжина експланта, мм	Інтенсивність калусогенезу		Інтенсивність органогенезу		
	частота калусогенезу, %	маса калусу з експланта, г	частота органогенезу, %	кількість пагонів, шт.	висота пагонів, см
1–2	81,25	1,19 ± 0,061	56,26	2,9 ± 0,20	0,78 ± 0,030
3–4	93,75	1,18 ± 0,084	59,38	2,9 ± 0,16	0,94 ± 0,084
5–6	100,00	1,16 ± 0,102	81,25	3,0 ± 0,15	1,09 ± 0,074
7–8	100,00	1,48 ± 0,093	96,88	3,1 ± 0,15	1,24 ± 0,118
9–10	96,88	2,01 ± 0,156	93,75	2,7 ± 0,22	1,56 ± 0,144
НІР ₀₅		0,64		0,26	0,47

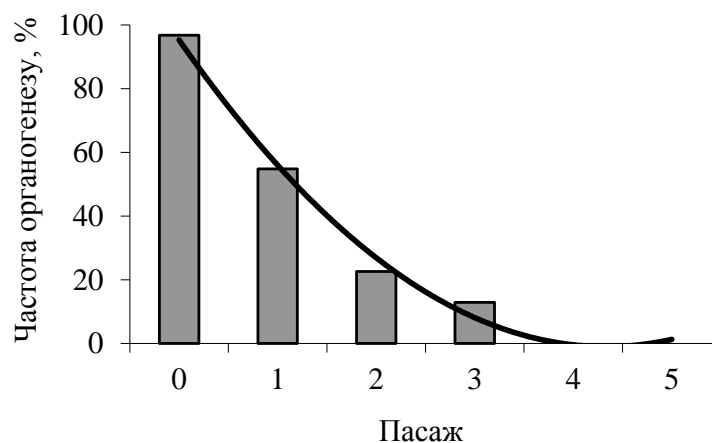


Рис. 2. Залежність органогенезу від тривалості субкультивування калусу.

Висновки

Здатність до утворення калюсу і соматичного ембріогенезу льону звичайного залежить від фітогормонального складу середовища, розміру експлантів та відстані між ними. Для інтенсивного калюсоутворення та соматичного ембріогенезу *in vitro* оптимальні концентрації БАП в мг/л можна виразити нерівністю $1,0 \leq \text{БАП} \leq 1,75$; оптимальні концентрації БАП за умови додавання до живильного середовища 0,05 мг/л НОК – нерівністю $0,5 \leq \text{БАП} \leq 2,0$;

оптимальні концентрації НОК за умови додавання 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,025 \leq \text{НОК} \leq 0,150$; оптимальні концентрації ІОК за умови додавання 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,05 \leq \text{ІОК} \leq 0,50$. Ефективним є додавання 0,5 мг/л ГК₃ до середовища з НОК і БАП. Оптимальним є використання гіпокотильних експлантів довжиною 3–6 мм та розміщення їх на відстані 1,5–2,5 см один від одного. Органогенність калюсу істотно знижується в процесі субкультивування.

References

1. 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.
2. Burbulis N., Blinstrubienė A., Masienė R., Jonytienė V. Influence of genotype, growth regulators and sucrose concentration on linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *J. Food, Agricult. Environ.* 2012. Vol. 10 (3–4). P. 764–767. doi: 10.1234/4.2012.3509
3. 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.
4. Siegień I., Adamczuk A., Wróblewska K. Light affects *in vitro* organogenesis of *Linum usitatissimum* L. and its cyanogenic potential. *Acta Physiol Plant*. 2013. Vol. 35 (3). P. 781–789. doi: 10.1007/s11738-012-1118-4.
5. Sakhare S.P., Mendhulkar V.D. Embryo excised callus induction and rhizogenesis in *Linum usitatissimum* L. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2016. Vol. 7 (3). P. 507–511.
6. 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.
7. 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]
8. 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]
9. Anjum S., Abbasi B.H., Hano C. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2017. Vol. 129 (1). P. 73–87. doi: 10.1007/s11240-016-1158-3.
10. 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.
11. Zahir A., Nadeem M., Ahmad W. et al. Chemogenic silver nanoparticles enhance lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2019. Vol. 136 (3). P. 589–596. doi: 10.1007/s11240-018-01539-6.
12. 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.¹, MACHULSKY H.M.²

¹ Institute of Bast Crops of the Natl. Acad. Agr. Sci. of Ukraine, Ukraine, 41400, Sumska obl., Hlukhiv, Tereshchenkiv str., 45

² Taras Shevchenko National University "Chernihiv Collegium", Ukraine, 14013, Chernihiv, Hetman Polubotka str., 53

METHODOLOGICAL ASPECTS OF INCREASING THE INTENSITY OF CALLUSOGENESIS AND ORGANOGENESIS OF *LINUM USITATISSIMUM* L. *IN VITRO*

Aim. Improving methods for increasing the efficiency of obtaining callus cultures and somaclones of flax (*Linum usitatissimum* L.) *in vitro*. **Methods.** Hypocotyl segments were cultured on Murashige and Skoog nutrient medium supplemented with sucrose (30 g/l) and phytohormones at various concentrations. Other conditions: photoperiod 16 hours, illuminance 2500 lx, relative humidity 60–80%, air temperature 22–24°C. **Results.** The ability to form callus and somatic embryogenesis of flax depends on the phytohormonal composition of the nutrient medium, the size of the explants and the distance between them. **Conclusions.** For intensive callus formation and somatic embryogenesis *in vitro*, the optimal concentrations of BAP (mg/l) can be expressed as $1.0 \leq \text{BAP} \leq 1.75$; the optimal concentrations of

BAP for the medium supplemented with NAA (0.05 mg/l) $0.5 \leq \text{BAP} \leq 2.0$; the optimal concentration of NAA for the medium supplemented with BAP (1.0 mg/l) $0.025 \leq \text{NAA} \leq 0.150$; and the optimal concentrations of IAA for the medium supplemented with BAP (1.0 mg/l) $0.05 \leq \text{IAA} \leq 0.50$. Addition of 0.5 mg/l GA₃ to the medium with NAA and BAP is effective. It is optimal to use hypocotyl explants 3–6 mm long and place them at a distance of 1.5–2.5 cm from each other. Organogenicity of callus is significantly reduced in the process of subculturing.

Keywords: flax, *in vitro*, phytohormones, callus, organogenesis.