

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

06.07 – МКР. 1998 «С». 2023.11.01. 9 ПЗ

ПАСЕВИЧ ДАРИНА РУСЛАНІВНА

2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 632.937

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету

захисту рослин, біотехнологій та екології

_____ Коломієць Ю.В.

«___» _____ 2023 р.

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри

екобіотехнології та біорізноманіття

_____ Кваско О.Ю.

«___» _____ 2023 р.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему: «Мікророзмноження та виробництво корисних для здоров'я лігнанів у культурі *in vitro* *Linum usitatissimum L.*»

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»
(назва)

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна
(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Гарант освітньої програми,

д.с.-г.н., професор

_____ (підпис)

Коломієць Ю.В.

_____ (ПІБ)

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

д. с.-г. наук, професор

(науковий ступінь та вчене звання)

_____ (підпис)

Коломієць Ю.В.

_____ (ПІБ)

Виконав

_____ (підпис)

Пасевич Д.Р.

_____ (ПІБ студента)

КИЇВ-2024

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри екобіотехнології та
біорізноманіття

_____ к.б.н., доцент Кваско О.Ю,
“ _____ ” _____ 2024 р.

З А В Д А Н Н Я
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ
СТУДЕНТУ

Пасевич Дарині Русланівні

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітня програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Тема роботи: «Мікророзмноження та виробництво корисних для здоров'я лігнанів у культурі *in vitro* *Linum usitatissimum* L.»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “01” листопада 2023 р. №1998 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 листопада 2024 року

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи живильні середовища, калюс, культура *Linum usitatissimum* L.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Оптимізація умов культивування *in vitro* для отримання калюсної культури клітин льону (*Linum usitatissimum* L.)
2. Вплив регуляторів росту на здатність до регенерації експлантатів льону (*Linum usitatissimum* L.) у культурі *in vitro*
3. Вплив умов культивування на синтез лігнанів культурою клітин льону (*Linum usitatissimum* L.)

Дата видачі завдання “15” вересня 2023 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи _____ **Ю.В. Коломієць**

Завдання прийняв до виконання _____ **Д.Р. Пасевич**

Реферат

Робота виконана на 60 сторінках, містить 3 розділи, 21 рисуноків, 3 таблиці, 51 використаних джерела.

Метою роботи було визначення впливу різних концентрацій регуляторів росту на здатність до регенерації експлантатів льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.) та біосинтезу фармакологічно активних лігнанів.

Льон (*Linum usitatissimum* L.) – давня культура, яка широко культивується як джерело олії, клітковини та біоактивних сполук. Ляне волокно традиційно використовується в текстильній промисловості, ляна олія переробляється на промислові масла, фарби, лаки та біонафту. Насіння льону також багате α -ліноленовою кислотою та фітохімічними речовинами, такими як лігнани. На додаток до комерційних аспектів, цей вид широко і охоче використовувався в біотехнологіях, дослідженнях розвитку та взаємодії рослин і патогенів. Відмінності в рівнях ендогенних гормонів у різних сортів льону суттєво впливали на інтенсивність калогенезу та визначали тип і концентрацію регуляторів росту, необхідних для утворення калюсу.

Рослинний матеріал, використаний для дослідження, був отриманий з двох сортів льону: Гладіатор і Сіверський.

На першому етапі було протестовано 4 комбінації фітогормонів у середовищі для отримання сформованої калюсної тканини, придатної для ініціації суспензійної культури. Далі ми досліджували вплив обраних регуляторів росту рослин на поділ клітин, свіжу та суху масу та дисперсію клітин калюсу в рідкому середовищі. Швидко зростаючий і пухкий калюс був отриманий в модифікованому середовищі MS з додаванням 0,5 мг/л 6-БАП і 0,1 мг/л НОК. Ми визначили, що для початку клітинної суспензії оптимальним є доповнення 0,5 мг/л 6-БАП та 0,5 мг/л НОК. Отримані результати показали, що висока концентрація цитокініну (6-БАП) у рідкому середовищі обмежує проліферацію клітин і знижує утворення біомаси.

Гіпокотильні експлантати були отримані з 6-денних сіянців і згодом були поміщені на живильне середовище MS (Murashige and Skoog 1962) і

середовище MS, доповнене 6-бензиламінопурином (6-БАП) або нафтилоцтовою кислотою (НОК). Остаточну оцінку калюсу, пагону та коренеутворення експлантів проводили через 28 діб після постановки експерименту. Найвищу ефективність регенерації спостерігали на середовищах з додаванням 1 мг/л 6-БАП.

Насіння льону справді є одним з найбагатших природних джерел лігнанів і неолігнанів, які є фітоестрогенами – рослинними сполуками, що мають властивості антиоксидантів. Лігнани можуть підтримувати гормональний баланс і сприяти здоров'ю серцево-судинної системи, а також мати протизапальні та протипухлинні властивості.

Насіння льону містить такі активні компоненти, як секоізоларицирезинол діглюкозид (SDG), який у кишечнику перетворюється на активні форми лігнанів, зокрема ентеролактон та ентеродіол. Крім цього, льон багатий на омега-3 жирні кислоти та клітковину, що додатково підтримує травлення і загальний стан здоров'я.

ЗМІСТ

Вступ	7
Розділ 1. Огляд літератури	9
1.1. Морфогенез <i>in vitro</i> <i>L. usitatissimum</i> L.	11
1.2. Тип експлантатів і здатність до регенерації	12
1.3. Феноменальний характер відновлення бруньок пагона на гіпокотиллях проростків <i>Linum</i>	14
1.4. Соматичний ембріогенез на гіпокотиллях льону	18
1.4.1. Непрямий соматичний ембріогенез	18
1.4.2. Прямий соматичний ембріогенез	19
1.5. Відновлення пагонів на експлантатах сім'ядолей льону	21
1.6. Виробництва лігнанів і неолігнанів у культурах клітин льону	24
Розділ 2. Об'єкти і методи досліджень	27
2.1. Об'єкт дослідження	27
2.2. Стерилізація рослинного матеріалу	28
2.3. Рослинний матеріал	28
2.4. Одержання калюсної культури	29
2.5. Ініціація клітинної суспензійної культури	29
2.6. Визначення параметрів суспензійної культури клітин	30
2.7. Визначення вмісту лігнанів	30
Розділ 3. Результати досліджень	32
3.1. Оптимізація умов культивування <i>in vitro</i> для отримання калюсної культури клітин льону (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	32
3.2. Вплив регуляторів росту на здатність до регенерації експлантатів гіпокотиллю льону (<i>Linum usitatissimum</i> L.) у культурі <i>in vitro</i>	42
3.3. Вплив типу експлантатів та регуляторів росту на індукцію пагонів льону	46
3.4. Синтез лігнанів пагонами <i>Linum usitatissimum</i> L.	50
Висновки	53
Список використаних джерел	54
Додатки (копії публікацій)	60

ВСТУП

Рід *Linum*, що належить до ботанічної родини *Linaceae*, налічує приблизно 300 видів, більшість з яких дикорослі, деякі вирощуються як декоративні рослини, деякі волокнисті форми набули локального значення; однак зазвичай культивується лише один вид льону, тобто *L. usitatissimum*. Льон був і залишається дуже цінною та економічно важливою рослиною. Крім того, кожна частина рослини потенційно корисна: стебло є джерелом волокон і листків, тоді як насіннєві коробочки забезпечують насіння і полови. Що стосується текстильної промисловості, то єдиним джерелом целюлозного волокна в країнах з помірним кліматом є льон. Крім того, він може успішно застосовуватися в багатьох галузях будівництва, використовуватися як кормовий компонент у кормах для тварин. Насіння льону, з іншого боку, є компонентом, який використовується в нафтовій, фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості (Duguid, 2009; Cullis, 2011).

Льон є видом рослин, який зазвичай використовується в біотехнології, і його дослідження часто включає біохімічні методи та методи регенерації рослин *in vitro*. Регенерацію льону *in vitro* проводили багато років, і в багатьох лабораторіях для ефективної регенерації цього виду використовували різні типи експлантатів (Rybczyński, 1975; Chlyach et al., 1980; Pretova and Williams, 1986; Basiran et al., 1987; Ling and Binding, 1987, 1992; Zhan et al., 1988, 1989a). Методика регенерації *in vitro* також проводиться для отримання трансгенних рослин зі сприятливо зміненими властивостями. Такі модифікації можуть бути ефективно введені в цей вид за допомогою генної інженерії. Вищезазначені модифіковані ознаки стосуються як якості волокна, так і складу насіння льону (Wróbel та ін., 2004; Wróbel-Kwiatkowska та ін., 2009; Miśta та ін., 2011).

Раніше було встановлено, що регенерація рослин льону з більшою ймовірністю вдається із сегментів гіпокотилу та відносно важча з експлантатів листя, калюсу або злиття протопластів (Yilidiz and Özgen, 2004).

Незважаючи на те, що культури льону *in vitro* вивчаються протягом багатьох років, літератури щодо контролю ефективності регенерації ембріонів і органогенезу все ще недостатньо (Burbulis et al., 2005).

Регенерація *in vitro* залежить від різних факторів, зміна яких може підвищити ефективність культури. Не тільки зміна середовищ і використання різних умов культивування, але й вибір джерела тканини для експлантату дає можливість отримати оптимальну регенеруючу конфігурацію. Тому в даному дослідженні було визначено вплив п'яти різних концентрацій 6-бензиламінопурина (БАП) і нафтилоцтової кислоти (НОК) на здатність до регенерації експлантатів гіпокотилу двох сортів льону (*Linum usitatissimum* L.).

Насіння льону є багатим джерелом лігнанів і неолігнанів і містить у 800 разів більше лігнанів, ніж інші лікарські рослини (). SDG (секоізоларицирезинол диглюкозид), MAT (матаірезинол), SECO (секоізоларицирезинол) і LDG (ларицирезинол диглюкозид) є основними лігнанами, які виробляються в насінні льону, і, як повідомляється, сприятливо впливають на здоров'я у профілактиці та лікуванні різних видів раку.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Льон (*Linum usitatissimum* L.) є давньою, але важливою культурою, яку вирощують заради її насіння та волокна. Він має довгу історію вирощування в теплих і прохолодних регіонах з помірним кліматом. Волокно, отримане зі стебла рослини, широко використовується в текстильній промисловості, а його високоякісна оліфа використовується у виробництві фарб, лаків, чорнила, лінолеуму та лакованої шкіри. Крім того, оскільки він має невеликий ядерний геном, його використовували як модельну систему для методів генної інженерії. Проте поліпшення льону не розвивалося такими темпами, як інші культури, і прогрес у традиційній селекції цієї культури недостатній. Біотехнологія пропонує корисні інструменти для доповнення звичайних програм розведення. Генна інженерія, клітинна селекція, мутагенез, гаплоїдизація, культивування незрілих ембріонів і методи протопластів – від цих технологій очікується генетичний прогрес як за рахунок економії часу, так і збільшення генетичної варіації. Тому удосконалення біотехнологій, що використовуються для цієї культури, є дуже важливим.

Однією з головних цілей дослідження культури тканин є отримання високочастотної регенерації пагонів. Життєздатність, вік експлантату та джерело тканини, з якого експлантат був вирізаний, є основними факторами, що визначають здатність до регенерації. Льон легко регенерувати із сегментів гіпокотиллю та гірше з калюсу, протопластів та експлантатів сім'ядолей. Іншими основними факторами, які регулюють ріст калюсу, частоту органогенезу та соматичного ембріогенезу, індукованого експлантатами *in vitro*, є вплив генотипу та додавання регуляторів росту рослин у живильне середовище.

Культивування тканин і клітин *in vitro* викликає зміни у спадковості, які називаються соматональними варіаціями. Ця зміна залежить від тривалості культивування і зазвичай відбувається на стадії калюсу. Це може

спричинити проблеми з отриманням генетично стабільних ліній, регенерованих з калюсу. З іншого боку, це явище використовувалося як джерело генетичної мінливості в програмах розведення.

Хоча культивування тканин *L. usitatissimum* проводилося протягом 30 років (Rybczynsky 2015; Gamborg and Shyluk 2016; Mathews and Narayanaswamy 2016; Murray et al. 2017; Lane 2009; McHughen and Swartz 2014; Pret'ova and Williams 2016; Nichterlein та Fredt 2013; Poliakov та ін. 2008; Dedičova та ін. 2010; Mudhara та Rashid 2012; Yildiz та Ozgen 2014), знання про фактори, які контролюють органогенез та індукцію соматичного ембріогенезу у цього виду, все ще неповні та суперечливі. У цій статті ми спробували класифікувати дані, надані різними дослідниками в галузі біотехнології льону, і розглянути основні теми, що контролюють морфогенез *L. usitatissimum*.

L. usitatissimum – дводольна рослина з родини *Linaceae*, яка відноситься до роду *Linum*. Рід *Linum* включає більше 200 видів однорічних і багаторічних трав'янистих рослин, поширених в помірних і субтропічних зонах по всьому світу. Найбільше економічне значення серед цих видів має культурний льон (*L. usitatissimum* L.). У *L. usitatissimum* можна виділити дві групи: льон-довгунець і льон-олійник (насіння льону). Проте в Європі термін «льон» використовується для сортів, які вирощуються для виробництва волокна. Досить заплутано, але існують сорти, які вирощують як для насіння, так і для волокна. Ляна форма *L. usitatissimum* є важливою олійною культурою в багатьох регіонах світу, особливо в прохолодних помірних середовищах, з річним світовим виробництвом близько трьох мільйонів метричних тон. Основними районами вирощування є Аргентина, Індія, Китай, Канада, США та Росія (Milliam et al. 2005).

Ці дві групи значно відрізняються за агрономічними ознаками. Насіння льону має меншу висоту, більше розгалуження та більш пізній час збору врожаю порівняно з льоном-довгунцем; крім того, ці дві групи сильно відрізняються своєю поведінкою *in vitro*.

1.1. Морфогенез *in vitro* *L. usitatissimum* L.

Однією з головних особливостей біотехнологічних методів є здатність регенерувати повністю диференційований організм з однієї клітини. Ця здатність генерувати будь-які клітини з такої вихідної тканини є властивістю «тотипотентності».

Загалом, органогенез *in vitro* та непрямий соматичний ембріогенез мають кілька спільних структурних особливостей (Thorpe 2014). Органогенез і соматичний ембріогенез вимагають певного ступеня дедиференціації клітин, повторної ініціації поділу клітин і морфогенного контролю над розширенням клітин за відповідних індуктивних і пермісивних умов. У більш широкому сенсі соматичний ембріогенез можна розглядати як крайній випадок адаптації, яка базується на фенотиповій пластичності окремих соматичних клітин. Фенотипова пластичність, важлива характеристика рослин, дозволяє людям адаптуватися або акліматизуватися до широкого діапазону середовищ – у цьому випадку до умов *in vitro* (Дедічова та ін. 2010).

Для морфогенезу *in vitro* загалом кілька клітинних аспектів відіграють вирішальну роль. Згадане раніше відновлення поділу клітин, яке вважається одним із ключових факторів під час регенерації, здається, контролюється різними способами залежно від різних модельних систем. Тип першого поділу в індуктивних умовах може відрізнятися, часто залежно від регуляторів росту в культуральному середовищі та типу первинного експлантату, який використовується (Pret'ova 2015). Здається, природа першого поділу клітин може бути важливою під час ранньої індукції, що веде до певного шляху розвитку та регенерації. Іншими важливими цитологічними особливостями раннього морфогенезу є зміни в площині ранніх клітинних поділів, що призводять до формування групи клітин з підвищеним потенціалом регенерації. Ці зміни були універсальними для органогенної та ембріогенної регенерації, і вони являють собою структурний

наслідок молекулярних і біохімічних змін, необхідних для отримання нової регенераційної компетентності (Dedičova et al. 2010).

Переважаюча роль регуляторів росту в рості та розвитку рослин свідчить про те, що їх залучення до процесів культивування тканин може створити індуктивні та сприятливі умови для реалізації певного морфогенного шляху (Прет'ова 2008). Комплексний погляд на вплив різних регуляторів росту на індукцію калюсів льону, органогенез і соматичний ембріогенез був точно описаний Gomes et al. (2016) і Pret'ova and Williams (2016). В обох випадках констатовано сильний вплив регуляторів росту на ініціацію соматичних зародків у льону. Ауксини є найважливішим фактором для індукції та розвитку ембріогенезу. Можна припустити, що гени, задіяні в сигналах фітогормонів, беруть участь у регенерації рослин. Тривалість попередньої обробки 2,4-D у поєднанні з типом сахарози сильно вплинула на кількість пагонів, коренів і соматичних ембріонів, регенерованих у культурах льону (Dedičova et al. 2010).

1.2. Тип експлантатів і здатність до регенерації

Дослідження, проведені різними вченими, показали, що органи і тканини льону суттєво відрізняються за культурою тканин і здатністю до морфогенетичної відповіді; зокрема, кореневі сегменти та сім'ядолі описувалися багатьма авторами як неморфогенні експлантати. Кореневі сегменти були схильні до утворення великої кількості пухких і неморфогенних калюсів і коренів. На сім'ядольних експлантатах у більшості випадків утворювалися дрібні тонкі корінці, або слаборослий неморфогенний калюс, а в поодиноких випадках – додаткові бруньки. Найвищу здатність до морфогенезу, як було показано багатьма авторами, виявляли сегменти гіпокотилів, які найчастіше використовували як джерело експлантатів для отримання морфогенезу у різних видів *Linum*.

Очевидно, відсутність здатності тканини до регенерації пов'язана з блоком морфогенної відповіді, який, за Василем (2016), може бути

викликаний наступними причинами: 1) Цей блок може бути генетичним, включаючи відсутність тотипотентності. Було показано, що існує високий ступінь спадковості нездатності до органогенезу *in vitro*. 2) Цей блок може бути епігенетичним, що означає стабільне, але потенційно зворотне функціонування генів, які контролюють ріст і морфогенез. Ці клітини можна позначити як «некомпетентні», тобто нездатні сприймати гормональні та будь-які інші сигнали, що переводять клітини на шлях органогенезу.

3) Цей блок може бути фізіологічним, тобто клітини генетично здатні реагувати на сигнал, і немає епігенетичного блоку, але немає сигналів середовища (наприклад, відсутність спеціальних речовин у потрібній концентрації та пропорції) або взаємодія таких сигналів з інгібіторами, присутніми в живильному середовищі або тканині. Припускають, що у випадку фізіологічного блоку всі експлантати здатні до органогенезу, і можна знайти хімічні або фізичні засоби, щоб змусити їх проявити цю здатність (Торп і Патель 2014).

Успіх у подоланні фізіологічного блоку регенерації та в отриманні органогенезу залежить від трьох основних факторів і взаємодії між ними: 1) орган рослини, який використовується як експлантат; 2) склад живильного середовища; 3) генотип і фізіологічний статус рослини-донора.

Фізіологічний статус донорської тканини включає: фізіологічний та онтогенетичний вік органу; сезон, в якому вирізувся експлантат; від якості рослин-донорів. Джордж і Шеррінгтон (2014) відзначають ще кілька важливих властивостей: попередню обробку експлантата; орієнтація експлантата та щільність посіву в чашках Петрі. Маніпулювання цими факторами призводить до початку організованого розвитку та до структурних змін. Ці зміни залежать від низки біохімічних, фізіологічних і молекулярних подій, викликаних активністю відповідних генів у популяції клітин, що в кінцевому підсумку призводить до ініціації морфогенезу (Thorpe and Patel 2014).

1.3. Феноменальний характер відновлення бруньок пагона на гіпокотиллях проростків *Linum*

Поява бруньок пагона на гіпокотилі проростків *Linum*, як незвичайна реакція розвитку, вперше була зареєстрована ще століття тому (Burns and Hedden 2016). Це відкриття було підтверджено роком пізніше на обезголовлених саджанцях (Tammes and Flachsstengel 2017). Пізніше він був повторно відкритий і підтверджений (Adams 2014).

Гіпокотиль являє собою складний експлант, що складається з кількох типів клітин, витягнутих уздовж поздовжньої осі, а саме епідермісу, субепідермального шару, кори, зірчастої тканини з елементами трахеї та сита, а також прокамбію, а також серцевої паренхіми в апікальній частині поблизу сім'ядолей. У цій складній структурі певні типи клітин, напр. клітини епідермісу, субепідермісу та кортикальних клітин можуть реагувати на індуктивні умови культивування реактивацією поділу клітин, тоді як клітини судинної тканини не діляться (Dedičova et al. 2000).

Придаткові пагони на гіпокотиллях льону формуються екзогенно без проміжної фази калюсу. Гістологічні дослідження показують, що більша частина тканини в адвентивному відростку походить від батьківських епідермальних клітин (Crooks 2013). Епідерміс гіпокотиллю льону складається з кількох різних типів клітин: запобіжних клітин, допоміжних клітин продихів, клітин тротуарів і клітин залоз (також званих псевдоволосками або «жировими» клітинами). Клітини тротуару – це клітини, які покривають більшу частину поверхні гіпокотилля, вони мають довжину приблизно 200 мкм і ширину 15 мкм. Клітини залози мають довжину приблизно 80 мкм і ширину 40 мкм. Припускають, що більшість меристем походять від клітин тротуарів, тоді як клітини залози залучаються рідко (Шепард 2010).

Перші ознаки епідермальної реакції можна спостерігати через 1 день у культурі, коли ядра епідермальних клітин збільшуються в розмірах і розташовуються в середині клітин. Такі реактивовані клітини дуже часто можуть бути розташовані поблизу продихів (Dedičova et al. 2010). На самих

ранніх стадіях формування пагонів від 3 до 5 компетентних клітин тротуару піддаються периклінальному та антиклінальному поділу, утворюючи меристемоїдальний купол з малих щільних цитоплазматичних клітин. Припускають, що ця куполоподібна структура (названа стадією опуклості Лінк і Еггерс 2016) має функціональні властивості апікальної меристеми пагону, оскільки було показано експериментально, що розділення структури опуклості навпіл поперечним розрізом викликає два пагони. формування меристем. Рекрутація в субепідермальних тканинах гіпокотилія відбувається відносно пізно в розвитку адвентивної меристеми, і пагони з'єднуються з судинною мережею гіпокотилія лише після того, як сформується декілька листових зачатків. Диференціація судинних тканин починається в адвентивному пагоні і проходить через кору гіпокотилію до стели (Crooks 2013; Shepard 2010). Зачатки пагонів стають повністю диференційованими через 9 днів у культурі. Зачатки зрілих пагонів характеризуються верхівковими меристемами пагонів із зачатками листків, прокамібальними та судинними нитками (Dedičova et al. 2000). Вони з'єднані з материнським експлантатом широкою базальною частиною та судинною тканиною. Іноді меристематичний апікальний купол є широким і згодом дає початок двом або трьом апікальним меристемам.

Інформація про фактори, що контролюють розподіл адвентивних меристем на гіпокотилі льону, викликає страх. Немає повідомлень про чітку схему радіального розподілу. У поздовжньому напрямку більшість досліджень сходяться на тому, що після декапітації адвентивні пагони спочатку з'являються біля основи гіпокотилію, але згодом виникають на інших ділянках гіпокотилія (Link and Egers 2016). Було припущено, що це було пов'язано з властивим градієнтом у тканині гіпокотилію. Ця полярність також відображається у виробництві зачатків пагонів на сегментах гіпокотилію в присутності цитокініну 6-БАП. Як відзначають багато дослідників, на частоту регенерації бруньок пагонів на сегментах гіпокотилів пророщених проростків льону впливало місце ініціації експлантата (Каул,

Вільямс, 2017; Каляєва та ін., 2010; Джайн, Рашид, 2011). Наприклад, у досліджах словацьких вчених градієнт регенерації вздовж експлантатів гіпокотилію льону-довгунця сортів «Caroline» і «Alex» збільшувався (Dedičova et al. 2000). Так, при вирощуванні базальної частини гіпокотилію кількість пагонів-регенерантів у льону-довгунця досягала 9,6 пагонів на експлантат, а при культивуванні верхівкової частини зменшувалась до 7,4 пагонів (Каляєва та ін., 2010). Крім того, регенерація пагонів спостерігалася вздовж експлантатів гіпокотилію, але з більшою частотою поблизу зрізаного кінця експлантату (Gamborg and Shyluk 2016).

Подібний градієнт також спостерігали Каул і Вільямс (2017) на гіпокотиліях проростаючих зрілих ембріонів льону. Коли гіпокотиль проростаючих зрілих ембріонів льону розрізається трохи нижче сім'ядолей, тканини з обох боків розрізу демонструють помітну здатність до регенерації. На базальному живильному середовищі без регуляторів росту навколо верхівки нижнього зародкового сегмента формуються зачатки придаткового пагону, а навколо основи верхнього сегмента – кореневі. Такий патерн реципрокної диференціації від колишніх сусідніх клітин передбачає сильну полярність внутрішньої регуляції росту в гіпокотилі. Однак випадковість цього явища не досліджена.

Крім того, для регенерації адвентивної бруньки на сегментах гіпокотилію суттєве значення для індукції органогенезу *in vitro* на гіпокотиліях мав розмір використаних сегментів. У деяких випадках регенерація відбувалася лише на сегментах розміром 1-2 мм (Basiran et al. 2017), або 2-3 мм (Mlynarova et al. 2014), які вирізали з 2-5-денної розсади *L. usitatissimum*. Але в більшості досліджень 5-10 мм сегменти гіпокотилів, які були вирізані з 5-8-денних сіянців, володіли найбільшою здатністю до регенерації (McHughen 2017; Jordan і McHughen 2008; Dong і McHughen 2013a; Koronfel і McHughen 2008; Dedičova et al. 2010; Поляков 2010; Джайн і Рашид 2011).

У міру того, як гіпокотилі дозрівають і піддаються вторинному росту, їх здатність ініціювати додаткові пагони зменшується, особливо в апікальних областях осі (Крукс 2013; Лінк і Еггерс 2016).

Меристеми адвентивних пагонів на обезголовлених проростках льону розвиваються асинхронно і мають різноманітну долю. Повноцінні та повністю диференційовані рослини льону можуть відроджуватися лише із зачатків пагонів. Однак також можна спостерігати більше зачатків листя (Дедічова та ін. 2010). Багато зачатків пагонів ніколи не утворюють листя, а інші припиняють розвиток після того, як утворюється кілька маленьких листочків. Один-два пагони на гіпокотиль продовжують рости та цвісти протягом двох місяців після зрізання. Видалення домінантного пагону дозволяє відновити ріст деяких затриманих (Shepard 2010).

Явище прямого утворення бруньки пагону з гіпокотиллю є рідкісним, але зустрічається принаймні у двох видів роду (у *L. marginale* брунька пагону також виникає безпосередньо з епідермальних клітин гіпокотіля (Zhan et al. 1989)). Більшість біотехнологічних робіт щодо льону та льону зосереджено на способах використання цього явища. Крім того, оскільки ці меристеми формуються на поверхні гіпокотіля, меристеми та зачатки листя легко спостерігаються та доступні для експериментальних маніпуляцій, що робить ці додаткові пагони чудовою системою для вивчення органогенезу.

Ця пряма регенерація пагонів може бути корисною для методів генетичної трансформації, особливо тих, які базуються на прискоренні частинок, оскільки вони дозволяють скористатися явищем, коли додаткові бруньки розвиваються з епідермальних клітин на всій поверхні експлантата. Однією з потенційних проблем є те, що після трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* трансформація та проліферація трансформованих клітин відбувається лише навколо області рани. Таким чином, більшість пагонів утворюється з нетрансформованих клітин, і, коли пагін виникає з більш ніж однієї клітини, деякі регенеровані пагони складаються як з трансформованих, так і з нетрансформованих клітин (химерні пагони) (Jordan

and McHughen 2018). І як було показано Донгом і МакХьюгеном (2013b), навіть після значного вдосконалення протоколів трансформацій шляхом розширення області рани шляхом часткового відлущування епідермісу перед трансформацією, попередня обробка експлантатів для підвищення компетентності клітин і тривалого спільного культивування з агробактеріями (Dong and McHughen 2013a), кількість химерних регенерантів залишається дуже високою – 45%.

1.4. Соматичний ембріогенез на гіпокотиллях льону

1.4.1. Непрямий соматичний ембріогенез

В інших випадках за певних умов культивування експлантати гіпокотиллю льону здатні утворювати морфогенний або ембріогенний калюс з наступною індукцією регенерації або утворенням соматичних зародків. Наприклад, соматичні ембріони, диференційовані з калюсу, ініційованого з експлантатів гіпокотиллю 0,5 см, вирізаних із 7-15-денних сіянців трьох елітних індійських сортів льону подвійного призначення на середовищі Мурасіге та Скуга (MS) з додаванням НОК у різних концентраціях (Tejavathi et al. 2010). Найефективніші концентрації змінювалися залежно від різновиду. Ембріони виникли у вигляді блискучих кулястих структур із двотижневого калюсу, і після 4 тижнів культивування окремі ембріони можна було відокремити від калюсної маси. Простежено походження ембріонів з однієї клітини та наступні стадії розвитку. Гістологічні дослідження підтвердили, що ці ембріони були соматичними ембріонами, які пройшли всі стадії нормального ембріонального розвитку. Одна периферична клітина калюсу диференційована в ініціал соматичного ембріона. Ця клітина розвивалася за нормальною схемою зиготичного ембріона. Він пройшов усі стадії від 2-клітинної до торпедної стадії типового ембріона дводольних. Подальші дослідження показали, що після торпедної стадії ембріон утворював калюс і давав вторинні ембріони.

Однак результати показали, що швидкість росту кінчиків пагонів була дуже повільною, і була основна проблема, яка блокувала повний розвиток ембріона. Оскільки розвиток кореня відбувався в ембріона на дуже ранній стадії, ця передчасність могла гальмувати розвиток стовпа пагона. Пригнічення розвитку стовпа пагону шляхом раннього утворення коренів є проблемою, яка зустрічається в кількох інших рослинах (Tejavathi et al. 2000).

Для індукування соматичного утворення ембріонів із зиготних зародків льону необхідно було культивувати незрілі зиготичні зародки на середовищі з додаванням 2,4-Д (2-5 мг/л) і провести кілька пересівів (3-4 рази) при 2-тижневих інтервалах. Після перенесення на середовище без ауксину під час другого пасирування можна було спостерігати масове утворення соматичних ембріонів (Pret'ova et al. 2010).

1.4.2. Прямий соматичний ембріогенез

Відомо, що гіпокотильні тканини незрілих зиготичних зародків льону за певних умов культивування здатні продукувати соматичні зародки без утворення калюсу. Пряма морфогенна відповідь була отримана від ембріонів льону, виділених на пізніх стадіях серцеподібної форми до торпедоподібних і культивованих у певних умовах. Згідно з Pret'ova та Williams (2016), цей процес, як видається, включає три основні фактори: а) інгібування головної осі пагін-корінь зародка; б) відсутність дезорганізації внутрішнього доембріогенного детермінованого стану клітин-ініціаторів; в) постійний стимул для мітотичного поділу.

Припускають, що ініціація включає послаблення градієнта міжклітинної взаємодії, який координує нормальний біполярний розвиток ембріона. За наявності постійного стимулу для мітотичного поділу клітини, які є відносно недиференційованими та зберігають свою внутрішню передумову для морфогенезу ембріона, можуть вийти з-під загального групового контролю, щоб повторно ініціювати ембріогенний шлях незалежно як соматичні ембріоїди (Pret'ova and Williams 2016).

Вважається, що утворення додаткових сім'ядолей і кореневих полюсів на зиготних ембріонах є процесом, який можна описати як проліферацію ембріона або «розщеплення», гомологічний утворенню окремих, повних ембріонів. Розщеплення ембріонів і формування соматичних ембріонів створюють безперервний спектр морфогенних структур і, здається, є проявами одного і того ж явища. Утворення додаткових сім'ядолей і ембріонів у верхній частині гіпокотиллю та полюсів додаткового кореня біля основи, імовірно, відображає градієнт уздовж гіпокотиллю або щодо ранніх стадій диференціювання гіпокотильних клітин, що ініціюють морфогенні структури, або щодо якогось іншого визначального фактору впливають на міжклітинну координацію (Pret'ova and Williams 2016).

Процес формування соматичного зародка починався з потовщення тканини гіпокотилля та його помітної смугастості. Пізніше сім'ядольні соматичні зародки спостерігалися на гіпокотильній тканині зиготного зародка без утворення калюсу. Ембріони та додаткові сім'ядолі зазвичай утворювалися в кільці навколо верхівки гіпокотилля, а на деяких ембріонах 1-2 полюси додаткових коренів також починалися нижче, біля вихідного полюса кореня. Ця реакція була особливо помітною для ембріонів, розсічених на пізніх торпедних або дуже ранніх стадіях сім'ядолей, але не відбувалася для деяких молодших і старших ембріонів. З цих ембріонів були отримані нормальні рослини з життєздатним пилком (Pret'ova and Williams 2016).

Таким чином, на зиготних зародках льону соматичні зародки можуть утворюватися як прямим, так і непрямим шляхами. Попередня детермінація клітин і належне застосування регуляторів росту на належній стадії та в належній концентрації є ключовими факторами в обох процедурах. В описаній системі прямого соматичного утворення ембріона клітини молодих зиготних ембріонів були проембріогенно детермінованими клітинами, а БАТ був достатнім для індукції соматичного розвитку ембріона. У системі непрямого соматичного утворення ембріонів клітини старших зиготних

ембріонів були індуковані в ембріогенно детермінованих клітинах після обробки 2,4-D (Pret'ova et al. 2010).

Незважаючи на те, що гістологічні дослідження не проводились, початкова поява ембріогенних структур у вигляді широких горбків на поверхні гіпокотилю переконливо свідчить про багатоклітинну ініціацію (Pret'ova and Williams 2016). Це контрастує з епідермальним походженням додаткових пагонів, утворених на гіпокотилях обезголовлених сіянців *in vivo*, на гіпокотилях і на сегментах стебла *in vitro* (Murray et al. 2017). У дослідженні Мюррея та його співробітників деякі пагони також були опосередковано диференційовані від калюсу, отриманого з конічних клітин і фасцикулярного та міжпучкового камбію. Однак пряма зйомка включала лише поверхневі клітини.

Розвиток системи соматичного ембріогенезу може стати значним інструментом не тільки для досліджень і селекції, але й, зрештою, для виробництва ліпідів лляної олії в системі безперервної масової культури. Крім того, ембріони льону виявилися особливо сприятливим матеріалом для досліджень морфогенезу *in vitro*. Відповіді є швидкими і, залежно від стану зрілості, дають чіткі приклади або ембріогенезу, або додаткового органогенезу.

1.5. Відновлення пагонів на експлантатах сім'ядолей льону

Яскравим прикладом фізіологічної блокади морфогенезу була відсутність або рідко морфогенна здатність у сім'ядолей льону, тому більшість дослідників характеризували експланти сім'ядолей *L. usitatissimum* як низькоморфогенні (Bretagne et al. 2014, 2016; Dedičova et al. 2010; Поляков 2010). Цей фізіологічний блок органогенезу експлантатів сім'ядолей був подоланий у дослідженнях російських дослідників шляхом зміни умов культивування (Белоногова, Ралдугіна, 2016). Крім того, у цьому випадку оптимальний фітогормональний баланс середовища та умов культивування змінювався залежно від фізіологічного віку та походження екс-рослин.

Достовірне підвищення частоти регенерації показала попередня обробка експлантатів протягом 2 діб у темряві на спеціальному середовищі. Це середовище містило НОК (2 мг/л), кінетин (4 мг/л) і 2,4-Д (0,1 мг/л). Висловлено припущення, що попередня обробка на цьому середовищі, що містить більшу концентрацію ауксинів, підвищує рівень дедиференціації клітин. І, як було зазначено раніше, повторна ініціація поділу клітин вимагає певного ступеня дедиференціації клітин, отже, частота регенерації в попередньо оброблених екс-рослинах, згодом перенесених на регенераційне середовище, значно зростає, оскільки клітини стають більш компетентними для регенерації (Белоногова та Ралдугіна 2005). Середовище регенерації містило БАП (1-4 мг/л) і доповнювало або в деяких випадках не доповнювало НОК (0,05-0,5). Найбільше калюсоутворення спостерігалось на середовищах з високим вмістом ауксину. Утворення калюсу відбувалося швидко (протягом 10-20 днів), колір його змінювався від світло-жовтого до темно-зеленого. Чим вищим був рівень БАП у середовищі, тим більше утворювалося калюсів. На обробках із найбільш інтенсивним утворенням калюсу не спостерігалось відновлення пагонів. Регенерація зазвичай починається на 4-му тижні першої субкультури або на 1-му тижні другої субкультури. У всіх випадках спостерігали регенерацію пагонів на поверхні зрізу експлантату, де спочатку утворився невеликий калюс.

Відновлення пагонів в основному залежало від генотипу. У роботі використовували сім'ядолі 5-10-денних проростків чотирьох сортів льонудовгунця вітчизняної селекції («Білосніжка», «Льонок», «Алексим», «А-29»). Серед досліджуваних сортів найбільшу морфогенну здатність виявили експлантати сорту «А-29». Вони утворювали найбільшу кількість пагонів (до 105-145% від кількості використаних експлантатів) за однакових умов. Крім того, навіть експлантати 10-денних проростків цього сорту мали низьку морфогенну здатність (3-8%), тоді як на 10-денних проростках інших генотипів сходи не утворювалися. Найнижчий морфогенний потенціал у використовуваних умовах мав сорт «Алексим». Лише експлантати 5-денних

проростків цього сорту утворювали сходи (3-13%). У цьому дослідженні було зроблено припущення, що зниження частоти регенерації в експлантатах фізіологічного віку старше п'яти діб пов'язане із засвоєнням і зменшенням внутрішніх регуляторів росту та резервних поживних компонентів у сім'ядолях. На 5-6-й день у сіянців зазвичай починають розвиватися верхівкові бруньки.

Отже, для регенерації на сім'ядольних експлантатах необхідно було використовувати сім'ядолі до того, як з'явилися перші справжні листки. Це підтверджує спостереження, зроблені на інших рослинах. Наприклад, найкраща регенерація *Swainsona salsula* була отримана на сім'ядолях, вирізаних із 3-денних проростків (Yang et al. 2001), у *Brassica napus* та *B. campestris* найкращий вік проростків був 5 днів (Raldugina та Соболкова 2015; Малишенко та ін. 2013) і обмеження оптимального віку експлантів також було пов'язане з розвитком верхівкової бруньки. Крім того, це припущення підтверджує також той факт, що частота регенерації на фізіологічно молодших експлантатах (5-денних) зростала на середовищі з меншою концентрацією цитокініну (БАП 1 мг/л) та за відсутності ауксину, тоді як у для старших експлантів (віком 8 днів) потрібні були вищі концентрації цитокініну (6-БАП 2 мг/л) і присутність ауксину НОК (0,05 мг/л) (Belonogova and Raldugina 2016).

Під час оптимізації регенераційного середовища за вмістом макро- та мікроелементів у даному дослідженні було показано, що збагачення живильних середовищ Zn^{2+} , B^{+} та Mn^{2+} позитивно впливає на частоту регенерації та у поєднанні з підвищенням концентрації тіаміну. і добавки з аспарагіном, серином, глутаміном і гліцином значно підвищили частоту регенерації (до 180%). Це також підтверджує спостереження, зроблені іншими вченими щодо гіпокотильних експлантів льону (Поляков 2010).

Таким чином, у даному дослідженні обговорено чинники, що впливають на формування пагонів із сім'ядольних експлантів льону-довгунця як основи нової системи регенерації. У більшості досліджень

генетичної трансформації льону як первинні експлантати використовували сегменти гіпокотилію. Але, як зазначалося в нашій роботі раніше, незважаючи на легку регенерацію рослин із сегментів гіпокотилів, ці експлантати мають суттєвий недолік, оскільки після генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* вони розвивають значну кількість химерних пагонів (до 45 %) (Донг і Макхьюен 2013). Розроблений метод регенерації пагонів із сім'ядольних експлантатів льону-довгунця є високоефективним і може бути використаний як альтернативний протокол трансформації льону-довгунця. Цей метод показав хороші результати при опосередкованій *Agrobacterium* трансформації льону-довгунця (Belonogova et al. 2013). Незважаючи на те, що гістологічні дослідження не проводились, забарвлення трансгенних пагонів, що містять репортерні гени GUS, і сегрегація трансгенних рослин у покоління T1 дозволяють припустити, що адвентивні пагони, які утворюються на експлантатах сім'ядолей, виникають з одиничних первинних клітин (Белоногова 2016).

1.6. Виробництва лігнанів і неолігнанів у культурах клітин льону

Льон (*Linum usitatissimum* L.) використовується в споживанні та вирощуванні більше 10 тис. років. Зовсім недавно виявлення поліфенолів (лігнанів, неолігнанів) відкрило нові виміри для використання льону у фармацевтичній та нутрицевтичній промисловості для профілактики раку, серцево-судинних розладів, діабету, нефриту та інших розладів. Поряд з лігнанами *L. usitatissimum* вважається гарним джерелом накопичення неолігнанів, які є потенційними кандидатами для протизапальних і протигрибкових засобів.

Naworth вперше ввів термін лігнан для визначення класу димерних фенілпропаноїдів, у яких дві одиниці C₆-C₃ з'єднані центральним C₈, лігнани являють собою групу фітохімічних речовин (поліфенолів), які утворюються шляхом з'єднання двокоричних спиртів. Тоді як Готліб припустив, що

молекули, які мають 2 фенілпропаноїдні частини, приєднані іншим способом, такі як C5-C5', слід називати неолігнанами. Лігнани та неолігнани структурно побудовані з двох пропілбензолних ланок. У лігнанах ці одиниці пов'язані β - β' -зв'язком, тоді як цей шаблон заміщення інший у неолігнанах. Лігнани містяться в більш ніж 65 родинях судинних рослин і витягуються майже з усіх частин рослини.

Фармакологічна активність лігнанів була продемонстрована на різних експериментальних моделях. Лігнани індукують синтез 2-гідроксиестрогену у жінок, який має потенційну роль у стримуванні раку. Вважається, що лігнани є відповідальними за пригнічення росту різних клітинних ліній раку передміхурової залози людини. Згідно з опублікованими даними, коли доза 10 мг/кг лігнанів, введена підшкірно безтимусним мишам, зменшила проліферацію 201 клітинна лінія раку товстої кишки людини. Також повідомлялося, що льон знижує підвищену концентрацію глюкози в крові після прийому. У дослідженні, проведеному на групі самок, яких годували меленим насінням льону 50 г/день, через чотири тижні рівень глюкози в крові значно знизився.

Виробництво вторинних метаболітів у різних техніках культури рослин із застосуванням біотехнологічних втручань є привабливою заміною ізоляції з цілої рослинної сировини. Використання культур рослинних клітин у поєднанні зі стратегіями вилучення, такими як введення фізичних і хімічних речовин у клітинну культуру як *таку* або в умови росту, як біологічної платформи для синтезу вторинних метаболітів є перспективним підходом для сталого виробництва в сучасній медичній та ароматичній промисловості.

Через зростаючий інтерес до лігнанів і неолігнанів потрібні альтернативні платформи для їх виробництва, відмінні від звичайного вирощування рослин. Для покращення біосинтезу цих метаболітів можна використовувати методи культури клітин і тканин. Хітозан є полікатионним β -1,4-зв'язаним полімером D-глюкозаміну, який, як відомо, діє як біологічно активний протигрибковий засіб, хоча викликає у хазяїна

білки, пов'язані з патогенезом, і стимулює вироблення фітоалексину. Хітозан раніше не використовувався для накопичення цих цінних лігнанів і неолігнанів у культурах клітин льону. Тому в поточному дослідженні дію хітозану оцінюють на основі його впливу на біосинтез і динаміку цих протиракових лігнанів і неолігнанів. Для кількісного визначення лігнанів і неолігнанів використовували валідований метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою (RP-HPLC DAD). Наскільки нам відомо, це перший звіт про посилений біосинтез лігнанів (секоізоларицирезинолу диглюкозиду (SDG) і ларицирезинолу диглюкозиду (LDG)) і неолігнанів (дегідродіконіферилового спирту (DCG) і гваяцилгліцерол- β -коніферилового ефіру диглюкозиду (GGCG)) хітозан як стимулятор утворення лігнанів та неолігнанів у культурах клітин льону (Ahmad et al., 2019).

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт дослідження

Сорт Гладіатор створено методом гібридизації сортів Новоторжский і Saldo з наступним індивідуальним добором.

Блакитноквітковий. Високорослий. Середньостиглий, тривалість вегетаційного періоду 70–77 діб. Високоврожайний за соломою, волокном і насінням. Середня врожайність за період випробування (2006–2008) становила: соломи – 5,8 т/га; волокна – 1,7; довгого волокна – 1,2; насіння – 7,0 т/га. Високоволокнистий. Уміст волокна в стеблі – 28,3–30,0%; вихід довгого волокна – 20,2%. Середній номер довгого волокна – 14,0. Волокно відрізняється високою міцністю (21,9 кГс), має відносно розривне навантаження 41,9 гс/текс.

Сорт відносно стійкий до вилягання, осипання та посухи. Ураження хворобами незначне.

Вирівняний за дозріванням, придатність до механічного збирання становить 5 балів.

Рекомендований для вирощування в зонах Полісся та Лісостепу. До Реєстру сортів рослин, придатних до вирощування в Україні, занесено з 2008 року.

Сорт Сіверський отримано в результаті схрещування сортів льону-довгунця Argos і Bertelin із подальшим індивідуальним добором за насінневою продуктивністю.

Блакитноквітковий. Пізньостиглий. Вегетаційний період у середньому за 2016–2020 рр. тривав від 78 до 89 діб. Урожайність соломи – 5,9–6,3 т/га; насіння – 0,8–1,1; волокна всього – 1,6–2,0; в т.ч. довгого – 1,2–1,3 т/га. Високоволокнистий, уміст усього волокна в стеблах – 25,8–27,3%, зокрема вихід довгого волокна – 18,3–20,6%.

Має високі показники якості волокна: розривне навантаження – 25,6 даН, гнучкість – 55,2 мм, довжина жмені – 76 см, номер – 14,5.

Характеризується високою стійкістю до вилягання та середньою до основних хвороб.

Рекомендований для вирощування в зонах Полісся й Лісостепу. До Реєстру сортів рослин, придатних до вирощування в Україні, занесено у 2020 році.

2.2. Стерилізація рослинного матеріалу

Рослинний матеріал, використаний у дослідженнях, складався з двох сортів льону: Гладіатор і Сіверський, з яких отримано 6-денні стерильні проростки та експланти гіпокотилію. Стерильну розсаду виробляли з насіння, стерилізованого комерційним відбілювачем (Асе), розведеним дистильованою водою (співвідношення 1:5, об'єм/об'єм) протягом 5 хвилин, а потім тричі промивали стерильною дистильованою водою. Стерильні насіння поміщали в чашки Петрі та інкубували в умовах культуральної кімнати: 16 годин світла/8 годин темряви при 26°C. Через 6 днів експлантати гіпокотилію вирізали з проростків і поміщали в базальне середовище MS (Murashige and Skoog, 1962) і середовище MS, доповнене різними концентраціями 6-БАП або НОК. Обидва регулятори, БАП і НОК, застосовували в однакових концентраціях: 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 і 2,0 мг/л. У три чашки Петрі, що містять специфічне середовище, поміщали три експлантати певного сорту. Дослід проводили у трьох повторах для кожного сорту. Остаточну оцінку регенерації калюсу, пагону та кореня проводили через 28 днів після постановки експерименту.

2.3. Рослинний матеріал

Рослинний матеріал, використаний у дослідженні, був отриманий з нестерильної культури. Насіння висівали в стерилізований ґрунт і вирощували в темряві в кімнаті для розведення при 24°C протягом 1 тижня.

2.4. Одержання калюсної культури

Сіянці збирали через 7 діб культивування, промивали в 75% етанолі протягом 30 с, поверхню стерилізували 7% комерційним відбілювачем, що містить 4,8% гіпохлориту натрію, і промивали 4 рази стерильною дистильованою водою. Сегменти гіпокотилію довжиною приблизно 10-15 мм вирізали та культивували в чашках Петрі на модифікованому середовищі MS (2 мг/л нікотинової кислоти; 2 мг/л піридоксину) (Murashige and Skoog, 1962), доданому 3% (мас./об.) сахарозу як джерело вуглецю та затверділи 0,8% агаром. рН середовища доводили до 5,6-5,8 перед автоклавуванням. Для отримання відповідних умов для калюсогенезу до базального живильного середовища додавали та досліджували чотири варіанти комбінацій рослинних гормонів: 1) 0,5 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,05 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (НОК); 2) 0,5 мг/л БАП і 0,5 мг/л 3-індолілоцтової кислоти (ІОК); 3) 1 мг/л кінетину (КІН) та 0,5 мг/л ІОК; 4) 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК. Культури калюсу індукували в чашках Петрі діаметром 120 мм, кожна з яких містила 60 мл досліджуваного середовища та 12 експлантів гіпокотилію. Для кожної комбінації регуляторів росту рослин було протестовано щонайменше 96 експлантів. Після 8 тижнів культивування калюсну тканину переносили в 150-мм чашки Петрі. Культури інкубували у фітотроні в темряві при 24°C і пересівали на свіже середовище кожні 4 тижні. Будь-які утворені органи видаляли під час перенесення на свіже середовище. Найбільш придатні калюси для ініціації суспензійних культур вибирали після 6 місяців культивування.

2.5. Ініціація клітинної суспензійної культури

Тканини калюсу, отримані на твердому модифікованому середовищі MS з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК, використовували для отримання суспензійних культур клітин. Для ініціації культур 5 г недиференційованої пухкої калюсної тканини подрібнювали та переносили в колбу Ерленмейера на 250 мл, що містила 100 мл рідкого середовища.

Базальне середовище складалося з мікроелементів напівактивності, немодифікованих мікроелементів та слабо модифікованих органічних сполук (2 мг/л нікотинової кислоти; 2 мг/л піридоксину) середовища MS. Для визначення відповідних умов для індукції суспензійних культур клітин льону випробували дві комбінації фітогормонів: 1) 2 мг/л БАП і 0,5 мг/л НОК і 2) 0,5 мг/л БАП і 0,5 мг/л НОК. Всього було перевірено 20 колб на кожен комбінацію рослинних гормонів. Усі суспензії інкубували на орбітальному шейкері при 120 об/хв у темряві при 24°C і пересівали кожні 14 днів. Посіви проводили протягом 220 днів.

2.6. Визначення параметрів суспензійної культури клітин

Ріст клітинних суспензій протягом 14-денного циклу визначали вимірюванням FW. Клітини та агрегати відсівали на стерильне сито з автоклавованими стандартними якісними фільтрувальними паперами та зважували в асептичних умовах на 3, 5, 7, 10, 12 та 14 добу культивування. На 14-й добу культивування DW визначали після сушіння при 70°C. Збільшення FWs і DWs оцінювали в 10 колбах для кожної комбінації рослинних гормонів.

2.7. Визначення вмісту лігнанів

Використовували метод силілювання для отримання триметилсилилових (TMS) похідних лігнанів із екстрактів льону (*Linum usitatissimum*). Відібрані екстракти з вирощених *in vitro* пагонів *L. usitatissimum* змішували з 1 мл (4:1 об'єм/об'єм) суміші піридину (використовується як розчинник та каталізатор для реакції) та BSTFA (N,O-біс-(триметилсиліл)-трифторметиламіду) виконує функцію реагента, що постачає триметилсилильні групи ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), та додавали 1% триметилхлорсилану при 70 °C протягом 60 хвилин для синтезу триметилсилилових похідних лігнанів. Процедура при 70 °C протягом 60 хвилин дозволяє повністю перетворити гідроксильні та інші реактивні групи

лігнанів на триметилсилильні похідні, які є більш леткими і термостійкими, що важливо для проведення аналітичних методів

Визначення метилових ефірів ЖК здійснювали за допомогою хроматомас-спектрометричної системи Agilent 6800N/5973 inert. Колонка HP-5MS (довжиною 30 м та внутрішнім діаметром 0,25 мм) з використанням нерухомої фази 5 %-вого фенілметилполісилоксану товщиною 0,25 мм. Газ носій гелій (1 мл/хв), температура термостата 150–250 °С, підвищення температури 4 °С/хв. Температура випарювача становить 250 °С. Детектор мас-спектрометричний, температура інтерфейсу дорівнює 250 °С.

Для точного калібрування стандарти секоізоларицирезинолу SECO та анхіроізоларицирезинолу ANHSECO.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Оптимізація умов культивування *in vitro* для отримання калюсної культури клітин льону (*Linum usitatissimum* L.)

Найбільш часто використовуваними джерелами клітин для ініціації суспензій є створені калюсні культури, що складаються з недиференційованих і вільно з'єднаних клітин. Щоб отримати ці калюси, культури повинні зберігатися приблизно 6 місяців. Ріст і проліферація калюсних тканин значною мірою залежить від зовнішнього надходження рослинних гормонів у синтетичні середовища. Через 16 днів культивування на середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК (варіант 1) приблизно 90% експлантів гіпокотилу утворювали калюсні тканини по всій довжині. Калюси зазвичай були жовтими та пухкими, іноді білими з компактною структурою, спостерігалось утворення пагонів (рис. 3.1). Після 28 днів культивування швидкість утворення калюсу була високою, тоді як також спостерігався органогенез пагонів (рис. 3.2). Поява органогенезу розглядалася як негативний і ненавмисний ефект; тому впроваджено новий варіант (4) комбінації фітогормонів (0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК).

Рис. 3.1. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК (гіпокотиль через 16 діб культивування)

Рис. 3.2. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК (гіпокотиль через 28 діб культивування)

Протягом наступних 4 тижнів у варіанті 1 спостерігали калюсогенез та ризогенез. Як показано на рисунку 3.3, зазвичай білі та ущільнені калюси формували пагони, де як коріння утворювалися в меншій кількості та переважно на жовтих калюсах. Після 120 діб культивування тканини калюсу стали більш однорідними (жовтими та пухкими), і органогенез не спостерігався (рис. 3.4). Через 16 діб культивування на середовищі з вмістом 0,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л ІОК (варіант 2) трохи більше 50% експлантатів утворювали калюси з гетерогенною структурою (рис. 3.5).

Рис. 3.3. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК після 56 діб культивування.

Протягом наступних 2 тижнів швидкість утворення калюсів зросла; деякі гіпокотилі були вкриті жовтими та пухкими калюсами, а інші — ущільненими та твердими білими або коричневими калюсами (рис. 3.6). Про наявність коренів на експлантатах повідомлялося рідко.

Рис. 3.4. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК (відносно гомогенна калюсна тканина після 120 діб культивування)

Рис. 3.5. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,5 мг/л ІОК (гіпокотилі після 16 діб культивування з відносно низьким ростом калюсу)

Рис. 3.6. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,5 мг/л ІОК (гіпокотилі після 28 діб культивування, вкриті неоднорідною калюсною тканиною)

Частота калюсоутворення в цьому варіанті була відносно низькою; крім того, калюси були неоднорідними, що означає жовті, білі та коричневі калюси в одному експлантаті (рис. 3.7, рис. 3.8).

Рис. 3.7. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,5 мг/л ІОК (калюсна тканина після 56 діб культивування з зонами білих і щільних фрагментів)

Після 16 діб культивування на середовищі з додаванням 1 мг/л Кін та 0,5 мг/л ІОК (варіант 3) 70% гіпокотилів були набряклими по всій довжині, і лише деякі виробляли калюси на місці пошкодження (рис. 3.9).

Рис. 3.8. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,5 мг/л ІОК (негомогенна калюсна тканина після 120 діб культивування з коричневими ущільненими фрагментами)

Рис. 3.9. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 1,0 мг/л Кін і 0,5 мг/л ІОК (гіпокотиль після 16 діб культивування, низький ріст калюсу).

Перед першим пасажем на свіже середовище було виявлено кореневий органогенез (рис. 3.10). Калюси були жовтими та пухкими, а також білими та жорсткими. Після 2 місяців культивування ризогенез все ще тривав (рис. 3.11). Через 120 днів тканини калюсу були майже однорідними з незначними вставками білих тканин (рис. 3.12). Через 16 днів більшість експлантатів

(близько 90%) у варіанті 4 обросли жовтими та пухкими калюсами (рис. 3.13), а через 28 днів органогенез не спостерігався (рис. 3.14). Швидкість калюсоутворення була найвищою в цьому варіанті. Через 2 місяці калюсна тканина була досить гомогенною (рис. 3.15), з кількома вставками білих і коричневих тканин. Структура калюсної тканини після 120 днів культивування була адекватною для індукції клітинної суспензії. Калюси були пухкими, однорідними за структурою та легко дробилися (рис. 3.16). У модифікованому середовищі MS з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК отримано швидкозростаючий і пухкий калюс; тому ми рекомендуємо використовувати цю комбінацію рослинних гормонів для отримання відповідної калюсної тканини для ініціації клітинної суспензії сорту льону-волокна Гладіатор.

Рис. 3.10. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 1,0 мг/л Кін і 0,5 мг/л ІОК (гіпокотилі після 28 діб культивування, деякі експланти вкриті білою та твердою калюсною тканиною)

Рис. 3.11. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 1,0 мг/л Кін і 0,5 мг/л ІОК (калюсна тканина після 56 діб культивування з численними вставками білих і твердих фрагментів)

Іншим вирішальним фактором, що впливає на ефективність ініціації клітинних суспензійних культур, є склад рідкого середовища. У дослідженні накопичення лігнінів і лігнанів у суспензії льону Хано та його співробітники (2006) використовували середовище MS з додаванням 2 мг/л БАП і 0,5 мг/л НОК. Тому ми вирішили перевірити, чи підходить ця комбінація рослинних гормонів (варіант 1) для отримання високої частоти проліферації клітин і виробництва біомаси Гладіатор.

Рис. 3.12. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 1,0 мг/л Кін і 0,5 мг/л ІОК (калюсна тканина після 120 діб культивування, видимі білі включення).

Рис. 3.13. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК (гіпокотиль після 16 діб культивування з відносно високим ростом калюсу, особливо в місці пошкодження).

Рис. 3.14. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК (гіпокотиль після 28 діб культивування).

Також досліджували вплив рівних кількостей цитокініну та ауксину (0,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК) на параметри росту суспензії (варіант 2) у рідкому середовищі.

Рис. 3.15. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК (калюс після 56 діб культивування, що складається з жовтої та пухкої тканини).

Рис. 3.16. Калюсна тканина на твердому середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК (гомогенна калюсна тканина після 120 діб культивування)

Більший приріст сирової маси калюсу спостерігався у варіанті 2 (рис. 3.17). У цьому випадку швидкість росту була високою протягом перших кількох днів після перенесення (відсутність лаг-фази), а сира маса калюсу подвоювалася через 5 діб культивування. Найбільший приріст біомаси виявлено між 7-м і 10-м днями культивування в обох варіантах. Приріст сухої маси калюсу був меншим у варіанті 1 (рис. 3.18). Отримані результати показали, що високі концентрації цитокініну (БАП) у рідкому середовищі обмежують проліферацію клітин і зменшують утворення біомаси.

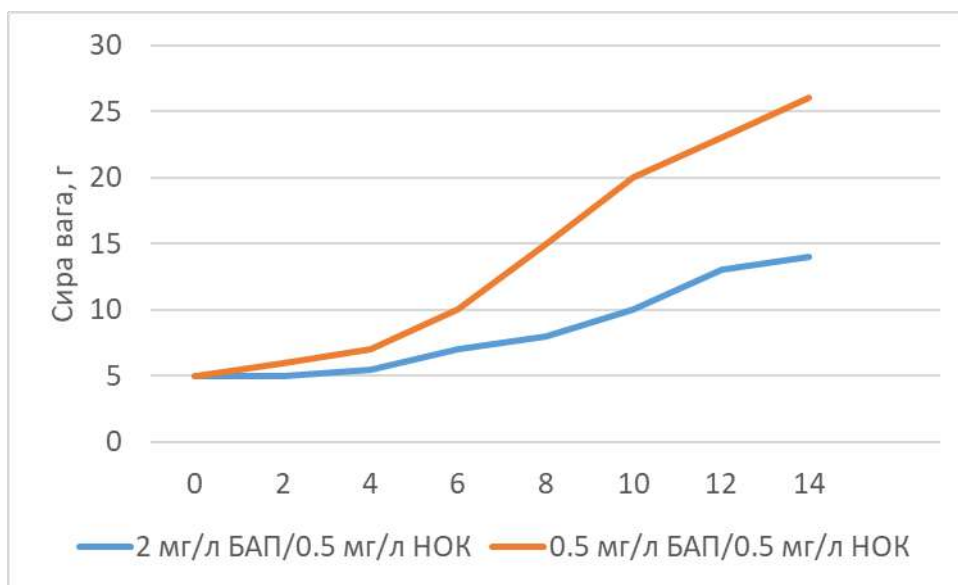


Рис. 3.17. Приріст сирової маси калюсу протягом 14-добового циклу

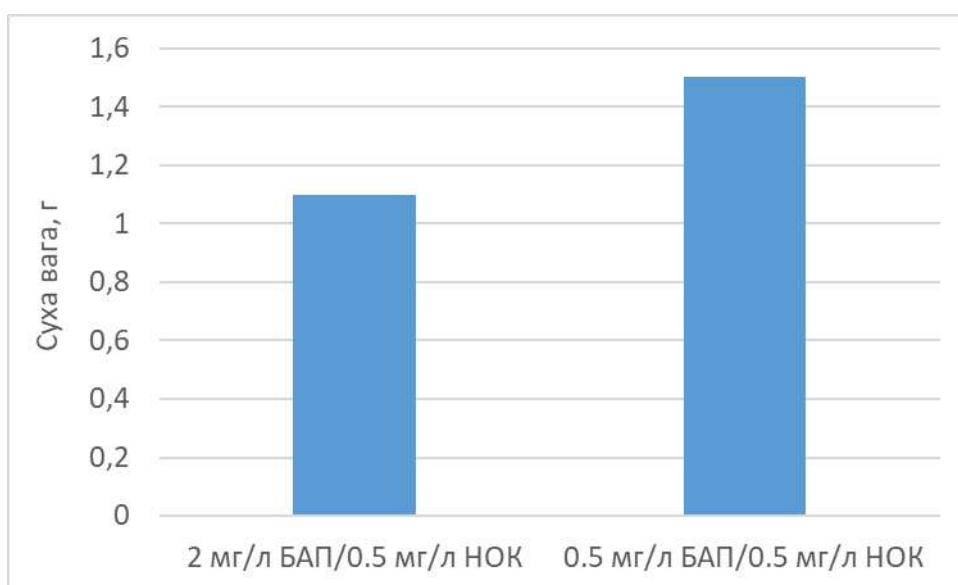


Рис. 3.18. Кількість сухої маси калюсу після 14-добового циклу

Суспензії культивували протягом 220 днів для перевірки стабільності культур. Реєстрували спонтанні зміни структури клітинних агрегатів. Калюсна тканина набула коричневого кольору і ущільнилася, швидкість росту знизилася, і, нарешті, всі змінені суспензії загинули приблизно в 15% колбах з обох варіантів. Цей ефект не корелював із тривалістю культивування. При цьому суспензія виглядала однорідною і складалася з клітин і клітинних агрегатів у 85% колб.

У попередніх дослідженнях культур льону *in vitro* як джерело експлантатів зазвичай використовували гіпокотилі, встановлювали їхню здатність до пагоноутворення та соматичного ембріогенезу. Janowicz і Wojciechowski (2009) підтвердили, що гіпокотильні експлантати мають найвищий морфогенетичний потенціал. Наші дослідження показують, що гіпокотильні експлантати льону Modran cv. підходять для індукції утворення калюсу, і при правильному виборі комбінація рослинних гормонів блокує природну здатність органогенезу гіпокотилів. Серед рослинних гормонів ауксини та цитокініни виявляються найбільш ефективними у сприянні утворенню калюсів. Белоногова та Ралдугіна (2006) показали високу частоту калогенезу в експлантатах сім'ядолей на середовищі з додаванням ауксину (НОК). Крім того, Janowicz і Wojciechowski (2009) показали, що експлантати гіпокотилію Modran були найбільш ефективними у формуванні калюсної тканини на середовищі MS з додаванням НОК. Бурбуліс і співавтори (2005) продемонстрували, що додавання цитокініну позитивно впливає на регенерацію пагонів з калюсу. Подібні результати були отримані Salaj та співробітниками (2005) для експлантів гіпокотилію.

Морфогенетичний потенціал калюсної тканини спостерігався на середовищі, доповненому цитокініном, тоді як неморфогенний калюс спостерігався на середовищі, зміненому лише ауксином (Salaj et al., 2005). Наші результати підтвердили ці попередні повідомлення. Серед досліджуваних комбінацій регуляторів росту рослин найвища частота утворення калюсу спостерігалася на середовищі з додаванням БАП та НОК;

крім того, стимулюючий ефект цитокинінів на формування пагонів може бути скасований додаванням ауксину. Mundhara and Rashid (2002) припустили, що певною мірою органогенез пагонів на гіпокотиліях визначається вмістом цитокинінів у середовищі, але залежить від умов освітлення. Ми продемонстрували, що утворення пагонів на гіпокотиліях відбувалося в темряві, а утворені пагони були етіольованими.

Ми виявили, що більш висока концентрація цитокиніну в рідкому середовищі мала інгібуючу дію на проліферацію клітин і утворення біомаси. Це спостереження підтвердило доповідь Жана та його співробітників (1989), які стверджували, що занадто висока концентрація цитокиніну в середовищі пригнічує регенерацію та перешкоджає утворенню калюсу. Результати наших досліджень свідчать про те, що відповідний баланс між кількістю ауксину та цитокиніну в середовищі сприяє проліферації клітин і збільшує виробництво біомаси в суспензійних культурах.

3.2. Вплив регуляторів росту на здатність до регенерації експлантатів гіпокотилію льону (*Linum usitatissimum* L.) у культурі *in vitro*

Гіпокотильні експлантати двох досліджуваних сортів формували пагони на контрольному середовищі MS та на середовищах, доповнених регуляторами росту, шляхом прямого органогенезу.

Калюс утворився на експлантатах лише в місцях пошкодження тканини. Жоден з експлантатів не утворив коренів. Ефективність регенерації пагонів, що визначається відсотком експлантатів гіпокотилів, що формують пагони, представлена в табл. 3.1.

Обидва досліджувані сорти показали різну здатність до регенерації. На відсоток експлантатів, що утворюють пагони, і кількість пагонів, утворених одним експлантатом, впливали регулятори росту, додані до середовища, як описано нижче.

На контрольному середовищі MS експлантати гіпокотилу «Гладіатор» і «Сіверський» утворювали пагони з частотою 72,0 % і 53,0 % відповідно. Додавання БАП у середовище поступово збільшувало кількість гіпокотилів, що утворюють пагони. Навіть низька концентрація БАП у середовищі (0,2 мг/л) стимулювала регенерацію в обох сортів. При збільшенні концентрації цього регулятора росту в середовищі (але лише до певного рівня) спостерігалось відсоткове збільшення експлантатів, що утворюють пагони.

Таблиця 3.1

Відсоток гіпокотильних експлантатів сортів льону (*Linum usitatissimum* L.), що утворюють пагони, на контрольному середовищі MS та середовищі MS, доповненому різними концентраціями БАП та НОК

Концентрація регуляторів росту [мг/л]	Сорт	
	середній % експлантатів, що утворюють пагони	
	Гладіатор	Сіверський
MS	72±2	53±3
MS + 0,2 БАП	75±1	54±2
MS + 0,5 БАП	79±1	57±3
MS + 1,0 БАП	90±2	68±3
MS + 1,5 БАП	86±3	64±2
MS + 2,0 БАП	73±3	61±2
MS + 0,2 НОК	61±2	49±1
MS + 0,5 НОК	53±2	46±2
MS + 1,0 НОК	49±1	46±1
MS + 1,5 НОК	46±1	42±2
MS + 2,0 НОК	46±1	35±1

З іншого боку, за концентрації БАП у середовищі понад 1,0 мг/л спостерігалось зменшення кількості експлантатів, які формували пагони.

Також було відмічено, що, незважаючи на зниження ефективності регенерації, при вищих концентраціях БАП відсоток експлантатів, що утворюють пагони, все ще був вищим, ніж на контрольній МС. Найкращим середовищем для обох сортів виявилось середовище з додаванням 1 мг/л БАП. Що стосується цієї концентрації, то ефективність обох сортів, «Гладіатор» і «Сіверський», оцінена відповідно в 90,0% і 68,0%. Іншим регулятором росту, випробуваним у цьому дослідженні, був НОК, який загалом знижував здатність утворювати пагони експлантатами гіпокотилію. Навіть невеликі кількості НОК, додані до середовища, викликали негативний ефект у цьому відношенні. Зрештою, за концентрації НОК у середовищі 2 мг/л регенераційна здатність склала 46,0% для Гладіатор та 35,0% для сорту Сіверський. Крім того, на середовищі, доповненому НОК, спостерігалось збільшення кількості зів'язаних експлантатів гіпокотилію.

Рис. 3.19. Сорт льону Гладіатор (*Linum usitatissimum* L.) гіпокотиль експлантату формує пагони на контрольному середовищі MS

Крім того, були відмінності в кількості пагонів, утворених одним експлантатом (дані не наведені в таблиці, оскільки в більшості випадків спостерігалися однакові значення). Порівняно з контрольними середовищами, на яких гіпокотилі утворювалися в середньому на 1-3 пагонах (рис. 3.19), на середовищах з додаванням БАП або НОК кількість пагонів була більшою і коливалася від 5 до 8 пагонів на експлантат (рис. 3.20).

Регулятори росту рослин, застосовані в цьому експерименті, мали значний вплив на успішну культуру *in vitro*, причому кожен фітогормон мав певний вплив на розвиток рослини. Вже давно відомо, що за допомогою відповідного вибору речовин (наприклад, гормонів) та їх концентрацій ріст клітин і органів для культур *in vitro* можна легко контролювати (Pierik, 1987). Однак доступна література демонструє, що льон дуже схильний до будь-яких модифікацій у середовищах, включаючи додавання різних регуляторів росту в різних концентраціях.

Рис. 3.20. Сорт льону Гладіатор (*Linum usitatissimum* L.) гіпокотиль експлантату формує пагони на середовищі MS з додаванням 1,0 мг мг/л БАП

Зазвичай використовуються не лише регулятори росту, представлені в цьому дослідженні, але й інші, як-от. TDZ або 2iP (Yildiz and Özgen, 2006; Burbulis et al., 2009). Згідно з декількома дослідженнями, 6-БАП є одним із найефективніших гормонів, які можуть бути використані для покращення регенераційної здатності льону в умовах *in vitro* (Zhan et al., 2009b; Janowicz and Wojciechowski, 2009). У наших експериментах додавання БАП до середовища також збільшило кількість експлантатів, що утворюють пагони, для обох сортів. Подібним чином інші джерела показують, що збагачення 1 мг/л БАП є найефективнішою концентрацією регулятора для цього виду (Burbulis et al., 2007). З іншого боку, додавання НОК не покращує здатність експлантів до регенерації. Крім того, НОК знижує цю здатність і знижує ефективність пагоноутворення порівняно з контролем (Белоногова, Ралдугіна, 2006). Відповідно до літератури, додавання 1 мг/л БАП і 0,02 мг/л

НОК є найкращою комбінацією для стимулювання регенерації льону в умовах *in vitro* (Dong and McNughen, 2003). У цьому дослідженні не було зроблено жодних спроб поєднати ці регулятори росту, хоча ця ідея здається вартою того, щоб її вивчити в майбутньому.

3.3. Вплив типу експлантатів та регуляторів росту на індукцію пагонів льону

Щоб підібрати відповідний тип експлантату для мікророзмноження льону в нашому експерименті, ми використали чотири різних експлантати, зокрема справжні листки, сім'ядольні листки, корінь і гіпокотиль, які культивували на середовищі МС, доповненому різними концентраціями ТДЗ (тідазурон) і КІН. Відмічено різну частоту регенерації. Найвища частота регенерації 81,6 % спостерігалася в експлантатах гіпокотиллю, які культивували на середовищі МС, що містить ТДЗ (0,5 мг/л) + КІН (0,5 мг/л). За додавання в живильне середовище лише ТДЗ в концентрації 0,5 мг/л також спостерігали максимальну індукцію пагонів з частотою регенерації 80,9%. За культивування експлантатів справжніх листків і сім'ядольних листків частота індукції пагонів становила 55,3% і 57,2% відповідно, на середовищі МС з додаванням ТДЗ (1,0 мг/л) і КІН (1,0 мг/л). Найнижча частота регенерації спостерігалася для корневих експлантатів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Вплив типу експлантату та регуляторів росту на індукції органогенезу в культурі *Linum usitatissimum* L.

Регулятор росту	Концент-рація, мг/л	Частота регенерації пагонів, %			
		Справжні листки	Сім'ядольні листки	Гіпокотиль	Корені
ТДЗ	0,5	19,7±0,6	13,1±0,5	84,3±0,6	10,3±0,6
ТДЗ	1,0	42,4±0,2	28,4±0,1	79,7±0,6	15,9±0,5
ТДЗ	1,5	25,4±0,6	39,4±0,2	54,1±0,2	25,5±0,5

КІН	0,5	55,2±0,3	22,1±0,6	62,3±0,4	30,3±0,1
КІН	1,0	44,0±0,2	24,3±0,5	64,7±0,4	26,5±0,6
КІН	1,5	38,2±0,2	30,6±0,1	54,2±0,3	15,7±0,5
ТДЗ + КІН	0,5:0,5	48,7±0,3	40,7±0,2	83,5±0,6	43,2±0,2
ТДЗ + КІН	1,0:1,0	55,1±0,3	54,1±0,3	80,4±0,6	36,7±0,1
ТДЗ + КІН	1,5:1,5	46,4±0,2	45,2±0,2	78,6±0,6	42,3±0,2

Різні експланти мають різні рівні індукції калюсу, що залежить від різних проявів тотипотентності клітин калюсу. Під час росту рослинної клітини *in vitro* природа експлантів відіграє важливу роль і визначає тип і спосіб регенерації, наприклад, індукцію калюсу, формування пагонів, індукцію додаткових коренів або соматичних ембріонів. Проте потенціал регенерації будь-якого виду рослин строго залежить від наявності регуляторів росту, складу середовища, генотипу рослини та фізіологічного стану експланта (Khan et al., 2020).

В роботі N. Burbulis та ін. досліджували морфогенну здатність експлантів гіпокотилу льону (*Linum usitatissimum L.*) у зв'язку з генотипом та дією регуляторів росту в середовищі. Серед досліджених генотипів експланти сортів 'Мікаель' та 'Барбара' виявили найбільшу та найменшу частоту адвентивного бутонування. Показано, що оптимальне співвідношення регуляторів росту для відновлення пагонів залежить від генотипу. Комбінації регуляторів росту 2,0 мг/л ТДЗ та 0,1 мг/л НОК виявилися найкращими для регенерації пагонів із гіпокотилів рослин 'Барбара' та 'Мікаель', тоді як 2,0 мг/л БАП у поєднанні з 0,1 мг/л НАК індукували ефективну адвентивну регенерацію пагонів, з високою частотою кількістю пагонів на експлант з гіпокотилів рослин сорту 'Szaphir' (Burbulis et al., 2009).

В роботі Naggar A. та ін метою цього дослідження було створення ефективної методики регенерації *in vitro* з використанням експлантів гіпокотилу п'яти сортів льону (чотирьох єгипетських і одного канадського). З 5-денних проростків асептично вирізували гіпокотильні зрізи та культивували

на середовищі MS з вітамінами Гамборга (MSO) з додаванням окремого або комбінації фітогормонів різної концентрації (8 середовищ). Культури витримували протягом 5 тижнів у шафі з контрольованим вирощуванням, а отримані пагони асептично поміщали на MSO, вільне від гормонів, для вкорінення та витримували протягом двох тижнів у тих самих умовах, що використовувалися для відстрілу. Кількість диференційованих бруньок на гіпокотиль суттєво різнилася серед досліджуваних генотипів і середовищ. Giza-7 показав найбільшу кількість диференційованих бруньок/гіпокотиль (7140), тоді як NorLin (Канада) посів останнє місце (4892). Максимальна кількість ініціалів пагонів на гіпокотиль була отримана при додаванні 1 ppm кінетину як єдиного цитокініну (MSI) для всіх сортів. З іншого боку, додавання високих концентрацій ауксинів призвело до розвитку калюсу, утворення коренів на сегментах гіпокотиллю та пригнічення ініціації бруньок. Ініціали пагонів, протестованих усіх експлантатів, утворили нормальні корені після перенесення на середовище без гормонів (MSO) протягом двох тижнів. Найефективнішою видається процедура регенерації, яка базується на використанні гіпокотилів як експлантів, середовища MS I для відстрілювання та середовища MSQ для укорінення. Крім швидкої, незалежної від генотипу та ефективної частоти регенерації, дана процедура має ще одну перевагу уникнення утворення калюсу, тобто уникнення соматклональної варіації. Цей тип прямої регенерації був би корисним для методики трансформації, опосередкованої *Agrobacterium* (Naggar et al., 2009).

В дослідженнях Akter F. та ін варіабельний калюс був індукований у насіння льону (*Linum usitatissimum* L.) cv. Neela залежно від типу експлантату та середовища для інокуляції. Було встановлено, що сім'ядолі як експланти, інокульовані в середовище MS з 1,0 мг/л БАП, є найкращими для високоефективної індукції калюсу. На регенерацію рослин з калюсу також впливало джерело експлантів і використовувані регулятори росту. Найбільшу кількість пагонів на інокулят було отримано в середовищі MS, доповненому 2,0 мг/л БАП +0,5 НОК мг/л. У регенерації пагонів найкращий результат дали

калюси, отримані з міжвузлів, за ними йдуть калюси, отримані з сім'ядолей і листків. Пагони регенерації найефективніше вкорінювалися в середовищі 1/2MS з додаванням 0,5 мг/л НОК (Akter et al., 2009).

У нашому дослідженні появу перших пагонів спостерігали на п'ятий день культивування після перенесення гіпокотилів на живильне середовище, доповнене ТДЗ (1,0 мг/л), на середовищі з кінетином 0,5 мг/л пагоноутворення спостерігали на 11 добу культивування.

В нашому дослідження максимальна кількість пагонів 5,8 з найбільшими показниками висоти пагонів 5,4 см спостерігали на живильному середовищі, доповненому ТДЗ (0,5 мг/л) + КІН (0,5 мг/л). Найменшу кількість пагонів 1,0 і довжину пагонів 2,8 см спостерігали на живильному середовищі, доповненому ТДЗ (1,0 мг/л) (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Пагоноутворення в культурі *in vitro* *Linum usitatissimum* L.

Регулятор росту	Концентрація, мг/л	Доба ініціації пагонів	Коефіцієнт розмноження	Довжина пагонів max	Сира вага пагонів
ТДЗ	0,5	6,1±0,6	1,1±0,2	2,3±0,2	880±6,0
ТДЗ	1,0	5,8±0,2	1,0±0,1	2,7±0,2	920±5,0
ТДЗ	1,5	6,5±0,6	1,1±0,2	2,9±0,2	1000±5,0
КІН	0,5	11±0,3	1,3±0,2	3,8±0,1	210±5,0
КІН	1,0	11±0,2	1,0±0,1	3,6±0,1	260±6,0
КІН	1,5	12±0,2	1,5±0,1	3,8±0,3	250±6,0
ТДЗ + КІН	0,5:0,5	9,3±0,3	5,8±0,2	5,4±0,1	800±8,0
ТДЗ + КІН	1,0:1,0	7,4±0,3	1,5±0,1	4,8±0,2	760±6,0
ТДЗ + КІН	1,5:1,5	8,5±0,2	1,8±0,2	4,6±0,1	740±5,0

3.4. Синтез лігнанів пагонами *Linum usitatissimum* L.

В нашому дослідженні встановлено певні рівні фармакологічно активних лігнанів, зокрема секоізоларицирезинолу 22,2-34,7 мг/г сухої ваги, секоізоларицирезинолу диглюкозиду 2,8-3,4 мг/г сухої ваги ангідрозекоізоларицирезинолу диглюкозиду 4,8-6,8 мг/г сухої ваги в одержаних пагонах льону. Більші концентрації секоізоларицирезинолу 34,7 мг/г спостерігали в пагонах, одержаних на середовищі МС доповненому ТДЗ (0,5 мг/л) + КІН (0,5 мг/л). Найменші концентрації секоізоларицирезинолу виявлено на середовищі МС доповненому ТДЗ (1,5 мг/л) + КІН (0,5 мг/л) (рис. 3.21).

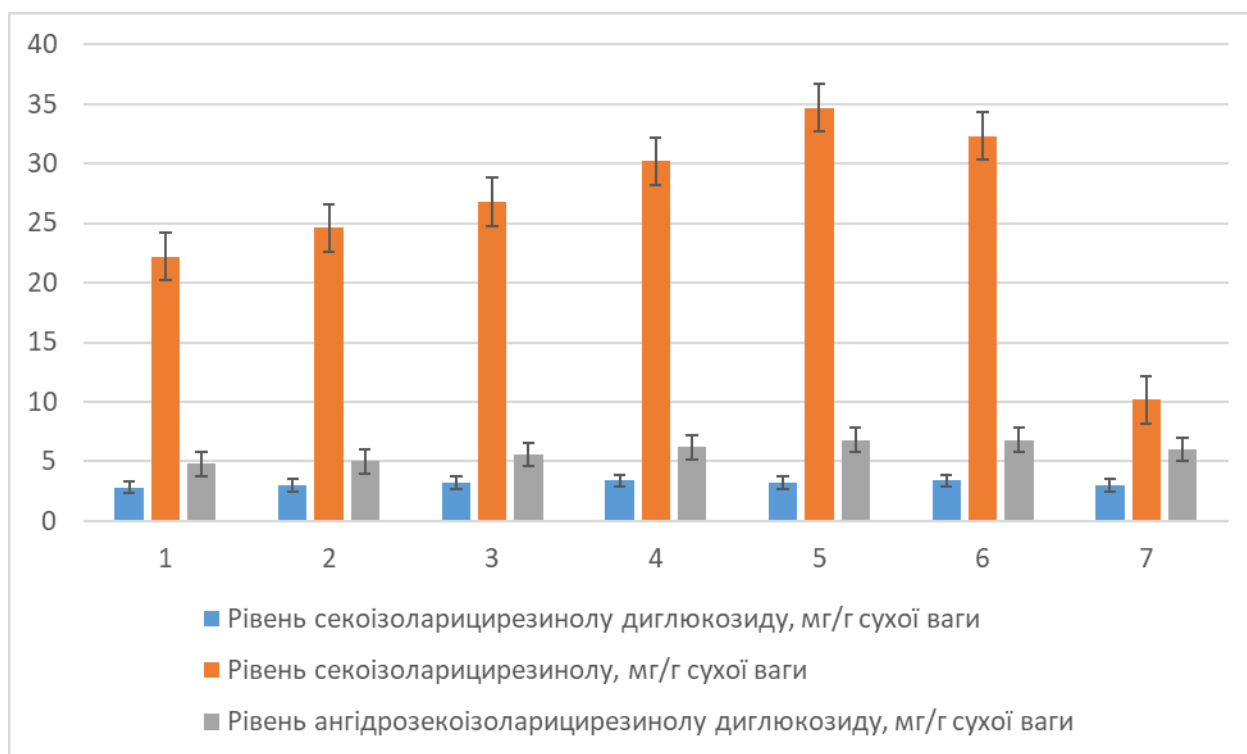


Рис. 3.21. Рівень накопичення лігнанів у пагонів льону на середовищі МС з різними концентраціями регуляторів росту: 1 – 0,5 мг/л ТДЗ, 2 – 1,0 мг/л ТДЗ, 3 – 1,5 мг/л ТДЗ, 4 – 0,5 мг/л КІН, 5 – 0,5 мг/л ТДЗ + 0,5 мг/л КІН, 6 – 1,0 мг/л ТДЗ + 0,5 мг/л КІН, 7 – 1,5 мг/л ТДЗ + 0,5 мг/л КІН

Кілька досліджень показали, що ТДЗ у поєднанні з іншими регуляторами росту, такими як БА або НОК, діяв більш ефективно для максимального виробництва лігнанів у калюсних культурах льону.

Наприклад, в дослідженнях Anjum S. та ін розробили ефективний протокол для виробництва лігнанів, таких як секоізоларицирезинолу диглюкозид (SDG) і ларицирезинолу диглюкозид (LDG) і неолігнанів, таких як глюкозид дегідродіконіферилового спирту (DCG) і глюкозид ефіру гваяцілгліцерин- β -коніферилового спирту (GGCG) за допомогою використання калюсних культур льону *in vitro*. Ці культури були створені з експлантів стебла та листя, інокульованих на середовища Мурасіге та Скуга (MS), доповнені різними концентраціями α -нафталінооцтової кислоти (NAA), тидіазурону (TDZ) та 6-бензиладеніну (BA). Результати показали, що калюси, отримані з листя (1,0 мг/л НОК), накопичували найвищі рівні біомаси (DW; 15,7 г/л) і антиоксидантну активність, у той час як найвище виробництво загальних фенолів (111,09 мг/л) і флавоноїдів (45,02 мг/л) спостерігалися в калюсах, отриманих зі стебла (1,0 мг/л НОК). Аналіз високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) показав, що калюси, отримані зі стебла (1,0 мг/л НОК), накопичували оптимальні концентрації SDG ($2,7 \pm 0,021$ мг/г DW), LDG ($9,8 \pm 0,062$ мг/г DW) та DCG ($13,8 \pm 0,076$ мг/г DW), при цьому калюси, отримані з листя (1,0 мг/л НОК), показали оптимальне накопичення GGCG ($3,8 \pm 0,022$ мг/г DW) порівняно з усіма іншими обробками. Ці результати надали певні докази того, що НОК по-різному впливає на виробництво лігнанів і неолігнанів у культурі калюсу льону. Це дослідження відкриває нові виміри для розробки стратегій для посилення виробництва цих цінних метаболітів (Anjum et al., 2017).

В роботі Fazal H. та ін культури додаткових коренів *Prunella vulgaris* L. були створені в системі струшувальних колб для виробництва біомаси та вторинних метаболітів. Культури адвентивних коренів були індуковані з культур калюсу, отриманих з листових експлантів на твердому середовищі Мурасіге та Скуга (MS), що містило комбінацію 6-бензиладеніну (BA; $1,0$ мг/л⁻¹) і нафталінооцтової кислоти (НОК; $1,5$ мг/л⁻¹). Після цього $0,49$ г інокулята переносили в рідке середовище MS, доповнене різними концентраціями НОК ($0,5$ - $2,0$ мг/л⁻¹). Кінетику росту додаткових коренів

реєстрували з інтервалом 7 діб протягом 49 діб. Найбільше накопичення біомаси (2,13 г/л) спостерігалось в рідкому середовищі, що містило 1,0 мг/л⁻¹ НОК через 21 день інокуляції. Однак інші концентрації NAA також показали подібну схему накопичення, але біомаса поступово зменшується після 49 днів інокуляції. Придаткові корені збирали та сушили для дослідження загального вмісту фенолів (TP), загального вмісту флавоноїдів (TF) і антиоксидантної активності. Вищі TPC (0,995 GAE мг/г-DRB) і TFC (6,615 RE мг/г-DRB) спостерігалися в культурах, оброблених 0,5 мг/л⁻¹ НОК. Навпаки, вищу антиоксидантну активність (83,53 %) спостерігали в культурах, оброблених 1,5 мг/л⁻¹ НОК. Ці результати допомагають збільшити масштаби кореневих культур у біореактор для виробництва вторинних метаболітів (Fazal et al., 2014).

ВИСНОВКИ

1. Через 16 діб культивування на середовищі з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК (варіант 1) 90% експлантатів гіпокотилу утворювали калюсні тканини по всій довжині. Калюси зазвичай були жовтими та пухкими, іноді білими з компактною структурою, спостерігалось утворення пагонів.

2. Після 28 діб культивування швидкість утворення калюсу була високою, тоді як також спостерігався органогенез пагонів

3. Серед досліджуваних комбінацій регуляторів росту рослин найвища частота утворення калюсу спостерігалася на середовищі з додаванням БАП та НОК

4. Швидко ростучий, пухкий калюс був отриманий на модифікованому живильному середовищі MS з додаванням 0,5 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК.

5. Для одержання клітинної суспензії оптимальним є живильне середовище MS доповнене 0,5 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК.

6. Показано, що висока концентрація цитокініну (БАП) у рідкому живильному середовищі обмежує проліферацію клітин і знижує утворення біомаси.

7. Найвищу ефективність регенерації спостерігали на середовищах з додаванням 1 мг/л 6-БАП.

8. Найвищу інтенсивність органогенезу пагонів спостерігали за використання в якості експлантату гіпокотилі на живильному середовищі MS, доповненому 0,5 мг/л ТДЗ і 0,5 мг/л КІН, максимальна частота індукції пагонів становила 83,5%, коефіцієнт розмноження 5,8, довжина пагонів 5,4 см.

9. Вміст лігнанів в пагонах льону становив: секоізоларицирезінолу 22,2-34,7 мг/г сухої ваги, секоізоларицирезінолу диглюкозиду 2,8-3,4 мг/г сухої ваги, ангідрозекоізоларицирезінолу диглюкозиду 4,8-6,8 мг/г сухої ваги.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Akter, F.; Parvez, M.; Islam, M.; Mondol, P.; Alam, M. Callus culture and plant regeneration in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Environ. Dev.* 2008, 2, 101.
2. 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 Tissue Organ Cult.* 2017, 129, 73–87.
3. Barkoula N.M., Garkhail S.K., Peijs T. (2010) Biodegradable composites based on flax/polyhydroxybutyrate and its copolymer with hydroxyvalerate. *Ind. Crops Prod.* 31: 34-42. Behar N., Kumar P., Chandel G. (2011) Effect of explant type, genotype and plant growth regulators on morphogenetic potential of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Cell Plant Sci.* 2: 13-18.
4. Basiran N., Armitage P., Scott R.J., Draper J. (2007) Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens*: regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell Rep.* 6(5): 396-399.
5. Belonogova M.A., Raldugina G.N. (2016) Shoot regeneration from cotyledon explants of fiber flax (*Linum usitatissimum*) and their subsequent rooting. *Russ. J. Plant Phys.* 53: 501-506.
6. Bjelkova M., Gencurova V., Griga M. (2011) Accumulation of cadmium by flax and linseed cultivars in field stimulated conditions: a potential for phytoremediation of Cd-contaminated soils. *Ind. Crops Prod.* 33: 761-774.
7. Broadley M.R., Willey N.J., Wilkins J.C., Baker A.J.M., Mead A., White P.J. (2011) Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytol.* 152: 9-27.
8. Burbulis N., Blinstrubiene A., Venskutoniene E., Katauskyte L. (2015) Organogenesis in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. *Acta Univ. Latv.* 691: 129-135.

9. Burbulis N., Blinstrubiene A., Kupriene R., Sliesaravicius A., Venskutoniene E. (2017) Optimization of linseed flax (*Linum usitatissimum* L.) in vitro cultures. *Zemdirbyste Agricult.* 94(4): 120-128.
10. Burbulis N., Blinstrubiene A., Kupriene R. (2009) Regeneration of adventitious shoots of linseed (*Linum usitatissimum* L.) from hypocotyls explants. *Zemdirbyste-Agricult.* 96(3): 168-175.
11. Chlyah H., Sqalli-Khalil M., Chlyah A. (2010) Dimorphism in bud regeneration in flax (*Linum usitatissimum*). *Can. J. Bot.* 58(6): 637
12. Cullis C. (2011) *Linum*. In: Wild crop relatives: genomic and breeding resources, oilseeds, ed. Kole C, Springer-Verlag, Heidelberg-Berlin, pp. 177-189.
13. Danya, U.; Udhayasankar, M.; Punitha, D.; Arumugasamy, K.; Suresh, S. In vitro regeneration of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem-an endangered medicinal plant. *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.*
14. David H., Bade P., David A., Savy C., Demazy C., Van Cutsem P. (2015) Pectins in walls of protoplast-derived cells imbedded in agarose and alginate beads. *Protoplasma* 186: 122-130.
15. Dong J., McHughen A. (2013) An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 88: 61-71.
16. Duguid S.D. (2009) Flax. In: Oil crops, handbook of plant breeding 4, ed. Vollmann J., Rajcan I., Springer Science – Business Media, New York, pp. 233-254.
17. Gamborg O.L., Shyluk J.P. (2016) Tissue culture, protoplasts and morphogenesis in flax. *Bot. Gaz.* 137: 301-306.
18. Fazal, H.; Abbasi, B.H.; Ahmad, N. Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 174, 2086–2095.
19. Hano C., Addi M., Bensaddek L., Crônier D., Baltora-Rosset S., Doussot J. et al. (2016) Differential accumulation of mono-lignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* 223: 975-989.

20. Hano C., Renouard S., Molinié R., Corbin C., Barakzoy E., Doussot J. et al. (2013) Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) extract as well as (+)-secoisolariciresinol diglucoside and its mammalian derivatives are potent inhibitors of α -amylase activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 3007-3012.
21. Heller K. (2012) Metodyka integrowanej ochrony roślin dla uprawy lnu włóknistego. Methodology of integrated plant protection for the cultivation of fibrous flax. <https://www.minrol.gov.pl/content/download/38414/213340/version/2/>
22. Ibrahim R.K. (2011) Media for growth of flax tissue culture. *Can. J. Bot.* 49: 295-298.
23. Janowicz J., Wojciechowski A. (2009) The evaluation of re-generation ability of two flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars in in vitro culture. *Oilseed Crops.* 30: 35-50.
24. 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. *Biotechnol. J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol.* 2012, 93, 135–138.
25. Jordan M.C., McHughen A. (2018) Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium* mediated gene-transfer. *Plant Cell Rep.* 7: 281-284.
26. Khan, I.; Khan, M.A.; Shehzad, M.A.; Ali, A.; Mohammad, S.; Ali, H.; Alyemeni, M.N.; Ahmad, P. Micropropagation and Production of Health Promoting Lignans in *Linum usitatissimum*. *Plants* 2020, 9, 728.
27. Ling H.Q., Binding H. (2017) Transformation in protoplast cultures of *Linum usitatissimum* and *L. suffruticosum* mediated with PEG and with *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Plant Physiol.* 151: 479-488.
28. Ling H.Q., Binding H. (2017) Plant regeneration from protoplasts in *Linum*. *Plant Breeding* 98: 312-317.
29. Ling H.Q., Binding H. (2012) Improvement of plant regeneration from *Linum* protoplasts by the induction of somatic embryogenesis. *J. Plant Physiol.* 139(4): 422-426

30. Malik S., Bíba O., Grúz J., Arroo R.R.J., Strnad M. (2014) Biotechnological approaches for producing aryltetralin lignans from *Linum* species. *Phytochem. Rev.* 13: 893-913.
31. Millam S., Obert B., Pretová A. (2005) Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. *Plant Cell Tiss. Org.* 82: 93-103.
32. Miśta D., Króliczewska B., Zawadzki W., Pecka E., Steininger M., Hull S., Żuk M., Szopa J. (2011) The effect of Linola and W92/72 transgenic flax seeds on the rabbit caecal fermentation – in vitro study. *Pol. J. Vet. Sci.* 14(4): 557-564.
33. Mundhara R., Rashid A. (2002) Stimulation of shoot-bud re-generation on hypocotyl of *Linum* seedlings, on a transient withdrawal of calcium: effect of calcium, cytokinin and thidiazuron. *Plant Sci.* 162: 211-214.
34. Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
35. Naggar, A.; Kadi, D.; Mcrughen, A. In vitro direct regeneration of egyptian and canadian flax (*Linum usitatissimum* L.). *PJB* 2009, 2, 412–415.
36. Prasad K. (2010) Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone. *Int. J. Angiol.* 9: 220-225.
37. Pierik R.L.M. (2017) In vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht. Pretova A., Williams E.G. Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.* 126: 155-161.
38. Pretova A., Williams E.G. (2016) Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.* 126: 155-161.
39. Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M. (2013) Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell. Rep.* 22: 110-116.

40. Rybczyński J.J. (2015) Callus formation and organogenesis of mature cotyledons of *Linum usitatissimum* var. Szokijskij in vitro culture. *Genet. Polon.* 16: 161-166.
41. Salaj J., Petrovská B., Obert B., Pretová A. (2015) Histological study of embryo-like structures initiated from hypocotyl segments of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Rep.* 24: 590-595.
42. Szewczyk M., Abarzua S., Schlichting A., Nebe B., Piechulla B., Briese V. et al. (2014) Effects of extracts from *Linum usitatissimum* on cell viability, proliferation and cytotoxicity in human breast cancer cell lines. *J. Med. Plants Res.* 8: 237-245.
43. Wijayanto T., McHughen A. (2009) Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 35: 456-465.
44. Wróbel M., Zebrowski J., Szopa J. (2014) Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. *J. Biotech.* 107(1): 41-54.
45. Wróbel-Kwiatkowska M., Żuk M., Szopa J., Dymińska L., Mączka M., Hanuza J. (2009) Poly-3-hydroxy butyric acid interaction with the transgenic flax fibers: FT-IR and Raman spectra of the composite extracted from a GM flax. *Spectrochim. Acta Part A* 73: 286-294.
46. Yildiz M., Özgen M. (2014) The effect of a submersion pretreatment on in vitro explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77: 111-115.
47. Yildiz M., Özgen M. (2016) A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Agric. Environ.* 4: 171-174.
48. Zhan X.-C., Jones D.A., Keer A. (2018) Regeneration of flax plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol. Biol.* 11(5): 551-559.
49. Zhan X.-C., Jones D.A., Keer A. (2009a) Regeneration of shoots on root explants of flax. *Ann. Bot.* 63(2): 297-299.

50. Zhan X.-C., Jones D.A., Keer A. (2009b) In vitro plantlet formation in *Linum marginale* from cotyledons, hypocotyls, leaves, roots and protoplasts. Aust. J. Plant Physiol. 16: 315-320

51. Zhan X.C., Jones D.A., Kerr A. (2009) In vitro plantlet formation in *Linum marginale* from cotyledons, hypocotyls, leaves, roots and protoplasts. Aust. J. Plant Physiol. 16: 315-320.