

Veiksniai, lemiantys pluoštinių linų morfogenezę dulkinų kultūroje

Ramunė Masienė,

Aušra Blinstrubienė,

Natalija Burbulis

Aleksandro Stulginskio universitetas,
Studentų g. 11,
LT-53361 Akademija, Kauno r.
El. paštas: ausra.blinstrubiene@asu.lt

Sėjamas linas (*Linum usitatissimum* L.) – lininių šeimos augalas, svarbus ne tik aliejaus, bet ir pluošto gamybai. Linų selekcija ir šiomis dienomis yra ilgas bei sudėtingas procesas, besiremiantis tarpveisline hibridizacija ir geriausių augalų atranka, todėl genetiškai stabilų linijų kūrimas užtrunka ilgą laiką – 10–12 metų. Tik sparčios selekcijos technologijos gali padėti sukurti naujas veisles, vertingas vietinei pramonei, kurios atvertų šiam augalui naują rinką. Tačiau ne visada augalų regeneracija būna efektyvi, todėl labai svarbu atrinkti genotipus, gebančius formuoti organogenines struktūras *in vitro* sistemoje. Genotipas ir augimo reguliatorių derinys indukcijos terpėje – vieni svarbiausių veiksnių, lemiančių kaliaus organogeninę diferenciaciją dulkinų kultūroje, todėl optimalios auginimo sąlygos turi būti parenkamos kiekvienam konkrečiam genotipui. Tirtas maitinamosios terpės sudėties poveikis penkių pluoštinių linų veislių ląstelių dediferenciacijai ir antrinei diferenciacijai izoliuotų dulkinų kultūroje. Nustatyta, kad veislių ‘Sartai’ ir ‘Vaižgantas’ izoliuotos dulkinės intensyviausiai pridėtinius pumpurus regeneracijos terpėje formavo auginant jas indukcijos terpėje su didesniu auksinų nei citokininų kiekiu. Tačiau veislės ‘Snaigiai’ antrinė diferenciacija intensyviau vyko indukavus kalių maitinamojoje terpėje su didesniu citokininų nei auksinų kiekiu. Padidintas sacharozės kiekis indukcijos terpėje skatina organogeninių genotipų pridėtinių pumpurų susiformavimo dažnį.

Raktažodžiai: augimo reguliatoriai, dulkinų kultūra, genotipas, *Linum usitatissimum* L.

ĮVADAS

Linum gentis priskiriama seniausiai auginamiems augalams, o sėjamas linas (*Linum usitatissimum* L.) – vienas pirmųjų žinomų augalų žmonijos istorijoje (Spence et al., 2003; Jankauskienė, Bačelis, 2009). Linai naudojami ne tik maisto pramonėje, bet ir gyvulių pašarui, taip pat šis augalas jau tūkstančius metų naudojamas medicinoje dėl unikalių sėmenų aliejaus sudedamųjų dalių – nepakeičiamų α -linoleno (Ω -3) ir linolo (Ω -6) rūgščių (Abadi et al., 2004; Karg, 2011).

Pluoštinių linų selekcija klasikiais selekcijos metodais Lietuvoje vykdoma nuo 1922 m. (Jankauskienė, Bačelis, 2009). Mokslininkai siūlo

sutrumpinti selekcinio darbo procesą naudojant izoliuotų dulkinų kultūros metodą, kurio sėkmė priklauso nuo daugelio veiksnių, pvz., motininio augalo genotipo (Chen, Dribnenki, 2002; Obert et al., 2004; Burbulis, Blinstrubienė, 2011), žiedadulkių išsivystymo stadijos ir donorinio augalo auginimo sąlygų (Pretova, Obert, 2000; Chen, Dribnenki, 2002), maitinamosios terpės sudėties (Rutkowska-Krause et al., 2003; Obert et al., 2004; Burbulis, Blinstrubienė, 2011). Dulkinų kultūroje dažniausiai vyksta netiesioginė androgenėzė – iš pradžių susidaro nediferencijuotas kalis, iš jo vėliau regeneruojami augalai (Nichterlein et al., 1991; Chen et al., 1998a). Pagrindinė problema linų dulkinų kultūroje – santykinai nedidelis

kaliaus bei pridėtinių pumpurų formavimosi dažnis (Nichterlein et al., 1991; Chen et al., 1998b). Siekiant pagerinti augalų regeneratų išėigą svarbiausi yra du aspektai: 1) atrinkti genotipus, gebančius formuoti struktūras; 2) sudaryti tinkamiausias auginimo sąlygas atrinktų genotipų regeneracijai.

Darbo tikslas – nustatyti augimo reguliatorių derinių ir sacharozės koncentracijos indukcijos terpėje poveikį pluoštinių linų veislių kaliaus indukcijai bei ūglių regeneracijai izoliuotų dulkinų kultūroje.

METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimai atlikti Aleksandro Stulginskio universiteto Agrobiotechnologijos laboratorijoje. Tirtos penkios pluoštinių linų veislės: 'Belinka', 'Dangiai', 'Sartai', 'Snaigiai', 'Vaižgantas'. Sėklos daigintos auginimo kameroje kontroliuojamomis sąlygomis: 16 val. fotoperiodas, 18/14 °C temperatūra (dieną / naktį), 75 % drėgnumas. Augalai auginami durpių, kompostinės žemės ir smėlio mišinyje, santykiu 3 : 1 : 2, 16,5 cm skersmens induose. Augimo metu augalai tręšti (N : P : K) santykiu 20 : 20 : 20.

Donorinių augalų žiedpumpuriai išoriškai sterilinti 70 % etanolio vandeniniame tirpale 1 min. ir 2 % natrio hypochlorite – 10 min., po to 3 kartus perplauti steriliu distiliuotu vandeniu. Sterilūs eksplantai auginami plastikinėse Petri lėkštelėse, talpinančiose 15 ml NLN indukcijos terpės (Lichter, 1985) su skirtingais citokininių ir auksinų deriniais (2 mg l⁻¹ 6-benzilaminopurino (BAP) + 1 mg l⁻¹ 1-naftilacto rūgšties (NAR), 1 mg l⁻¹ 6-benzilaminopurino (BAP) + 2 mg l⁻¹ 3-indolilacto rūgšties (IAR), 1 mg l⁻¹ 6-benzilaminopurino (BAP) + 0,5 mg l⁻¹ 3-indolilacto rūgšties (IAR) + 0,5 mg l⁻¹ 1-naftilacto rūgšties (NAR)), 6 % arba 9 % sacharozės bei 0,6 % agar koncentracijomis. Izolijuotos dulkinės augintos 25 °C temperatūroje tamsoje 28 dienas, po to kas keturias savaites kultūra perkelta į šviežią maitinamąją terpę ir auginama kontroliuojamomis sąlygomis: 16 val. fotoperiodas, 22 ± 2 °C temperatūra (dieną / naktį), šviesos intensyvumas – 50 μmol m⁻² s⁻¹.

Ūglių regeneracijai kalius perkeltas į MS (Murashige, Skoog, 1962) maitinamąją terpę, papildytą 1 mg l⁻¹ BAP, 375 mg l⁻¹ glutaminiu, 3 % sacharozės ir 0,6 % agar koncentracijomis.

Visuose eksperimentuose naudota pilna renDOMIZACIJA. Auginta po 120 kiekvieno varianto

dulkinų (10 dulkinų / Petri lėkštelėje; 12 pakartojimų / variante) ir kiekvienas eksperimentas atliktas tris kartus. Po keturių savaičių nustatytas kaliaus susidarymo dažnis (%) ((kalių formavusių eksplantų skaičius / eksplantų skaičius lėkštelėje) × 100 %). Ūglių susidarymo dažnis (%) nustatomas po kiekvieno kultūros perkėlimo ant šviežios maitinamosios terpės. Duomenys statistškai apdoroti kompiuterinėmis programomis STAT 1,55 ir ANOVA iš programų paketo SELEKCIJA (Tarakanovas, Raudonius, 2003).

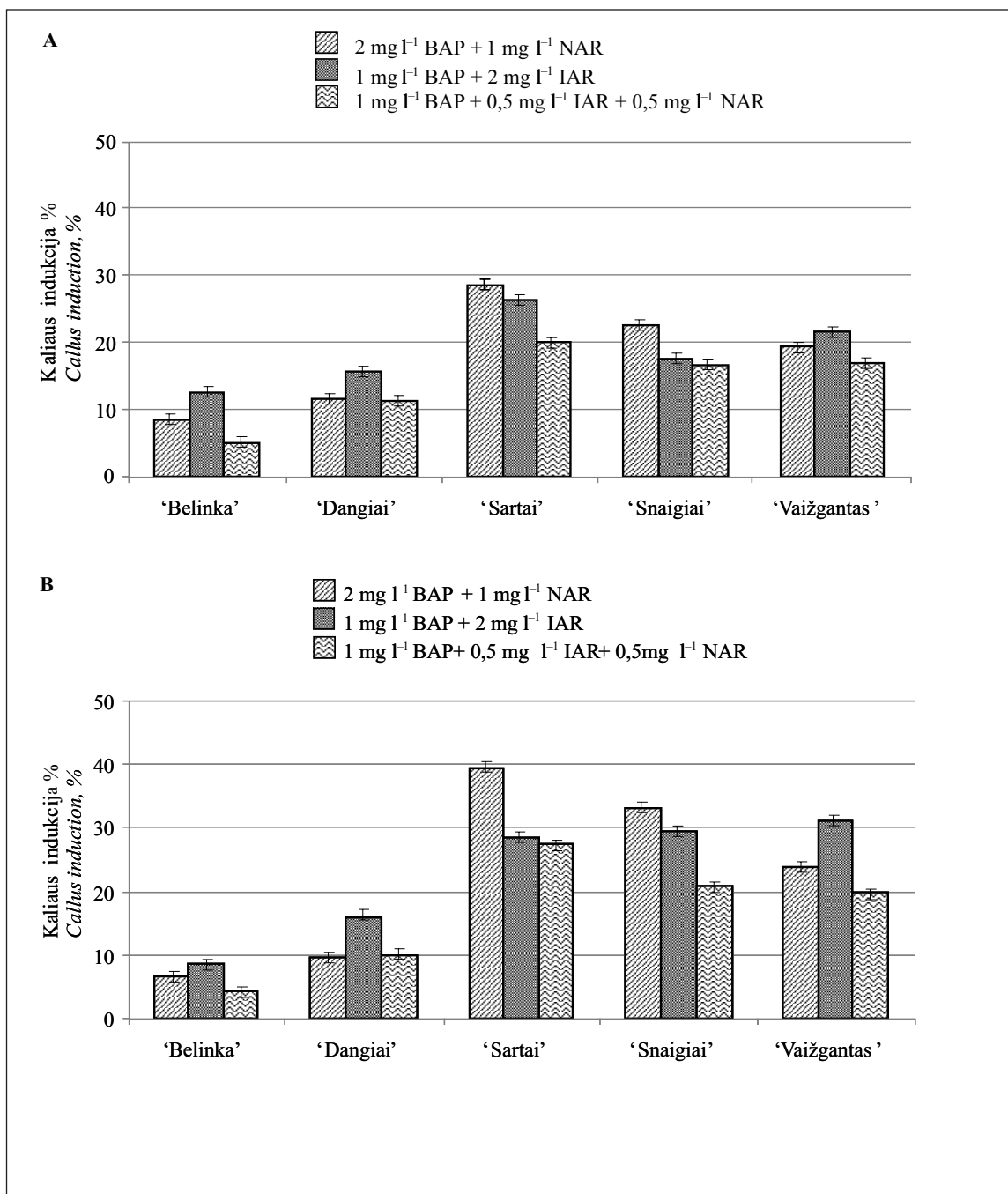
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Linų androgenezės procesas glaudžiai susijęs su kaliaus tarpsniu, nes izoliuotų dulkinų kultūroje linai dažniausiai regeneruoja netiesiogiai – iš nediferencijuotų kaliaus ląstelių (Nichterlein et al., 1991; Chen et al., 1998a). Norint užtikrinti morfogeninio kaliaus formavimąsi būtina sudaryti optimalias sąlygas izoliuotų dulkinų auginimui *in vitro*.

Rezultatai, gauti tiriant augimo reguliatorių derinių ir sacharozės koncentracijos poveikį linų kaliaus indukcijai izoliuotų dulkinų kultūroje, pateikti 1 pav. Genotipų 'Sartai' ir 'Snaigiai' dulkinės intensyviausiai kalių formavo maitinamojoje terpėje, papildytoje 2 mg l⁻¹ BAP ir 1 mg l⁻¹ NAR, o 1 mg l⁻¹ BAP ir 2 mg l⁻¹ IAR derinys skatino veislių 'Belinka', 'Dangiai' ir 'Vaižgantas' izoliuotų dulkinų kaliaus genezę.

Padidintas sacharozės kiekis indukcijos terpėje skatino veislių 'Sartai', 'Snaigiai' ir 'Vaižgantas' kaliaus genezę, tačiau inhibavo veislių 'Belinka' ir 'Dangiai' kaliaus susiformavimo dažnį.

Ūglių regeneracija – linų androgenezės proceso kritinis periodas. Iš tirtų penkių pluoštinių linų genotipų, pridėtinius pumpurus formavo tik trijų genotipų kalius. Priklausomai nuo indukcijos terpės sudėties, pumpurų formavimosi dažnis regeneracijos terpėje varijavo nuo 4,5 % ('Snaigiai') iki 24 % ('Sartai') (2 pav.). Intensyviausiai pridėtinius pumpurus formavo veislių 'Sartai' ir 'Vaižgantas' izoliuotų dulkinų kalius, indukuotas terpėje su 1 mg l⁻¹ BAP ir 2 mg l⁻¹ IAR. Augimo reguliatorių derinys 2 mg l⁻¹ BAP ir 1 mg l⁻¹ NAR indukcijos terpėje skatino veislės 'Snaigiai' pumpurų susiformavimą regeneracijos terpėje. Padidintas (9 %) sacharozės kiekis indukcijos terpėje skatino visų trijų veislių antrinę diferenciaciją.



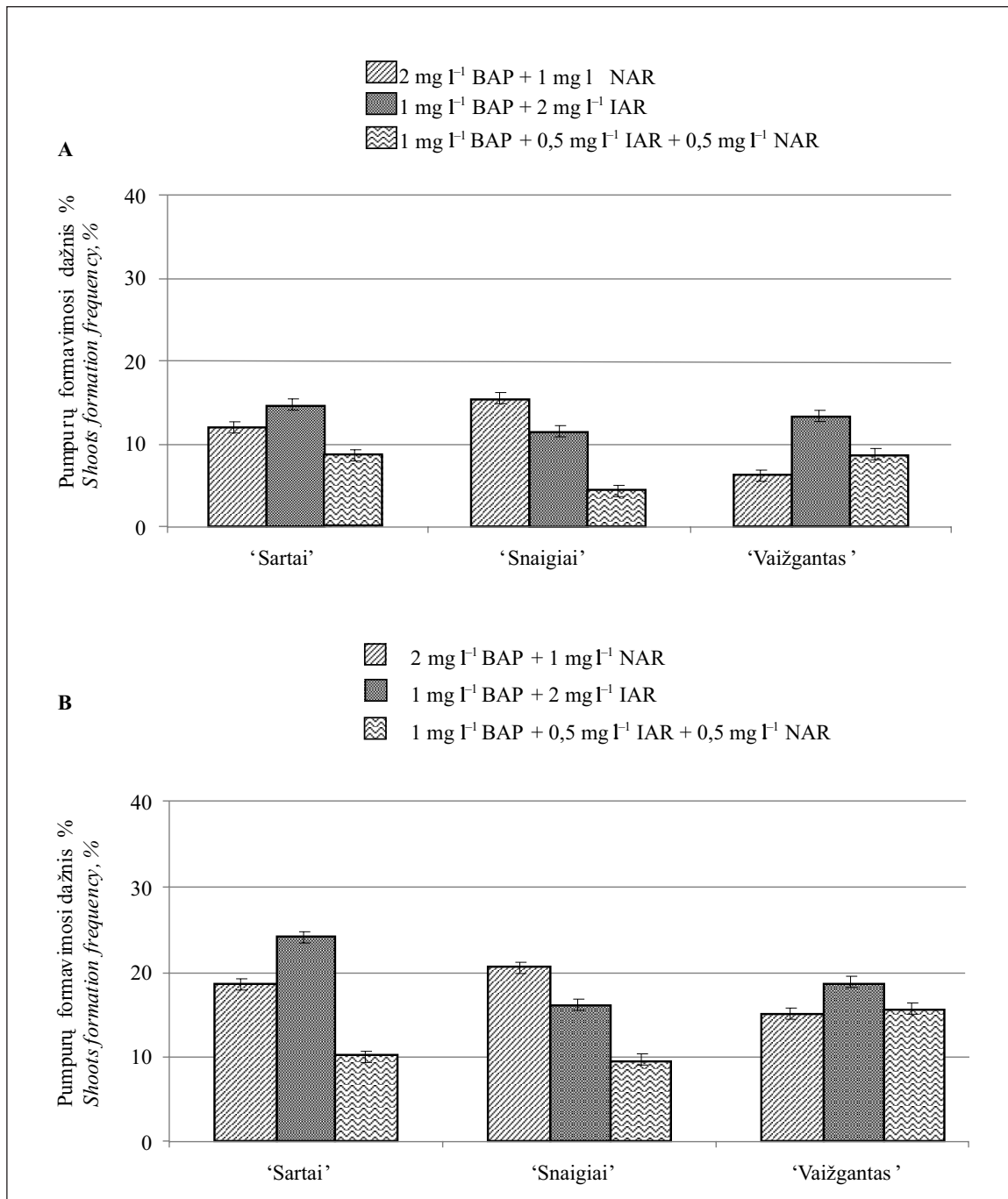
1 pav. Augimo reguliatorių ir sacharozės koncentracijos įtaka pluoštinių linų kaliaus indukcijai dulkinų kultūroje: A – 6 % sacharozės; B – 9 % sacharozės

Fig. 1. Effect of growth regulators and sucrose concentration on callus induction in anther culture of fibre flax: A – 6% sucrose; B – 9% sucrose

Geba formuoti kalių gali skirtis ne tik tarp atskirų augalo rūšių, bet ir tos pačios rūšies viduje (Chen, Dribnenki, 2002; Burbulis, Blinstrubienė, 2011). Daugelis mokslininkų nustatė, kad kaliaus indukcijai tiek generatyvinių ląstelių (Rutkowska-Krause et al., 2003; Obert et al., 2004; Burbulis et al., 2005), tiek somatinių audinių (Rutkowska-Krause et al., 2003;

Salaj et al., 2005; Yildiz, Ozgen, 2006; Burbulis et al., 2012) kultūrose svarbią reikšmę turi donorinio augalo genotipas. Mūsų tyrimais nustatyta, kad iš tirtų pluoštinių linų veislių didžiausia morfogenine galia pasižymėjo veislės 'Sartai' izoliuotos dulkinės.

Kitas svarbus veiksnys, lemiantis kaliaus indukciją ir augalų regeneraciją – maitinamosios



2 pav. Augimo reguliatorių ir sacharozės koncentracijos indukcijos terpėje įtaka pluoštinių linų pumpurų formavimuisi regeneracijos terpėje: A – 6 % sacharozės; B – 9 % sacharozės

Fig. 2. Effect of growth regulators and sucrose concentration in the induction medium on buds formation in the regeneration medium of fibre flax: A – 6% sucrose; B – 9% sucrose

terpės sudėtis. Y. Chen su bendraautoriais (1998b) nustatė, kad linų kaliaus genėzė intensyviausiai vyko terpėje, papildytoje augimo reguliatorių deriniu 1 mg l⁻¹ BAP ir 2 mg l⁻¹ 2,4D, o E. Tejklovos (1996) tyrimuose linų dulkinų dediferenciaciją labiau skatino 2 mg l⁻¹ BAP ir 1 mg l⁻¹ NAR. Mūsų tyrimais nustatyta, kad derinys 2 mg l⁻¹ BAP ir

1 mg l⁻¹ NAR skatina tik veislės 'Snaigiai' androgenėzės procesą, o veislių 'Sartai' ir 'Vaižgantas' didžiausias pridėtinių pumpurų formavimosi dažnis, gautas veikiant derinio 1 mg l⁻¹ BAP ir 2 mg l⁻¹ IAR. Tai patvirtina kitų mokslininkų teiginių, kad optimalus augimo reguliatorių derinys maitinamojoje terpėje turi būti parenkamas kiekvienam

genotipui individualiai (Nichterlein et al., 1991; Chen, Dribnenki, 2002; Rutkowska-Krause et al., 2003; Lasaga et al., 2004; Obert et al., 2004).

Kaip angliavandenių šaltinis izoliuotų audinių kultūrose dažniausiai naudojama sacharozė, kurios optimali koncentracija androgenezės indukcijai varijuoja, priklausomai nuo augalo rūšies ir genotipo (Hazarika et al., 2000; Chen, Dribnenki, 2004; Jo et al., 2009; Millam et al., 2005). Anksčiau mūsų tyrimais nustatyta, kad padidintas sacharozės kiekis indukcijos terpėje skatina androgenezės procesą sėmeninių linų izoliuotų dulkių kultūroje (Burbulis et al., 2005). Įvertinus šiame straipsnyje pateiktus rezultatus, nustatyta, kad didesnė sacharozės koncentracija indukcijos terpėje padidina pluoštinių linų regenerantų išėgą izoliuotų dulkių kultūroje.

IŠVADOS

1. Pluoštinių linų gebėjimas formuoti struktūras izoliuotų dulkių kultūroje didžiaja dalimi lemiamas genotipo reakcijos į egzogeninius augimo reguliatorius, todėl optimalus auginimo reguliatorių derinys turi būti parenkamas konkrečiam genotipui.

2. Veislės 'Snaigiai' izoliuotų dulkių auginimui indukcijos terpė turi būti papildyta deriniu 2 mg l^{-1} 6-benzilamino purino ir 1 mg l^{-1} 1-naftilacto rūgšties, o veislių 'Sartai' ir 'Vaižgantas' androgenezės indukcijai labiau tinka augimo reguliatorių derinys 1 mg l^{-1} 6-benzilamino purino ir 2 mg l^{-1} 3-indolilacto rūgšties.

3. 9 % sacharozės koncentracija indukcijos terpėje padidina tirtų veislių produktyvių dulkių išėgą.

Gauta 1213 02 19

Priimta 1213 04 24

LITERATŪRA

1. Abbadi A., Domergue F., Bauer J., et al. 2004. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseed: constraints on their accumulation. *Plant Cell*. Vol. 16. P. 2734–2748.
2. Burbulis N., Blinstrubienė A. 2011. Genotypic and exogenous factors affecting linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. Vol. 9. No. 3–4. P. 364–367.
3. Burbulis N., Blinstrubienė A., Masienė R., et al. 2012. Genotypic and growth regulator effects on organogenesis from hypocotyl explants of fiber flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment*. Vol. 10. No. 1. P. 397–400.
4. Burbulis N., Blinstrubienė A., Sliesaravičius A., et al. 2005. Influence of genotype, growth regulators, sucrose level and preconditioning of donor plants on flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. Vol. 56. P. 323–331.
5. Chen Y., Dribnenki P. 2004. Effect of medium osmotic potential on callus induction and shoot regeneration in flax anther culture. *Plant Cell Reports*. Vol. 23. P. 272–276.
6. Chen Y., Dribnenki P. 2002. Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. *Plant Cell Reports*. Vol. 21. P. 204–207.
7. Chen Y., Kenaschuk E., Procunier J. D. 1998a. Plant regeneration from anther culture in Canadian cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica*. Vol. 102. P. 183–189.
8. Chen Y., Kenaschuk E., Dribnenki P. 1998b. High frequency of plant regeneration from anther culture in flax, *Linum usitatissimum* L. *Plant Breeding*. Vol. 117. P. 463–467.
9. Hazarika B. N., Parthasarathy V. A., Nagaraju V., et al. 2000. Sucrose induced biochemical changes in *in vitro* microshoots of *Citrus* species. *Indian Journal of Horticulture*. Vol. 57. P. 27–31.
10. Yildiz M., Ozgen M. 2006. A comparison of growth regulators for adventitious shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment*. Vol. 4. No. 3–4. P. 171–174.
11. Jankauskienė Z., Bačelis K. 2009. Naujų pluoštinių linų veislių 'Dangiai', 'Snaigiai' ir 'Sartai' sukūrimas bei tyrimai. *Žemės ūkio mokslai*. Nr. 1–2. P. 31–40.
12. Jo E. A., Tewari R. K., Hahn E. J., et al. 2009. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 96. P. 307–315.
13. Karg S. 2011. New research on the cultural history of the useful plant *Linum usitatissimum* L. (flax), a resource for food and textiles for 8,000 years. *Vegetation History and Archaeobotany*. Vol. 20. P. 507–508.
14. Lasaga S. L., Camadro E. L., Bonell M. L., et al. 2004. Diallel analysis of callus formation ability in linseed anther culture. *Plant Breeding*. Vol. 123. P. 502–504.
15. Lichter R. 1985. From microspores to rape plants: a tentative way to low glucosinolate strains. *World Crops: Production, Utilization, Description*. Vol. 11. P. 268–277.

16. Millam S., Obert B., Pretova A. 2005. Plant cell and biotechnology studies in *Linum usitatissimum* – a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 82. P. 93–103.
17. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15. P. 473–497.
18. Nichterlein K., Umbach H., Friedt, W. 1991. Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica*. Vol. 58. P. 157–164.
19. Obert B., Dedicova B., Hricova A., et al. 2004. Flax anther culture: effect of genotype, cold treatment and media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 79. P. 233–238.
20. Pretova A., Obert B. 2000. Progress in flax androgenesis. In: Bohanec B. (ed.). *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells. Proceedings of the COST 824 Final Meeting*. Bled, Slovenia. P. 165–169.
21. Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., et al. 2003. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell Reports*. Vol. 22. P. 110–116.
22. Salaj J., Petrovska B., Obert B., et al. 2005. Histological study of embryo-like structures initiated from hypocotyl segments of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Reports*. Vol. 24. P. 590–595.
23. Spence J. D., Thornton T., Muir A. D., et al. 2003. The effect of flax seed cultivars with differing content of α -linolenic acid and lignans on responses to mental stress. *Journal of the American College of Nutrition*. Vol. 22. P. 494–501.
24. Tarakanovas P., Raudonius S. 2003. *Agrominių tyrimų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, STAT-PLOT iš paketo „Selekcija“ ir „Irristat“*. Akademija, Kėdainių r. 57 p.
25. Tejklova E. 1996. Some factors affecting anther culture in *Linum usitatissimum* L. *Rostlynná Vyroba*. Vol. 42. P. 249–260.

**Ramunė Masienė, Aušra Blinstrubienė,
Natalija Burbulis**

FACTORS AFFECTING FIBRE FLAX MORPHOGENESIS IN ANTHER CULTURE

S u m m a r y

Flax (*Linum usitatissimum* L.), a member of the family *Linaceae*, is an important crop for the production of both oil and fibre. In breeding of fibre flax the conventional process of breeding sufficiently homozygous lines takes a substantial time (i. e. at least 10–12 years). Generally, the breeder uses either pedigree selection or bulk breeding methods to create novel lines. Rapid breeding techniques could accelerate the production of new fibre flax cultivars with characters that are adapted to the current demands of industry, opening new markets for this crop. However, the overall efficiency of plant regeneration is not efficient, therefore identification of responsive genotypes and improvement of protocols are the prerequisite to applied breeding programs. Genotype and growth regulators in the induction medium are very important factors preconditioning callus organogenic differentiation in anther culture, so the specific combination of growth regulators and sucrose concentration for callus induction must be designed for each genotype. The effects of induction medium compositions on five cultivars of fibre flax anther culture were investigated in order to improve the efficiency of cell dedifferentiation and secondary differentiation. Cultivar ‘Sartai’ and ‘Vaižgantas’ showed the highest shoot regeneration frequency when callus had induced in the medium supplemented with higher amount of auxins than cytokinins while combination of higher amount of cytokinins than auxins promoted shoot formation in the anther-derived callus of ‘Snaigiai’. The media supplemented with an increased level of sucrose resulted in the highest overall shoot formation frequency for all responsive genotypes.

Key words: anther culture, genotype, growth regulators, *Linum usitatissimum* L.