

**КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН І ТКАНИН ЛЬОНУ
ЗВИЧАЙНОГО (*LINUM USITATISSIMUM*L.)
В УМОВАХ *IN VITRO***

Міщенко С. В.

ВСТУП

Практичне значення видів роду *Linum* L. (Linaceae) зумовлене наявністю в його представників корисних властивостей, завдяки чому їх використовують як текстильні, олійні, медоносні, лікарські, кормові, ефіроолійні та декоративні рослини. Різні види цього роду за певних умов можуть бути залучені до міжвидових схрещувань із подальшим використанням таких гібридів у селекції. У аграрному виробництві поширені різні сорти льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.), які здебільшого вирощують з метою отримання натурального волокна для текстильної промисловості, насіння, харчової або технічної олії. Незважаючи на те, що льон відомий декілька тисячоліть, він і сьогодні залишається предметом численних наукових досліджень, присвячених філогенезу і таксономії^{1,2}, селекції^{3,4}

¹ Оптасюк О. М., Шевера М. В. Рід *Linum* L. у флорі України. Київ : Альтерпрес, 2011. 276 с.

² Зеленцов С. В., Зеленцов В. С., Мошненко Е. В., Рябенко Л. Г. Современные представления о филогенезе и таксономии рода *Linum* L. и льна обыкновенного (*Linum usitatissimum* L.). *Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИ масличных культур*. 2016. Вып. 1. С. 106–121.

³ Логінов М. І. Етапи розвитку та підсумки селекції льону-довгунця в Україні. *Збірник наукових праць Інституту луб'яних культур УААН*. 2007. Вип. 4. С. 64–69.

⁴ Кривошесва Л. М. Вихідний матеріал льону-довгунця в селекції на якість волокна. *Луб'яні та технічні культури*. 2017. Вип. 5. С. 114–119.

і захисту від хвороб^{5,6}, технології вирощування^{7,8} і, звичайно ж, біотехнології.

Культуру ізольованих клітин і тканин доцільно використовувати у практичній селекції. з цією метою обґрунтовуються стратегії застосування явища регенерації рослинних клітин і тканин льону, методів соматичного ембріогенезу, культури ізольованих протопластів, клітинних суспензій тощо, важливою галуззю досліджень є використання у селекційних програмах культури пиляків та подвосних гаплоїдів, розглядаються нові технології перенесення і експресії генів за допомогою генетичної трансформації, підкреслюючи перспективність даної сільськогосподарської культури^{9,10}.

Культивування *in vitro* індукує епігенетичну мінливість, викликану модифікуючим впливом штучних умов, і генетичну мінливість, яка закріплюється в потомстві. Утворені *in vitro* рослини-регенеранти, порівняно з вихідним матеріалом, характеризуються соматональною мінливістю, яка в разі позитивних змін може бути використана для створення нових сортів. Небажані мутантні форми можна вибракувати вже на стадії регенерації в культурі *in vitro*. Рівень мінливості клітин залежить при цьому від низки факторів: вихідного матеріалу, типу експланта, тривалості й умов культивування, впливу компонентів поживних середовищ. Найбільше зазнають змін наступні ознаки льону звичайного: кількість волокон у пучку, кількість здерев'янілих волокон, частка здерев'яніння;

⁵ Чучвага В. І, Кривошеєва Л. М. Імунологічний моніторинг різних груп стиглості сортів льону-довгунця в умовах північно-східного Полісся України. *Луб'яні та технічні культури*. 2019. Вип. 7. С. 42–45. DOI: 10.48096/btc.2019.7(12).42–45

⁶ Чучвага В. І, Кривошеєва Л. М. Методологічні аспекти вивчення стійкості сортів льону-довгунця до фузаріозу. *Луб'яні та технічні культури*. 2019. Вип. 7. С. 54–57. DOI: 10.48096/btc.2019.7(12).54–57

⁷ Шувар А. М. Залежність продуктивності льону-довгунця від застосування мікробних препаратів за умов органічного виробництва. *Луб'яні та технічні культури*. 2015. Вип. 4. С. 85–91.

⁸ Вишнівська Ю. С., Дрозд О. М., Лісовий О. Б. Вплив елементів технології вирощування на щільність посіву, урожайність насіння і волокна льону-довгунця. *Луб'яні та технічні культури*. 2017. Вип. 5. С. 157–162.

⁹ Поляков А. В. Биотехнология в селекции льна. Тверь, 2000. 180 с.

¹⁰ Evtimova M., Vlahova M., Atanassov A. Flax improvement by biotechnology means. *Journal of Natural Fibers*. 2005. Vol. 2, Iss. 2. P. 17–34. DOI: 10.1300/J395v02n02_02

відносно стабільними залишаються такі ознаки, як висота рослин, діаметр стебла і кількість пучків луб'яних волокон¹¹.

Загалом, технології *in vitro* щодо льону звичайного досить добре розроблені, зокрема методи регенерації рослинних клітин і тканин, соматичного ембріогенезу, культури пиляків та подвоєних гаплоїдів, ізольованих протопластів, клітинних суспензій тощо, однак у проаналізованих джерелах у ролі об'єкта досліджень здебільшого використано зразки, що належать до так званого олійного льону, а не *L. usitatissimum* L. convar. *elongatum* (льону-довгунця), який значно відрізняється від першого різновиду за морфологічними, фізіологічними і генетичними ознаками та властивостями. Для індукції калусогенезу і формування пагонів дослідниками, як правило, застосовано певні співвідношення ауксинів і цитокінінів, тому виникає проблемне питання, чи здатен льон-довгунець до утворення калусних тканин і в подальшому до регенерації пагонів на середовищах лише з ауксинами або лише з цитокінінами екзогенного походження, яке оптимальне співвідношення цих регуляторів росту, чи має вплив генотипу зразка (сорту) на інтенсивність калусоутворення та органогенезу, що й визначило вибір теми нашого дослідження та його актуальність. Нами було проведено низку досліджень^{12,13,14,15,16} у цьому напрямі, які узагальнені у даному розділі монографії.

¹¹ Кубрак С. В., Шаптуренко М. Н. Изменчивость льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) в культуре *in vitro* как источник получения новых селекционных форм. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя Біялагічных навук*. 2013. № 2. С. 36–40.

¹² Міщенко С. В., Кривошеєва Л. М. Калусогенез і органогенез в умовах *in vitro* різних зразків *Linum usitatissimum* L. *Генетичні ресурси рослин*. 2018. № 23. С. 49–58. DOI: 10.36814/pgr.2018.23.04

¹³ Міщенко С. В. Вплив 6-бензиламінопурину на інтенсивність калусогенезу і органогенезу *Linum usitatissimum* L. в умовах *in vitro*. Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. 2019. Вип. 2 (47). С. 92–100. DOI: 10.35550/vbio2019.02.092

¹⁴ Mishchenko S. V., Kryvosheieva L. M. Callus formation, organogenesis and microclonal reproduction in different species of the genus *Linum* L. *in vitro*. *Plant Varieties Studying and Protection*. 2019. Vol. 15, No 2. P. 124–134. DOI: 10.21498/2518-1017.15.2.2019.173558

¹⁵ Mishchenko S., Kryvosheieva L. Possibility of reproduction of *Linum usitatissimum* L. from seeds with low germination and viability *in vitro* conditions. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*. 2019. No 3. P. 304–311. DOI: 10.15414/agrobiodiversity.2019.2585-8246.304-311

¹⁶ Міщенко С. В. Вплив 1-нафтилоцтової та індол-3-оцтової кислоти на інтенсивність калусогенезу і органогенезу *Linum usitatissimum* L. в умовах *in vitro*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2021. Т. 28. С. 100–105. DOI: 10.7124/FEEO.v28.1383

1. Біологічні особливості льону звичайного

Льон звичайний (довгунець) – однорічна рослина родини Льонові (*Linaceae*), при цьому внутрішньовидова класифікація (таксономія) досить суперечлива. Ботанічна характеристика та біологічні особливості даного виду добре описані в науковій літературі^{17,18,19,20,21,22}, нижче подамо їх узагальнення.

Рослини мають тонке гладеньке стебло, яке у загущених посівах досягає близько 1,25 м. Суцвіття – китиця з 5–7 коробочками. В умовах розрідженого посіву рослини схильні до галуження, на них може утворюватися 10 і більше коробочок. Квітка правильної форми, діаметром 15–21 мм, чашечка має п'ять чашолистиків, а віночок – п'ять пелюсток. Маточка складається з п'ятигніздої зав'язі та п'ятьох стовпчиків з приймочками, тичинок з пиляками також п'ять. Пелюстки блакитного, рідше білого чи рожевого кольору. Плід – кулеподібна коробочка, розділена навпіл на дві частини по п'ять гнізд у кожній. Листки завдовжки 36–40 мм і завширшки 2–4,4 мм, ланцетні, сидячі, на стеблі розміщені почергово (по спіралі). За нормального процесу запилення в одній коробочці утворюється 10 насінин. Насіння пласке, яйцеподібної форми з вузьким, трохи загнутим «носиком», з блискучою поверхнею, світло- або темно-коричневого забарвлення. Коренева система стрижнева, розвинена порівняно слабо, її маса не перевищує 8–10 % маси всієї рослини.

Стебло ззовні покрите щільною покривною тканиною (кутикулою) з восковим нальотом, яка захищає його від механічних пошкоджень та надмірного випаровування вологи. Під покривною тканиною розміщується шар корової паренхіми, у якій знаходяться

¹⁷ Лен-долгунец / Дюев И. Ф. и др.; под. общ. ред. М. М. Труша. Москва : Колос, 1976. 352 с.

¹⁸ Технічні культури (льон-довгунець, коноплі, кенаф, джут, канатник, тютюн, махорка, хміль) / за ред. М. Г. Городнього. 2-ге вид. Київ : Урожай, 1969. 351 с.

¹⁹ Лихочвор В. В. Рослинництво. Технології вирощування сільськогосподарських культур: навчальний посібник. 2-ге вид. Київ : Центр навчальної літератури, 2004. 808 с.

²⁰ Нечитайло В. А., Кучерява Л. Ф. Ботаніка. Вищі рослини : підручник. 2-ге вид. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. 432 с.

²¹ Рослинництво з основами технології переробки. Практикум: навчальний посібник / Мельник А. В. та ін.; за ред. А. В. Мельника, В. І. Троценка. Суми : Університетська книга, 2008. 384 с.

²² Технічні культури : навчальний посібник / Жатов О. Г. та ін.; за ред. О. Г. Жатова, С. М. Каленської. Суми : Університетська книга, 2013. 359 с.

волокнисті пучки та ситоподібні трубки провідної системи. Під корою розміщується тонкий шар твірної тканини – камбію. У стеблах льону функціонують дві твірні тканини – перицикл і камбій. Між їхньою діяльністю існує зворотна кореляційна залежність. Під камбієм всередині стебла розміщена деревина, яка складається з товстостінних клітин, забезпечуючи механічну функцію стебла. Усередині шару деревини знаходиться серцевина, яка становить центральну частину стебла. Серцевина представлена тонкостінними ламками клітинами, які руйнуються в онтогенезі, у результаті чого всередині стебла виникає порожнина.

Волокно льону звичайного складається із дуже видовжених, веретеноподібних, із загостреними кінцями клітин, які називають елементарними волокнами. Вони завдовжки близько 20–30 мм, а в окремих випадках довжина може досягати 100 мм і більше, товщина – 20–30 мкм. Форма поперечного зрізу від овальної до багатокутної. Клітинна стінка елементарного волокна складається з кількох концентрично розміщених шарів. У центральній частині елементарного волокна розміщений канал. Чим він менший і чим товщі стінки, тим міцніше волокно. Елементарні волокна льону об'єднуються в пасма (пучки), щільно склеюються між собою за допомогою пектину. Кількість елементарних волокон в пасмі коливається в межах від 30 до 50. Пасма розміщуються по всій довжині стебла. Найбільша кількість елементарних волокон у пучку (пасмі) і пучків у стеблі міститься у нижній третині стебла, найменша – у верхівці. Якісне волокно утворюється в стеблах не менше 70 см завдовжки і 1,0–1,5 мм завтовшки.

Протягом вегетаційного періоду льон звичайний росте нерівномірно: повільно у фазу «ялинки» (5–6 справжніх листків) і інтенсивно у фазу бутонізації (3–5 см за добу). Ріст стебла у висоту під час цвітіння фактично припиняється. Фаза досягання характеризується швидким здерев'янінням тканин стебла і стиглістю насіння.

Це самозапильна рослина, разом з тим в окремих випадках (0,15–0,63 %) можливе перехресне запилення, тому що в деякій частині квіток пиляки внаслідок відставання у рості не досягають висоти приймочок. Перехресному запиленню комахами сприяє також відкрита будова і яскраве забарвлення квіток. Запліднення відбувається після запилення, пилок, який потрапив на приймочку маточки, приблизно через 20–30 хв проростає, а пилкова трубка, яка при цьому утворюється, через 2–3 год досягає зародкового мішка.

Розрізняють кілька фаз стиглості: зелену, ранню жовту, жовту і повну стиглість. Зелена стиглість настає наприкінці цвітіння, насіння в цей час в коробочках має зелене забарвлення, уся рослина теж зеленого кольору. Під час ранньої жовтої стиглості окремі листки (переважно в нижній частині стебла) жовтіють і осипаються, насіння й коробочки мають світло-жовте забарвлення. У період жовтої стиглості основна маса коробочок має жовтий колір, листки осипаються повністю, а насіння набуває характерного для сорту забарвлення – від світло-коричневого до темно-коричневого, іноді інтенсивного жовтого.

Льон звичайний (довгунець) мало вимогливий до тепла та світла, добре росте в умовах вологого клімату, вимогливий до ґрунтів через недостатньо розвинену кореневу систему, добре росте на структурних ґрунтах з достатньою кількістю поживних речовин.

Створення нових сортів льону звичайного потребує інтенсифікації селекційного процесу, важливу роль в якому можуть відігравати біотехнологічні методи і прийоми.

2. Індукція калусогенезу й органогенезу льону звичайного в умовах *in vitro*

Для індукування соматичного калусо- й органогенезу у льону звичайного в умовах *in vitro* відомий успішний досвід використання 1-нафтилоцтової кислоти (НОК) і 6-бензиламінопурину (БАП)^{23,24}, 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти (2,4-Д) і БАП²⁵, тидіазурону (ТДЗ)²⁶ тощо. У культурі клітинної суспензії оптимальним було додавання фітогормонів НОК (0,1 мг/л) і БАП (0,5 мг/л), водночас висока концентрація БАП у рідкому середовищі обмежувала

²³ Шиша Е. Н., Емец А. И., Гузенко Е. В. и др. Изучение регенерационной способности и корнеобразования у сортов льна-долгунца украинской и белорусской селекции. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2011. Т. 43, № 1. С. 57–64.

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. *BioTechnologia*. 2012. Vol. 93, Iss. 2. P. 135–138. DOI: 10.5114/bta.2012.46578

²⁵ Siegień I., Adamczuk A., Wróblewska K. Light affects *in vitro* organogenesis of *Linum usitatissimum* L. and its cyanogenic potential. *Acta Physiol. Plant*. 2013. Vol. 35, Iss. 3. P. 781–789. DOI: 10.1007/s11738-012-1118-4

²⁶ Mundhara R., Rashid A. TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedlings of *Linum*, putative role of ethylene in regeneration. *Plant Sci*. 2006. Vol. 170, Iss. 2. P. 185–190. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.06.015

проліферацію клітин і зменшувала утворення біомаси²⁷. Також встановлено, що низькомолекулярні п'яти- й шестичленні нітrogenовмісні гетероциклічні сполуки (похідні піридину, піримідину, піразолу та ізофлавонів) виявляють високий стимулювальний вплив на прямий органогенез льону, тобто ці сполуки є перспективними в ролі ефективних заміників традиційних (поширених) ауксину НОК і цитокініну БАП²⁸.

Ефективність каллусоутворення й органогенезу залежить не лише від визначення оптимальних концентрацій і комбінацій ауксинів та цитокінінів у середовищі, а й прийомів попередньої підготовки експлантів і конкуренції між ними. Ефективність була вищою в тому разі, коли гіпокотильні сегменти перед розміщенням на живильному гормональному середовищі занурювали у стерильну дистильовану воду і злегка струшували протягом 20 хв, порівняно з варіантом, де їх відразу поміщали на середовище; така попередня обробка пом'якшувала шар епідермісу і збільшувала його проникність, що й зумовлювало вищу метаболічну активність тканин завдяки збільшенню поглинання води, елементів живлення і регуляторів росту із середовища²⁹. Конкуренції серед експлантів було досягнуто через зміну між ними відстані в чашках Петрі, зокрема за відстані 1,0 см, порівняно з розміщенням через 2,0 см, збільшувалася кількість регенерантів та їх довжина, а в разі зменшення відстані до 0,5 см спостерігали зменшення частоти органогенезу та розмірів утворених пагонів³⁰; оптимальним було розміщення експлантів за схемою 1,5 × 1,5 см³¹.

²⁷ Seta-Koselska A., Skórzyńska-Polit E. Optimization of *in vitro* culture conditions for obtaining flax (*Linum usitatissimum* L. cv. Modran) cell suspension culture. *BioTechnologia*. 2017. Vol. 98, Iss. 3. P. 183–188. DOI: 10.5114/bta.2017.70796

²⁸ Tsygankova V. A., Bayer O. O., Andrusovich Ya. V. Et al. Screening of five and six-membered nitrogen-containing heterocyclic compounds as new effective stimulants of *Linum usitatissimum* L. organogenesis *in vitro*. *Int. J. Med. Biotechnol. Genetics*. 2016. S2:001. P. 1–9. DOI: 10.19070/2379-1020-SI02001

²⁹ Yıldız M., Özgen M. The effect of a submersion pretreatment on *in vitro* explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2004. Vol. 77, Iss. 1. P. 111–115. DOI: 10.1023/B:TICU.0000016493.03592.c3

³⁰ Yıldız M., Sağlık C., Telci C., Erkilich E. G. The effect of *in vitro* competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. *Turk. J. Bot.* 2011. Vol. 35, Iss. 2. P. 211–218. DOI: 10.3906/bot-1005-26

³¹ Beyaz R., Yıldız M. The effect of inter-plantal competition on *in vitro* seed germination and seedling growth in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Eskişehir Technical Univ. J. of Sci. and Tech. C – Life Sci. and Biotech.* 2019. Vol. 8, Iss. 1. P. 61–68. DOI: 10.18036/aubtdc.427128

Культура пиляків хоча і є менш ефективною для регенерації рослин льону, порівняно з культурою соматичних клітин, але досить часто використовується в біотехнологічних дослідженнях. Саме регенеранти, отримані з клітин пиляків, мають підвищену стійкість проти фузаріозу³². На індукцію калусоутворення в культурі пиляків льону значний вплив мали попередня обробка рослин-донорів, генотип (сорт), вид і співвідношення екзогенних регуляторів росту, температура культивування експлантів. Пиляки рослин-донорів, вирощених в умовах більш низьких температур (14–18°C), значно підвищували інтенсивність калусоутворення, порівняно з пиляками, вирощеними за більш високих температур (18–22°C). Комбінації фітогормонів доцільно розробляти для кожного генотипу окремо, зокрема, для певних сортів як ефективні описані такі комбінації: 0,1 мг/л БАП і 0,2 мг/л 2,4-Д; 0,2 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК; 0,1 мг/л БАП і 0,2 мг/л індол-3-оцтової кислоти (ІОК); залежно від генотипу для ефективної регенерації пагонів потрібно доповнити живильне середовище сахарозою^{33,34,35}, мальтозою³⁶ чи лактозою, яка підвищує інтенсивність калусогенезу³⁷. Кількість пиляків з калусогенезом

³² Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell Rep.* 2003. Vol. 22, Iss. 2. P. 110–116. DOI: 10.1007/s00299-003-0662-1

³³ Burbulis N., Blinstrubienė A., Sliesaravičius A., Venskutonienė E. Influence of genotype, growth regulators, sucrose level and preconditioning of donor plants on flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *Acta Biol. Hung.* 2005. Vol. 56, Iss. 3–4. P. 323–331. DOI: 10.1556/ABiol.56.2005.3-4.15

³⁴ Burbulis N., Blinstrubienė A. Genotypic and exogenous factors affecting linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *J. Food Agricult. Environ.* 2011. Vol. 9, Iss. 3–4. P. 364–367. DOI: 10.1234/4.2011.2285

³⁵ Burbulis N., Blinstrubienė A., Masiėnė R., Jonytienė V. Influence of genotype, growth regulators and sucrose concentration on linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *J. Food Agricult. Environ.* 2012. Vol. 10, Iss. 3–4. P. 764–767. DOI: 10.1234/4.2012.3509

³⁶ Millam S., Davidson D., Powell W. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis in vitro: the effect of different carbohydrates. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 1992. Vol. 28, Iss. 2. P. 163–166. DOI: 10.1007/BF00055512

³⁷ Chen Y., Dribnenki P. Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. *Plant Cell Rep.* 2002. Vol. 21, Iss. 3. P. 204–207. DOI: 10.1007/s00299-002-0500-x

була більшою за температури культивування 28 °С, порівняно з 33 і 6 °С³⁸.

Також розробляються прийоми отримання калюсної тканини із зародків (зав'язей) льону звичайного з подальшою регенерацією пагонів³⁹. Установлено, що найінтенсивніше формувався калюс і регенерувалися пагони на середовищі, доповненому 1,5 мг/л ІОК і 1,5 мг/л БАП, але ризогенез у такому разі не спостерігався, корені розвивалися на середовищі лише з ауксином 2,4-Д⁴⁰. Іншими дослідженнями продемонстровано, що частота калюсоутворення може варіювати у широких межах (9,17–100 %), залежно від сорту і фітогормонального складу середовища, а в деяких сортів органогенез не відбувався взагалі. У більшості випадків найвищу частоту регенерації пагонів отримано на середовищі, доповненому 0,1 мг/л НОК і 0,2 мг/л ТДЗ. Цитологічний аналіз свідчить, що 21,88 % рослин-регенерантів були гаплоїдами, а решта – диплоїдами або міксоплоїдами (78,12 %) ⁴¹.

Останнім часом даний вид набуває все більшої популярності завдяки здатності до синтезу таких вторинних метаболітів, як лігнани, що використовуються для лікування різних типів онкологічних захворювань. Отримують дані сполуки, використовуючи калюсні культури льону *in vitro* на основі стеблових і листкових експлантів, інокульованих на середовищі Мурасіге і Скуга, доповненому різними концентраціями НОК, ТДЗ і БАП. Калюси, отримані із листків (1,0 мг/л НОК у середовищі), накопичують найбільшу біомасу і характеризуються найвищим рівнем антиоксидантної активності, у той же час найвищий рівень синтезу флавоноїдів і фенольних сполук спостерігають у калюсах, які походять зі стеблових експлантів. Дані результати дають певні

³⁸ Сорока А. И. Особенности подготовки материала и культивирования *in vitro* пыльников льна при получении гаплоидных растений. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. 2010. № 2. С. 13–19.

³⁹ Obert V., Bartosova Z., Pretova A. Dihaploid production in flax by anther and ovary cultures. *Journal of Natural Fibers*. 2005. Vol. 1, Iss. 3. P. 1–14. DOI: 10.1300/J395v01n03_01

⁴⁰ Sakhare S. P., Mendhulkar V. D. Embryo excised callus induction and rhizogenesis in *Linum usitatissimum* L. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2016. Vol. 7, Iss. 3. P. 507–511.

⁴¹ Blinstrubienė A., Burbulis N., Masiene R. Genotypic and exogenous factors affecting linseed ovary culture. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2017. Vol. 104, No. 3. P. 243–248. DOI: 10.13080/z-a.2017.104.031

докази того, що НОК по-різному впливає на продукування лігнанів і неолігнанів у калюсній культурі льону, що відкриває широкі можливості для розробки стратегій зі збільшення виробництва зазначених цінних метаболітів⁴². Також лігніни можна отримувати, використовуючи калюсні культури льону звичайного на основі гіпокотильних сегментів під впливом ТДЗ і кінетину (КІН)⁴³ або в клітинній суспензійній культурі⁴⁴.

Процеси калюсоутворення й органогенезу льону звичайного в умовах *in vitro* визначаються генетичними чинниками. На калюсогенез і здатність до регенерації впливають неадитивні ефекти генів, водночас ступінь (інтенсивність) калюсо- й органогенезу має різну генетичну природу⁴⁵.

Умови проведення досліджень наших досліджень були наступними: насіння стерилізували 1,5%-м водним розчином натрій гіпохлориту (NaOCl) з експозицією 12,5–15 хв, тричі промивали стерильною дистильованою водою, пророщували на агаризованому безгормональному живильному середовищі Мурасіге і Скуга⁴⁶ з додаванням 10 г/л сахарози; на 7–15-ту добу з проростків брали гіпокотильні та епикотильні сегменти довжиною 2–3 мм, які культивували на середовищі Мурасіге і Скуга, доповненому певними фітогормонами, при цьому фотоперіод становив 16 год, інтенсивність освітлення – 2500 лк, відносна вологість – 60–80 %, температура повітря – 22–24°C. Обліки проводили на 35-ту добу культивування за ознаками: частота калюсогенезу (відсоток

⁴² Anjum S., Abbasi B. H., Hano C. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2017. Vol. 129, Iss. 1. P. 73–87. DOI: 10.1007/s11240-016-1158-3

⁴³ Khan I., Khan M. A., Shehzad M. A. et al. Micropropagation and production of health promoting lignans in *Linum usitatissimum*. *Plants.* 2020, Vol. 9, Iss. 6. 728. DOI: 10.3390/plants9060728

⁴⁴ Zahir A., Nadeem M., Ahmad W. et al. Chemogenic silver nanoparticles enhance lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2019. Vol. 136, Iss. 3. P. 589–596. DOI: 10.1007/s11240-018-01539-6

⁴⁵ Bonell M., Lassaga S. L. Genetic analysis of the response of linseed (*Linum usitatissimum* L.) somatic tissue to *in vitro* cultivation. *Euphytica.* 2002. Vol. 125, Iss. 3. P. 367–372. DOI: 10.1023/A:1016013609068

⁴⁶ Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

експлантів, на яких утворився калюс), маса калюсу з одного експланта, частота органогенезу (відсоток калюсів, на яких утворились пагони), кількість пагонів, що утворились (без урахування меристематичних зон і зачаткових пагонів), і висота нормально розвинених пагонів; вибірка – не менше 30 експлантів і спостережень для кожного колекційного зразка.

L. usitatissimum L. convar. *elongatum* (сорт Глінум) дуже чутливий до культури *in vitro*, зокрема за умов культивування гіпокотильних сегментів на безгормональному середовищі за вказаних кліматичних умов і фотоперіоду калюсогенез, хоча і досить слабкий, виявлено у 24,24 % експлантів. Соматичний ембріогенез також був можливий і на безгормональному середовищі (частота органогенезу при цьому складала 6,06%). Слід зазначити, що 69,70–75,00 % гіпокотильних експлантів формували калюсну тканину при культивуванні на середовищі лише з ауксинами НОК, ІОК чи 2,4-Д. При цьому частота органогенезу була незначною: 6,25 і 12,90 % у варіантах з 0,5 і 1,0 мг/л ІОК відповідно, 12,50 і 12,12 % у варіантах з 0,05 і 0,1 мг/л НОК відповідно і регенерація пагонів майже не відбувалась у варіантах з 0,15 і 0,30 мг/л 2,4-Д. Також калюс добре формувался на середовищах виключно з цитокінінами БАП (0,5, 1,0 і 2,0 мг/л) і КІН (0,15 і 0,30 мг/л). Частота калюсогенезу становила 93,75, 100,00, 93,94 і 66,66, 83,87%, а органогенезу – 81,25, 93,55, 50,00 і 48,71, 48,38 % відповідно.

Поєднання ауксинів і цитокінінів, зокрема 0,05 НОК і 1,0 мг/л БАП, 0,05 НОК і 0,3 мг/л КІН, 0,5 ІОК і 1,0 мг/л БАП, 0,5 ІОК і 0,3 мг/л КІН, 0,15 2,4-Д і 0,3 мг/л КІН, 0,3 2,4-Д і 0,3 мг/л КІН, 0,3 2,4-Д і 0,6 мг/л КІН сприяло утворенню калюсу у 100,00 % експлантів, у варіантах з 0,15 2,4-Д і 1,0 мг/л БАП, 0,3 2,4-Д і 2,0 мг/л БАП, частота калюсоутворення була дещо нижчою, але вищою за 96 %. При цьому частота органогенезу мала досить суттєвий розмах варіації – від 3,12 до 96,88 %. З позицій інтенсивного органогенезу не зовсім вдалим виявились поєднання НОК і КІН, ІОК і КІН, 2,4-Д і БАП, а також 2,4-Д і КІН. Збільшення концентрації НОК до 1,0 мг/л, ІОК до 3,0 мг/л і БАП до 3,0 мг/л пригнічувало ріст калюсу і регенерацію пагонів. Фітогормон 2,4-Д сприяв порівняно інтенсивному калюсогенезу, але при його наявності у живильному середовищі пагони майже не утворювалися (табл. 1).

Таблиця 1

**Частота калюсоутворення і органогенезу льону звичайного
в залежності від співвідношення фітогормонів
у живильному середовищі**

Ауксини, мг/л			Цитокініни, мг/л		Частота калюсогенезу, %	Частота органогенезу, %
НОК	ІОК	2,4-Д	БАП	КІН		
–	–	–	–	–	24,24	6,06
0,05	–	–	–	–	71,88	12,50
0,10	–	–	–	–	69,70	12,12
–	0,50	–	–	–	71,88	6,25
–	1,00	–	–	–	74,19	12,90
–	–	0,15	–	–	75,00	3,12
–	–	0,30	–	–	75,00	0,00
–	–	–	0,50	–	93,75	81,25
–	–	–	1,00	–	100,00	93,55
–	–	–	2,00	–	93,94	50,00
–	–	–	–	0,15	66,66	48,71
–	–	–	–	0,30	83,87	48,38
–	–	–	–	0,60	25,00	12,50
0,05	–	–	1,00	–	100,00	96,88
0,05	–	–	–	0,30	100,00	6,25
–	0,50	–	1,00	–	100,00	93,55
–	0,50	–	–	0,30	100,00	3,12
–	–	0,15	1,00	–	96,77	12,90
–	–	0,30	1,00	–	96,67	10,00
–	–	0,30	2,00	–	96,67	6,67
–	–	0,15	–	0,30	100,00	15,65
–	–	0,30	–	0,30	100,00	15,60
–	–	0,30	–	0,60	100,00	3,12

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

органогенезу, додавання ГК₃ у зазначеній дозі є ефективним, оскільки збільшується кількість регенерантів, їх висота і відповідно кількість міжвузлів, тобто виникають можливості підвищення коефіцієнта подальшого розмноження соматоклонів (табл. 2). При цьому істотні відмінності маси калюсу з експланта (за культивування у біологічних пробірках діаметром 20 мм) проявляються на 24-ту добу. З цього часу спостерігається й найбільший приріст біомаси калюсної тканини, який продовжується до 42-ї доби. На середовищі без додавання ГК₃ приріст маси калюсу фактично призупиняється на 35-ту добу культивування.

Таблиця 2

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

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

Примітки: ** – відмінності порівняно з контролем істотні при $P < 0,01$, *** – при $P < 0,001$.

Отже, льон звичайний значною мірою здатний до утворення калюсу на гіпокотильних сегментах під впливом: 1) лише ауксинів, 2) лише цитокінінів, 3) комбінації ауксинів і цитокінінів екзогенного походження. Найкращим поєднанням для ініціації утворення пагонів був варіант НОК і БАП, а також ІОК і БАП (звичайно, в межах досліджуваних концентрацій), що і визначило вибір даних фітогормонів для проведення подальших досліджень з більш широким варіаційним рядом їх доз у середовищі.

3. Вплив цитокініну 6-бензиламінопурину й ауксинів 1-нафтилоцтової й індол-3-оцтової кислоти на інтенсивність калюсогенезу й органогенезу льону звичайного

БАП є важливим фітогормоном для росту і розвитку льону, а також диференціації клітин *in vitro*, що активізує протікання відповідних фізіологічних процесів у клітинах і тканинах, тому

у подальшому було встановлено залежність інтенсивності калюсоутворення і органогенезу від концентрації БАП за умови наявності чи відсутності ауксину НОК.

У результаті проведених досліджень виявлено, що калюс утворювався на середовищах з БАП від 0,25 до 3,0 мг/л з високою частотою (у 75,00–100,00 % експлантів). Слід зазначити, що в межах досліджуваної вибірки частота калюсоутворення становила 100,00 % у варіантах з 1,0, 1,25 і 1,5 мг/л БАП. Найнижча частота калюсоутворення була у варіантах з 0,25 і 3,0 мг/л даного цитокініну. Таким чином, подальше зниження концентрації (< 0,25 мг/л) чи її підвищення (> 3,0 мг/л) з метою індукції калюсогенезу є недоцільною. Найвищу масу калюсу з одного експланта виявлено у варіанті з 1,0 мг/л БАП, вона у середньому становила 3,00 г. Дещо нижчу інтенсивність формування калюсних тканин спостерігали у варіантах з 0,5 і 1,25 мг/л БАП, а найнижчу – у варіантах з крайніми значеннями концентрацій: 0,16 г при 0,25 мг/л БАП і 0,15 г при 3,0 мг/л БАП.

Частота органогенезу також залежала від концентрації БАП у живильному середовищі. У 100,00 % випадків з калюсу відбувалось формування пагонів на середовищі, що містило 1,25 мг/л досліджуваного фітогормону. Загалом, висока інтенсивність органогенезу характерна для варіантів, де вміст БАП становив від 1,0 до 1,75 мг/л, що підтверджує аналіз ознак кількості і висоти утворених пагонів (2,4–5,0 шт. і 1,19–3,10 см відповідно). Концентрація БАП 3,0 мг/л не сприяла (або й пригнічувала) диференціації калюсних тканин і в подальшому появі меристематичних зон вегетативних органів льону (табл. 3).

Дослідження впливу різних концентрацій БАП на частоту та інтенсивність калюсо- і органогенезу за умови присутності у середовищі НОК з однаковою концентрацією 0,05 мг/л засвідчило, що загалом частота утворення калюсу і появи пагонів зростає, порівняно з відповідними варіантами, в яких був лише цитокінін. Одночасно оптимальні концентрації БАП розширюються від 0,5 до 2,0 мг/л. Калюс утворився на 100,00% експлантів у варіантах з 1,0, 1,25, 1,5 і 1,75 мг/л БАП, а органогенез спостерігали у 100,0% калюсів у варіанті з 1,5 мг/л зазначеної сполуки. Низька (0,25 мг/л) або ж висока (3,0 мг/л) доза БАП за умови додавання до середовища 0,05 мг/л НОК давали низьку частоту регенерації пагонів. Вона становила лише 6,25%.

Таблиця 3

**Вплив концентрації БАП за умови відсутності ауксину
у живильному середовищі на інтенсивність калусоутворення
і органогенезу льону звичайного**

Концентрація БАП, мг/л	Інтенсивність калусогенезу		Інтенсивність органогенезу		
	Частота калусо-генезу, %	Маса калюсу з експланта, г	Частота органогенезу, %	Кількість пагонів, шт.	Висота пагонів, см
0,25	75,00	0,16 ± 0,015	12,50	2,0 ± 0,13	1,93 ± 0,080
0,50	93,75	1,98 ± 0,115	81,25	2,8 ± 0,15	1,95 ± 0,304
1,00	100,00	3,00 ± 0,157	93,55	4,0 ± 0,22	3,10 ± 0,377
1,25	100,00	2,50 ± 0,109	100,00	5,0 ± 0,11	2,88 ± 0,174
1,50	96,88	1,02 ± 0,173	93,75	3,0 ± 0,20	1,79 ± 0,228
1,75	100,00	0,80 ± 0,058	90,62	2,4 ± 0,15	1,19 ± 0,056
2,00	93,94	0,76 ± 0,048	50,00	1,6 ± 0,17	0,80 ± 0,049
2,50	90,62	0,82 ± 0,083	31,25	1,9 ± 0,25	0,84 ± 0,064
3,00	81,25	0,15 ± 0,020	3,12	1,5 ± 0,12	0,80 ± 0,049

Ознаки маси калюсу з експланта, кількості і висоти пагонів на середовищах, які містили НОК, порівняно з середовищами без ауксину екзогенного походження, відрізнялись несуттєво. Межі їх варіювання становили 0,48–2,82 г, 1,1–5,0 шт. і 1,52–2,02 см відповідно (табл. 4).

Таблиця 4

**Вплив концентрації БАП за умови наявності 0,05 мг/л НОК
у живильному середовищі на інтенсивність калусоутворення
і органогенезу льону звичайного**

Фітогормони, мг/л		Інтенсивність калусогенезу		Інтенсивність органогенезу		
НОК	БАП	Частота калусо-генезу, %	Маса калюсу з експланта, г	Частота органо-генезу, %	Кількість пагонів, шт.	Висота пагонів, см
0,05	0,25	92,62	0,48 ± 0,085	6,25	2,6 ± 0,18	1,66 ± 0,085
0,05	0,50	96,88	1,71 ± 0,104	87,50	2,9 ± 0,12	1,76 ± 0,172
0,05	1,00	100,0	2,22 ± 0,099	96,88	4,4 ± 0,14	1,62 ± 0,205
0,05	1,25	100,0	1,32 ± 0,081	96,88	4,4 ± 0,14	2,00 ± 0,173
0,05	1,50	100,0	1,98 ± 0,071	100,00	5,0 ± 0,19	2,02 ± 0,211
0,05	1,75	100,0	1,95 ± 0,070	93,75	3,6 ± 0,15	1,74 ± 0,112
0,05	2,00	96,88	2,82 ± 0,145	62,50	1,6 ± 0,14	1,75 ± 0,183
0,05	2,50	96,00	2,14 ± 0,076	48,00	1,6 ± 0,14	1,52 ± 0,107
0,05	3,00	93,75	0,60 ± 0,090	6,25	1,1 ± 0,07	1,58 ± 0,069

Аналіз експериментальних даних показує, що залежність між концентрацією БАП у живильному середовищі та інтенсивністю калусоутворення і органогенезу є нелінійною, можна побудувати графіки та рівняння криволінійної регресії (за типом параболи), які дозволяють прогнозувати збільшення чи зменшення частоти калусоутворення і частоти органогенезу від зменшення чи збільшення величини вмісту фітогормону у середовищі, виділити оптимальну його концентрацію для індукції зазначених явищ і отримання соматоклонів (рис. 1).

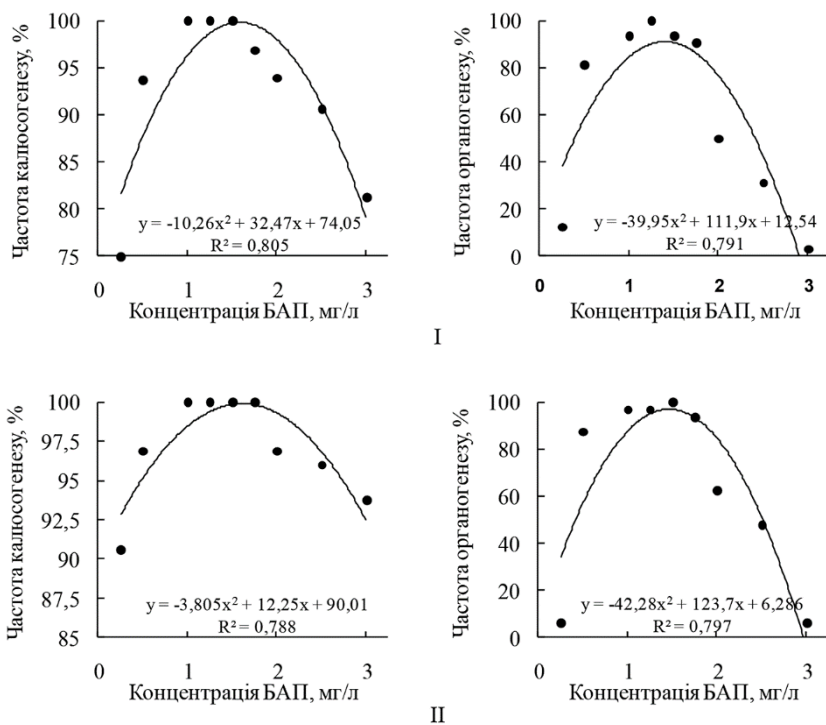


Рис. 1. Криволінійна регресійна залежність частоти калусоутворення і органогенезу від концентрації БАП у живильному середовищі (I – за умови відсутності ауксину, II – за умови наявності НОК)

Проведені дослідження із залученням більш великого варіаційного ряду концентрацій БАП свідчать про те, що при наявності ауксину НОК (0,05 мг/л) ефективність калусогенезу і регенерації пагонів була вищою. Разом з тим застосування лише

БАП може бути цілком самостійним прийомом для індукції зазначених процесів. Лише збільшення концентрації БАП до 3,0 мг/л пригнічувало ріст калюсу і регенерацію пагонів. Можна припустити, що для досліджуваного виду загалом і даного генотипу зокрема достатнім для органогенезу є синтез ауксинів ендогенного походження при наявності цитокінінів екзогенного походження, однак це питання потребує подальшого вивчення і встановлення фізіологічних механізмів відповідних процесів у рослинних клітинах і тканинах.

Найбільша результативність калюсогенезу і органогенезу нами виявлена у варіантах: 1) 1,5 мг/л БАП, 2) 1,25 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК. Слід зазначити, що у літературних джерелах описані як ефективні або нижчі або вищі.

Дослідження різних концентрацій ауксинів НОК й ІОК за умови наявності у живильному середовищі цитокініну БАП з однаковою концентрацією 1,00 мг/л засвідчило, що певні концентрації ауксинів підвищують ефективність калюсоутворення й органогенезу. Як при включенні у середовище НОК від 0,025 до 1,000 мг/л, так і при включенні ІОК від 0,05 до 3,00 мг/л, частота калюсогенезу становила 100,0% (табл. 5).

У першому випадку (за умови додавання НОК) маса калюсу з експланта коливалась в межах від 0,94 до 2,25 г, різко зменшуючись, починаючи з концентрації 0,750 мг/л. Частота органогенезу становила від 6,25 (варіант з 0,750 мг/л НОК) до 100,0% (варіант з 0,075 мг/л НОК), органогенез зовсім не відбувався при наявності у середовищі 1,000 мг/л досліджуваної сполуки. Найбільша кількість пагонів утворилась у середовищах з 0,050 і 0,075 мг/л даної речовини (4,4 і 4,3 шт. відповідно). З підвищенням концентрації НОК зменшувалась висота пагонів. Загалом найбільш оптимальними виявились варіанти середовища, які містили у своєму складі 0,050 або 0,075 мг/л НОК і 1,0 мг/л БАП.

У другому випадку (за умови додавання у середовище ІОК) маса калюсу коливалась в межах від 0,96 до 2,09 г. При цьому низькі (0,05 мг/л) і більш високі (3,00 мг/л) концентрації даного ауксину не сприяли інтенсивному збільшенню маси калюсних тканин. Частота органогенезу коливалась в межах від 3,03 (варіант з 3,00 мг/л ІОК) до 93,75% (варіанти з 0,30 і 0,50 мг/л ІОК). Ознака кількості пагонів в межах варіантів з ІОК була меншою за середовище з НОК, але з підвищенням концентрації їх кількість значно зростала. Ознака висоти пагонів коливалась в межах від 1,10 до 2,75 см, що

перевищувало варіанти з ауксином НОК. Найкращими були варіанти, що поєднували ІОК від 0,10 до 0,50 мг/л і 1,0 мг/л БАП.

Таблиця 5

Вплив концентрації НОК та ІОК за умови наявності 1,0 мг/л БАП у живильному середовищі на інтенсивність калусоутворення і органогенезу льону звичайного

Фітогормони, мг/л		Інтенсивність калусогенезу		Інтенсивність органогенезу		
НОК	ІОК	Частота калусо-генезу, %	Маса калусу з експланта, г	Частота органо-генезу, %	Кількість пагонів, шт.	Висота пагонів, см
0,025	–	100,0	2,14 ± 0,176	78,12	3,0 ± 0,20	1,60 ± 0,248
0,050	–	100,0	2,22 ± 0,099	96,88	4,4 ± 0,14	1,62 ± 0,205
0,075	–	100,0	2,25 ± 0,137	100,00	4,3 ± 0,15	1,63 ± 0,119
0,100	–	100,0	2,04 ± 0,076	78,12	2,7 ± 0,18	1,59 ± 0,168
0,150	–	100,0	1,96 ± 0,098	71,88	2,7 ± 0,18	1,36 ± 0,065
0,250	–	100,0	1,89 ± 0,072	50,00	2,0 ± 0,20	1,34 ± 0,121
0,500	–	100,0	1,84 ± 0,172	48,39	2,0 ± 0,09	0,76 ± 0,080
0,750	–	100,0	0,94 ± 0,101	6,25	1,5 ± 0,14	0,65 ± 0,033
1,000	–	100,0	0,94 ± 0,084	0,00	–	–
–	0,05	100,0	0,96 ± 0,090	75,00	1,2 ± 0,10	1,10 ± 0,155
–	0,10	100,0	1,69 ± 0,071	90,62	1,6 ± 0,27	1,82 ± 0,346
–	0,15	100,0	1,78 ± 0,115	90,90	1,8 ± 0,12	1,84 ± 0,114
–	0,20	100,0	1,77 ± 0,055	90,62	1,6 ± 0,13	1,85 ± 0,077
–	0,30	100,0	2,00 ± 0,158	93,75	2,0 ± 0,16	1,99 ± 0,107
–	0,50	100,0	2,09 ± 0,164	93,75	2,0 ± 0,07	2,00 ± 0,110
–	1,00	100,0	1,66 ± 0,102	28,12	2,2 ± 0,12	2,19 ± 0,088
–	2,00	100,0	1,66 ± 0,140	18,75	2,6 ± 0,14	2,27 ± 0,168
–	3,00	100,0	1,00 ± 0,036	3,03	3,6 ± 0,24	2,75 ± 0,142

Аналіз експериментальних даних показує, що залежність між концентрацією ауксинів у живильному середовищі та інтенсивністю органогенезу і кількістю пагонів є нелінійною, можна побудувати графіки та рівняння криволінійної регресії, які дозволяють прогнозувати збільшення чи зменшення частоти органогенезу та інтенсивності утворення пагонів від зменшення чи збільшення величини вмісту фітогормону у середовищі, виділити оптимальну його концентрацію для індукції зазначених явищ і отримання соматоклонів (рис. 2).

Зазвичай ауксини та цитокініни додають до живильного середовища у певному співвідношенні один до одного. Досить часто

кратне збільшення чи зменшення різних груп фітогормонів до певної межі «урівноважує» протікання фізіологічних процесів, які вони детермінують, однак, як показують результати наших досліджень, у льону звичайного дана тенденція не простежується.

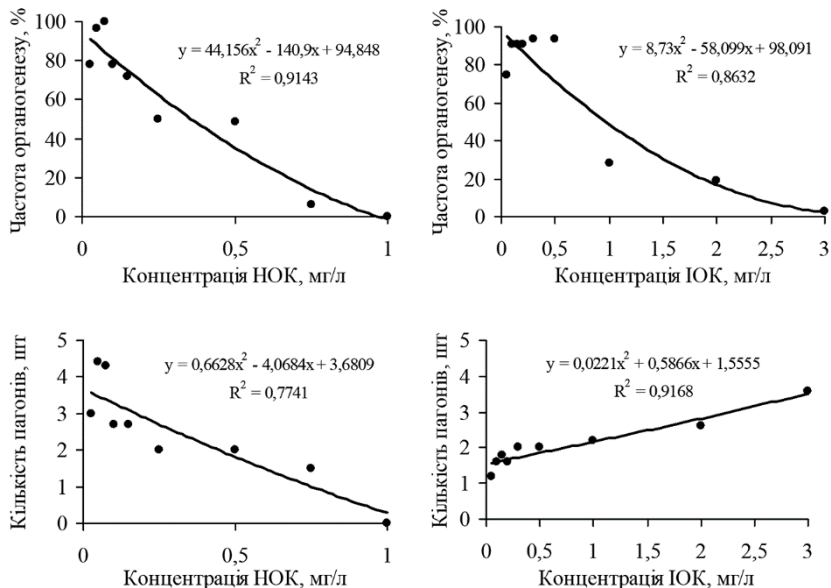


Рис. 2. Криволінійна регресійна залежність частоти органогенезу від концентрації НОК й ІОК у живильному середовищі, яке містить 1,0 мг/л БАП

Одне з найоптимальніших поєднань – 0,05 НОК і 1,0 мг/л БАП (співвідношення ауксин:цитокінін складає 1:20) – індукувало калюсоутворення на 100,00% гіпокотильних експлантах і у 96,88 % випадків – органогенез. За цього ж співвідношення (1:20) при зменшенні фітогормонів у п'ять разів (0,01 НОК і 0,2 мг/л БАП) калюсоутворення спостерігали у 100,00% випадків, а органогенез відбувся лише на 15,62% калюсів. У свою чергу додавання до живильного середовища лише 0,01 мг/л НОК або лише 0,2 мг/л БАП викликало доволі інтенсивне утворення калюсу (69,70 і 74,19%) і дуже слабкий органогенез (12,12 і 9,68% відповідно). За цього ж співвідношення НОК:БАП (1:20), але за умови збільшення концентрації фітогормонів у п'ять разів (0,25 НОК і 5,0 мг/л БАП)

спостерігали поодинокі випадки калюсоутворення (3,03%) і повну відсутність соматичного органогенезу (0,00%). При цьому слід відмітити, що за наявності у складі живильного середовища лише 0,25 мг/л ауксину НОК частота калюсоутворення становила 62,50, а органогенезу – 9,38%, за наявності у складі середовища лише 5,0 мг/л цитокініну БАП частота калюсоутворення становила 6,25, а органогенезу – 0,000% (табл. 6)

Таблиця 6

Вплив співвідношення НОК та БАП у живильному середовищі на частоту калюсоутворення й органогенезу льону звичайного

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

Введення у живильне середовище фітогормонів зі співвідношенням ауксин:цитокінін як 1:10 сприяло індукції інтенсивного калюсогенезу, а утворення меристематичних зон і пагонів з них залишалось досить низьким. Так, за вмісту 0,01 НОК і 0,1 мг/л БАП (концентрація НОК без змін, концентрацію БАП зменшено у 10 разів, порівняно з контрольним варіантом) частота калюсоутворення склала 96,88, а органогенезу – 12,50%; за вмісту 0,25 НОК і 2,5 мг/л БАП (концентрацію НОК збільшено у 5 разів, концентрацію БАП збільшено у 2,5 рази, порівняно з контрольним варіантом) частота калюсоутворення склала 100,00, а органогенезу – 31,25%. За роздільного внесення НОК і БАП їх ефективність була нижчою. Таким чином, оптимальним для індукції калюсоутворення й органогенезу льону звичайного є додавання до живильного

середовища визначених концентрацій регуляторів росту рослин – 0,05 НОК і 1,0 мг/л БАП, а не підбір їх за співвідношенням ауксин : цитокінін.

Таким чином, для соматичного ембріогенезу в культурі *in vitro* оптимальні концентрації БАП (в мг/л) можна виразити нерівністю $1,0 \leq \text{БАП} \leq 1,75$; оптимальні концентрації БАП за умови додавання до живильного середовища 0,05 мг/л НОК – нерівністю $0,5 \leq \text{БАП} \leq 2,0$; оптимальні концентрації НОК за умови додавання до середовища 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,025 \leq \text{НОК} \leq 0,150$; оптимальні концентрації ІОК за умови додавання до середовища 1,0 мг/л БАП – нерівністю $0,05 \leq \text{ІОК} \leq 0,50$ (табл. 7)

Таблиця 7

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

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

Установлені закономірності доцільно використовувати в селекційно-біотехнологічних дослідженнях.

4. Скринінг генотипів льону звичайного на здатність до калюсогенезу і органогенезу

Загалом, рослини роду *Linum* L. і вид *L. usitatissimum* L. за вказаних умов культивування і фітогормонального складу, який включає 0,05 НОК і 1,0 мг/л БАП, значною мірою здатний до утворення калюсу і пагонів з нього в умовах *in vitro*. Частота й інтенсивність калюсогенезу і в подальшому органогенезу за однакового фітогормонального складу залежить від генотипу, що доведено на прикладі різних колекційних зразків (сортів) льону-довгунця.

Так, частота калюсоутворення становила від 15,0% у зразка UF0401830 до 100% у решти зразків, крім UF0401864, тобто гіпокотильні та епикотильні сегменти досліджуваних генотипів завжди формували калюс. У зразка UF0401830 спостерігалась

внутрішньопопуляційна мінливість за здатністю утворювати калюс: з експлантів, взятих з однієї рослини він завжди формується, а з експлантів, взятих з іншої рослини – ніколи. Маса калюсу з одного експланта за 35 діб культивування становила від 0,56 г (UF0402142) до 1,51 г (UF0401864). Найбільш інтенсивно накопичували калюс наступні зразки: UF0401864 (1,51 г), UF0401494 (1,45 г), UF0401792 (1,25 г), UF0402228 (1,18 г) і UF0401867 (0,97 г). Слід зазначити, що від маси калюсу не залежала частота органогенезу ($r = 0,01$), між ознаками маси калюсу з експланта і кількості пагонів існував додатний слабкий взаємозв'язок ($r = 0,29$), а між ознаками маси калюсу і висоти пагонів встановлено додатний середній взаємозв'язок ($r = 0,46$).

Частота органогенезу коливалась в межах від 10,0 % (зразок UF0401830) до 93,8 % (UF0401603 і UF0401819). Найбільш здатними до органогенезу виявились зразки: UF0401603, UF0401819 (93,8 %), UF0402178 (90,6 %), UF0401494, UF0401897 та UF0401900 (87,5 %). Багато меристематичних зон спостерігали у UF0401864, що походить з Румунії, та UF0402178, що походить з Чехії, рівномірний розвиток пагонів був притаманний UF0401792 (країна походження – Канада). Кількість пагонів, які формувались з калюсної тканини під впливом фітогормонів, становила від 1,4 шт. (UF0402071) до 4,0 шт. (UF0401864 та UF0402178 відповідно). За даною ознакою можна виділити наступні зразки: UF0401864, UF0402178 (4,0 шт.), UF0401603, UF0401494, UF0401897 і UF0402143 (3,0 шт.). Висота регенованих пагонів на 35-ту добу досягала значення від 0,78 см (UF0402071) до 2,37 см (UF0401864). Зразки UF0402134 і UF0402142 давали дуже слабкі рослини-регенеранти. Загалом, найбільш інтенсивним ростом пагонів у довжину з калюсної тканини характеризувались колекційні зразки: UF0401864 (2,37 см), UF0402178 (1,50 см), UF0402228 (1,40 см), UF0401819 (1,31 см) та UF0402143 (1,30 см).

За комплексом ознак (частота калюсоутворення, частота органогенезу і кількість пагонів) виділились зразки: UF0401603, UF0401494, UF0402178, UF0401897 і UF0402143.

За середніми даними різновидів (льон-довгунець, межеумок і олійний) показало, що калюс утворюється у 100% експлантів у довгунця і олійного, менш чутливим до культури *in vitro* і дії зазначених екзогенних регуляторів росту є межеумок (частота калюсогенезу 75,0 %), однак він характеризується найвищим розмахом варіації (різницею між максимальним і мінімальним

значенням) ознаки і масою калюсу з одного експланта ($1,12 \pm 0,10$ г), порівняно з довгунцем ($0,93 \pm 0,08$ г) і олійним ($0,86 \pm 0,07$ г) (табл. 8).

Таблиця 8

Здатність до калюсоутворення й органогенезу в умовах *in vitro* різних зразків льону звичайного

Номер Націо- нального каталогу	Назва зразка	Країна походження	Інтенсивність калюсогенезу		Інтенсивність органогенезу		
			Частота калюсогенезу, %	Маса калюсу з експланта, г	Частота органогенезу, %	Кількість пагонів, шт.	Висота пагонів, см
льон звичайний, довгунець							
UF0401603	Гліум	Україна	100,0	$0,82 \pm 0,04$	93,8	$3,0 \pm 0,20$	$1,06 \pm 0,05$
UF0401494	Кром	Росія	100,0	$1,45 \pm 0,14$	87,5	$3,0 \pm 0,28$	$0,94 \pm 0,08$
UF0401867	Орион	Росія	100,0	$0,97 \pm 0,09$	78,1	$2,5 \pm 0,15$	$0,94 \pm 0,05$
UF0402071	Есмань	Україна	100,0	$0,70 \pm 0,06$	45,4	$1,4 \pm 0,14$	$0,78 \pm 0,05$
UF0402134	Белита	Білорусь	100,0	$0,70 \pm 0,05$	50,0	$1,6 \pm 0,14$	$0,85 \pm 0,04$
льон звичайний, межеумок							
UF0401792	Nor Man	Канада	100,0	$1,25 \pm 0,13$	62,5	$2,1 \pm 0,32$	$0,98 \pm 0,04$
UF0401819	Marun M.A.	Аргентина	100,0	$0,75 \pm 0,09$	93,8	$1,5 \pm 0,14$	$1,31 \pm 0,08$
UF0401830	Lisa	Франція	15,0	$1,14 \pm 0,14$	10,0	$1,5 \pm 0,16$	$0,77 \pm 0,03$
UF0401864	Taragvi	Румунія	62,5	$1,51 \pm 0,09$	62,5	$4,0 \pm 0,31$	$2,37 \pm 0,33$
UF0402178	Visamo(1-356)/ L. monnseo	Чехія	100,0	$0,94 \pm 0,07$	90,6	$4,0 \pm 0,49$	$1,50 \pm 0,17$
льон звичайний, олійний							
UF0401897	Ручеек	Росія	100,0	$0,83 \pm 0,09$	87,5	$3,0 \pm 0,18$	$1,22 \pm 0,18$
UF0401900	Lirina	Германія	100,0	$0,92 \pm 0,04$	87,5	$1,6 \pm 0,14$	$0,94 \pm 0,06$
UF0402142	Опус	Білорусь	100,0	$0,56 \pm 0,07$	53,1	$2,8 \pm 0,60$	$0,90 \pm 0,05$
UF0402143	СКi-1	США	100,0	$0,80 \pm 0,06$	78,1	$3,0 \pm 0,14$	$1,30 \pm 0,17$
UF0402228	Ruta	Литва	100,0	$1,18 \pm 0,10$	63,3	$1,6 \pm 0,13$	$1,40 \pm 0,25$
HP _{0,05}							
			18,3	0,22	18,3	0,7	0,33

Подібно частота органогенезу була найвищою у льону олійного (73,9%), а найменшою в межеумка (63,9%), але з дуже високим розмахом варіації. При цьому найбільша кількість пагонів сформувалась у льону-межеумка ($2,6 \pm 0,3$ шт.), порівняно з $2,3 \pm 0,2$ шт. у довгунця й $2,4 \pm 0,2$ шт. у олійного. Висота пагонів льону-межеумка ($1,39 \pm 0,13$ см) значно перевищувала показник

довгунця ($0,91 \pm 0,05$ см) і олійного ($1,15 \pm 0,14$ см). До того ж останні мали мінімальний розмах варіації.

Підсумуємо: найбільша частота калюсогенезу й органогенезу на гіпокотильних і епікотильних експлантах властива льону-довгунцю і олійному, найбільшу масу калюсу з експланта, кількість регенованих пагонів і їх висоту формує межеумок, який має найбільших розмах варіації досліджуваних ознак.

Вивчення колекції генетичних ресурсів *L. usitatissimum* L. за здатністю і інтенсивністю калюсогенезу і органогенезу дозволило виділяти цінні генотипи, які придатні для створення вихідного селекційного матеріалу і мікроклонального розмноження в умовах *in vitro*, здійснювати пошук співвідношення ауксинів і цитокінінів та зміни складу живильного середовища для більш ефективної індукції калюсогенезу і органогенезу у менш чутливих до *in vitro* генотипів.

Результати спостережень показали, що комбінації регуляторів росту повинні бути розроблені окремо для кожного генотипу.

ВИСНОВКИ

1. Льон звичайний (*Linum usitatissimum* L. convar. *elongatum*) значною мірою здатний до утворення калюсу на гіпокотильних сегментах за умови культивування на живильному середовищі Мурасіге і Скуга з додаванням 30 г/л сахарози, фотоперіоді 16 год, освітленості 2500 лк, відносній вологості повітря 60–80 %, температурі повітря 22–24°C під впливом лише ауксинів, лише цитокінінів, комбінації ауксинів і цитокінінів. Для досліджуваного виду загалом і генотипу зокрема достатнім для органогенезу є синтез ауксинів ендогенного походження при наявності цитокінінів екзогенного походження. Соматичний ембріогенез можливий навіть на безгормональному середовищі.

2. Найвища частота органогенезу спостерігалась під впливом БАП або КІН, тобто лише цитокінінів, поєднання БАП і ауксинів, зокрема НОК або ІОК. Фітогормон 2,4-Д сприяв порівняно інтенсивному калюсогенезу, але при його наявності у живильному середовищі пагони майже не утворювалися. Включення у живильне середовище 0,5 мг/л ГК₃ є ефективним, оскільки при цьому збільшується кількість регенерантів, їх висота і відповідно кількість міжвузлів, тобто виникають можливості підвищення коефіцієнта подальшого розмноження соматиклонів

3. Для соматичного ембріогенезу льону звичайного в культурі *in vitro* оптимальні концентрації БАП (в мг/л) можна виразити

нерівністю $1,0 \leq \text{БАП} \leq 1,75$; оптимальні концентрації БАП за умови додавання до живильного середовища $0,05 \text{ мг/л НОК}$ – нерівністю $0,5 \leq \text{БАП} \leq 2,0$; оптимальні концентрації НОК за умови додавання до середовища $1,0 \text{ мг/л БАП}$ – нерівністю $0,025 \leq \text{НОК} \leq 0,150$; оптимальні концентрації ІОК за умови додавання до середовища $1,0 \text{ мг/л БАП}$ – нерівністю $0,05 \leq \text{ІОК} \leq 0,50$. Найбільша результативність калюсогенезу і органогенезу виявлена у варіантах: $1,25 \text{ мг/л БАП}$; $1,5 \text{ БАП}$ і $0,05 \text{ мг/л НОК}$; $1,0 \text{ БАП}$ і $0,075 \text{ мг/л НОК}$; $1,0 \text{ БАП}$ і $0,50 \text{ мг/л ІОК}$. Збільшення концентрації НОК до $1,0 \text{ мг/л}$, ІОК до $3,0 \text{ мг/л}$ і БАП до $3,0 \text{ мг/л}$ пригнічувало ріст калюсу і регенерацію пагонів.

4. Комбінації регуляторів росту доцільно розробляти окремо для кожного зразка (сорту) льону звичайного окремо, оскільки здатність до калюсоутворення і органогенезу детермінована генетично.

АНОТАЦІЯ

Обґрунтовано питання оптимізації культури ізольованих клітин і тканин льону звичайного (*Linum usitatissimum* L. convar. *elongatum*) в умовах *in vitro*. Описано біологічні особливості виду, наукові досягнення щодо індукції калюсогенезу й органогенезу в умовах *in vitro*, узагальнено дослідження впливу цитокініну 6-бензиламінопурину й ауксинів 1-нафтилоцтової й індол-3-оцтової кислоти на інтенсивність протікання даних процесів і скринінгу генотипів. Зроблено висновок, що льон звичайний значною мірою здатний до утворення калюсу на гіпокотильних сегментах під впливом лише ауксинів, лише цитокінінів, комбінації ауксинів і цитокінінів. Комбінації регуляторів росту доцільно розробляти окремо для кожного зразка (сорту) окремо, оскільки здатність до калюсоутворення і органогенезу детермінована генетично.

Література

1. Оптасюк О. М., Шевера М. В. Рід *Linum* L. у флорі України. Київ : Альтерпрес, 2011. 276 с.
2. Зеленцов С. В., Зеленцов В. С., Мошненко Е. В., Рябенко Л. Г. Современные представления о филогенезе и таксономии рода *Linum* L. и льна обыкновенного (*Linum usitatissimum* L.). *Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИ масличных культур*. 2016. Вып. 1. С. 106–121.

3. Логінов М. І. Етапи розвитку та підсумки селекції льону-довгунця в Україні. *Збірник наукових праць Інституту луб'яних культур УААН*. 2007. Вип. 4. С. 64–69.
4. Кривошеєва Л. М. Вихідний матеріал льону-довгунця в селекції на якість волокна. *Луб'яні та технічні культури*. 2017. Вип. 5. С. 114–119.
5. Чучвага В. І, Кривошеєва Л. М. Імунологічний моніторинг різних груп стиглості сортів льону-довгунця в умовах північно-східного Полісся України. *Луб'яні та технічні культури*. 2019. Вип. 7. С. 42–45. DOI: 10.48096/btc.2019.7(12).42-45
6. Чучвага В. І, Кривошеєва Л. М. Методологічні аспекти вивчення стійкості сортів льону-довгунця до фузаріозу. *Луб'яні та технічні культури*. 2019. Вип. 7. С. 54–57. DOI: 10.48096/btc.2019.7(12).54-57
7. Шувар А. М. Залежність продуктивності льону-довгунця від застосування мікробних препаратів за умов органічного виробництва. *Луб'яні та технічні культури*. 2015. Вип. 4. С. 85–91.
8. Вишнівська Ю. С., Дрозд О. М., Лісовий О. Б. Вплив елементів технології вирощування на щільність посіву, урожайність насіння і волокна льону-довгунця. *Луб'яні та технічні культури*. 2017. Вип. 5. С. 157–162.
9. Поляков А. В. Биотехнология в селекции льна. Тверь, 2000. 180 с.
10. Evtimova M., Vlahova M., Atanassov A. Flax improvement by biotechnology means. *Journal of Natural Fibers*. 2005. Vol. 2, Iss. 2. P. 17–34. DOI: 10.1300/J395v02n02_02
11. Кубрак С. В., Шаптуренко М. Н. Изменчивость льна-долгунца (*Linum usitatissimum*) в культуре *in vitro* как источник получения новых селекционных форм. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя Біялагічных навук*. 2013. № 2. С. 36–40.
12. Міщенко С. В., Кривошеєва Л. М. Калюсогенез і органогенез в умовах *in vitro* різних зразків *Linum usitatissimum* L. *Генетичні ресурси рослин*. 2018. № 23. С. 49–58. DOI: 10.36814/pgr.2018.23.04
13. Міщенко С. В. Вплив 6-бензиламінопурину на інтенсивність калюсогенезу і органогенезу *Linum usitatissimum* L. в умовах *in vitro*. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*. 2019. Вип. 2 (47). С. 92–100. DOI: 10.35550/vbio2019.02.092
14. Mishchenko S. V., Kryvosheieva L. M. Callus formation, organogenesis and microclonal reproduction in different species of the genus *Linum* L. *in vitro*. *Plant Varieties Studying and Protection*.

2019. Vol. 15, No 2. P. 124–134. DOI: 10.21498/2518-1017.15.2.2019.173558
15. Mishchenko S., Kryvosheeva L. Possibility of reproduction of *Linum usitatissimum* L. from seeds with low germination and viability *in vitro* conditions. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*. 2019. No 3. P. 304–311. DOI: 10.15414/agrobiodiversity.2019.2585-8246.304-311
 16. Міщенко С. В. Вплив 1-нафтилоцтової та індол-3-оцтової кислоти на інтенсивність калюсогенезу і органогенезу *Linum usitatissimum* L. в умовах *in vitro*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2021. Т. 28. С. 100–105. DOI: 10.7124/FEEO.v28.1383
 17. Лен-долгунец / Дюев И. Ф. и др.; под. общ. ред. М. М. Труша. Москва : Колос, 1976. 352 с.
 18. Технічні культури (льон-довгунець, коноплі, кенаф, джут, канатник, тюпюн, махорка, хміль) / за ред. М. Г. Городнього. 2-ге вид. Київ : Урожай, 1969. 351 с.
 19. Лихочвор В. В. Рослинництво. Технології вирощування сільськогосподарських культур: навчальний посібник. 2-ге вид. Київ : Центр навчальної літератури, 2004. 808 с.
 20. Нечитайло В. А., Кучерява Л. Ф. Ботаніка. Вищі рослини: підручник. 2-ге вид. Київ : Фітосоціоцентр, 2005. 432 с.
 21. Рослинництво з основами технології переробки. Практикум: навчальний посібник / Мельник А. В. та ін.; за ред. А. В. Мельника, В. І. Троценка. Суми : Університетська книга, 2008. 384 с.
 22. Технічні культури: навчальний посібник / Жатов О. Г. та ін.; за ред. О. Г. Жатова, С. М. Каленської. Суми : Університетська книга, 2013. 359 с.
 23. Шиша Е. Н., Емец А. И., Гузенко Е. В. и др. Изучение регенерационной способности и корнеобразования у сортов льна-долгунца украинской и белорусской селекции. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2011. Т. 43, № 1. С. 57–64.
 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. *BioTechnologia*. 2012. Vol. 93, Iss. 2. P. 135–138. DOI: 10.5114/bta.2012.46578
 25. Siegień I., Adamczuk A., Wróblewska K. Light affects *in vitro* organogenesis of *Linum usitatissimum* L. and its cyanogenic potential. *Acta Physiol. Plant.* 2013. Vol. 35, Iss. 3. P. 781–789. DOI: 10.1007/s11738-012-1118-4

26. Mundhara R., Rashid A. TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedlings of *Linum*, putative role of ethylene in regeneration. *Plant Sci.* 2006. Vol. 170, Iss. 2. P. 185–190. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.06.015
27. Seta-Koselska A., Skórzyńska-Polit E. Optimization of *in vitro* culture conditions for obtaining flax (*Linum usitatissimum* L. cv. Modran) cell suspension culture. *BioTechnologia.* 2017. Vol. 98, Iss. 3. P. 183–188. DOI: 10.5114/bta.2017.70796
28. Tsygankova V. A., Bayer O. O., Andrusevich Ya. V. Et al. Screening of five and six-membered nitrogen-containing heterocyclic compounds as new effective stimulants of *Linum usitatissimum* L. organogenesis *in vitro*. *Int. J. Med. Biotechnol. Genetics.* 2016. S2:001. P. 1–9. DOI: 10.19070/2379-1020-SI02001
29. Yildiz M., Özgen M. The effect of a submersion pretreatment on *in vitro* explant growth and shoot regeneration from hypocotyls of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 2004. Vol. 77, Iss. 1. P. 111–115. DOI: 10.1023/B:TICU.0000016493.03592.c3
30. Yildiz M., Sağlık C., Telci C., Erkilich E. G. The effect of *in vitro* competition on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Linum usitatissimum*. *Turk. J. Bot.* 2011. Vol. 35, Iss. 2. P. 211–218. DOI: 10.3906/bot-1005-26
31. Beyaz R., Yildiz M. The effect of inter-plantal competition on *in vitro* seed germination and seedling growth in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Eskişehir Technical Univ. J. of Sci. and Tech. C – Life Sci. and Biotech.* 2019. Vol. 8, Iss. 1. P. 61–68. DOI: 10.18036/aubtdc.427128
32. Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J. Regeneration of flax (*Linum usitatissimum* L.) plants from anther culture and somatic tissue with increased resistance to *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell Rep.* 2003. Vol. 22, Iss. 2. P. 110–116. DOI: 10.1007/s00299-003-0662-1
33. Burbulis N., Blinstrubienė A., Sliesaravičius A., Venskutonienė E. Influence of genotype, growth regulators, sucrose level and preconditioning of donor plants on flax (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *Acta Biol. Hung.* 2005. Vol. 56, Iss. 3–4. P. 323–331. DOI: 10.1556/ABiol.56.2005.3-4.15
34. Burbulis N., Blinstrubienė A. Genotypic and exogenous factors affecting linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *J. Food Agricult. Environ.* 2011. Vol. 9, Iss. 3–4. P. 364–367. DOI: 10.1234/4.2011.2285

35. Burbulis N., Blinstrubienė A., Masiėnė R., Jonytienė V. Influence of genotype, growth regulators and sucrose concentration on linseed (*Linum usitatissimum* L.) anther culture. *J. Food Agric. Environ.* 2012. Vol. 10, Iss. 3–4. P. 764–767. DOI: 10.1234/4.2012.3509
36. Millam S., Davidson D., Powell W. The use of flax (*Linum usitatissimum*) as a model system for studies on organogenesis *in vitro*: the effect of different carbohydrates. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 1992. Vol. 28, Iss. 2. P. 163–166. DOI: 10.1007/BF00055512
37. Chen Y., Dribnenki P. Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. *Plant Cell Rep.* 2002. Vol. 21, Iss. 3. P. 204–207. DOI: 10.1007/s00299-002-0500-x
38. Сорока А. И. Особенности подготовки материала и культивирования *in vitro* пыльников льна при получении гаплоидных растений. *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки.* 2010. № 2. С. 13–19.
39. Obert B., Bartosova Z., Pretova A. Dihaploid production in flax by anther and ovary cultures. *Journal of Natural Fibers.* 2005. Vol. 1, Iss. 3. P. 1–14. DOI: 10.1300/J395v01n03_01
40. Sakhare S.P., Mendhulkar V.D. Embryo excised callus induction and rhizogenesis in *Linum usitatissimum* L. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2016. Vol. 7, Iss. 3. P. 507–511.
41. Blinstrubienė A., Burbulis N., Masiėnė R. Genotypic and exogenous factors affecting linseed ovary culture. *Zemdirbyste-Agriculture.* 2017. Vol. 104, No. 3. P. 243–248. DOI: 10.13080/z-a.2017.104.031
42. Anjum S., Abbasi B. H., Hano C. Trends in accumulation of pharmacologically important antioxidant-secondary metabolites in callus cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2017. Vol. 129, Iss. 1. P. 73–87. DOI: 10.1007/s11240-016-1158-3
43. Khan I., Khan M. A., Shehzad M. A. et al. Micropropagation and production of health promoting lignans in *Linum usitatissimum*. *Plants.* 2020, Vol. 9, Iss. 6. 728. DOI: 10.3390/plants9060728
44. Zahir A., Nadeem M., Ahmad W. et al. Chemogenic silver nanoparticles enhance lignans and neolignans in cell suspension cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2019. Vol. 136, Iss. 3. P. 589–596. DOI: 10.1007/s11240-018-01539-6
45. Bonell M., Lassaga S. L. Genetic analysis of the response of linseed (*Linum usitatissimum* L.) somatic tissue to *in vitro* cultivation. *Euphytica.* 2002. Vol. 125, Iss. 3. P. 367–372. DOI: 10.1023/A:1016013609068

46. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Information about the author:
Mishchenko Serhii Volodymyrovych,
Doctor of Agricultural Sciences,
Chief Researcher at the Department of Hemp Breeding
and Seed Growing
Institute of Bast Crops of the National Academy
of Agrarian Sciences of Ukraine
45, Tereshchenkiv Str., Hlukhiv, Sumy region, 41400, Ukraine