

DOI 10.35694/YARCX.2019.46.2.004



## СЕЛЕКТИВНАЯ СИСТЕМА *INVITRO* «ГРИБ *COLLETOTRICHUM LINI* – ЛЁН» КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ СОЗДАНИЯ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА, УСТОЙЧИВЫХ К АНТРАКНОЗУ

Н.В. Пролётова

к.б.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник лаборатории селекционных технологий ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», г. Торжок

**Лён, антракноз,  
устойчивость,  
селективный агент,  
культуральный  
фильтрат,  
аминокислоты,  
незрелый зародыш,  
каллус**

*Flax, anthracnose,  
resistance, selective agent,  
culture filtrate, amino acids,  
immature germ, callus*

Лён – ценнейшая техническая культура с расширенным ареалом произрастания. Однако почвенная патогенная микрофлора создаёт барьеры для выращивания льна с высококачественными параметрами льнопродукции. Современные сорта льна-долгунца являются устойчивыми к наиболее опасным болезням: ржавчине и фузариозному увяданию льна [1]. В то же время ежегодные изменения в ценозе болезней льна создают новые, оптимальные условия для их проявления, причём с различной степенью патогенности.

Антракноз льна до сих пор является широко распространённым и вредоносным заболеванием. До массового внедрения химических протравителей семян патоген являлся причиной гибели больших массивов льна в фазе всходов. С появлением эффективных протравителей вред от антракноза был снижен, однако протравливание семян сказывалось отрицательно на развитии молодых растений льна. Селекция на устойчивость могла бы снизить уровень заражения семян и сделать технологии возделывания льна более экологически чистыми. Задача повышения устойчивости может быть успешно решена лишь на основе интегрированного подхода к системе хозяин-паразит-среда [2, 3, 4]. Только в условиях инфекционного фона, в состав которого введён популяционный состав возбудителя, равный по качеству и количеству для всех испытуемых образцов, возможны дифференциация селекционного материала по степени устойчивости и проведение отбора по этому признаку [5, 6].

В биосистемах растений льна важную роль в регулировании устойчивости к фитопатогенам играют биотехнологические приёмы создания *invitro* новых, устойчивых генотипов. Поэтому цель постановки на исследования вопроса заключалась в разработке эффективной селективной системы *invitro* для создания устойчивых к антракнозу генотипов льна.

### **Материал и методы исследования**

В качестве объекта исследований были использованы сорта и линии льна культурного *Linum usitatissimum* L. Генотипы различались по устойчивости к антракнозу. Штаммы гриба, включённые в исследования, различались по вирулентности.

Л 1506-8-4, Л 957-8-7, Алексим, Зарянка, Росинка – линии и сорта долгунцового типа селекции Института льна с высоким проявлением

хозяйственно-ценных признаков, восприимчивые к антракнозу.

Пенджаб – сорт индийской селекции межеумочного типа, урожайный по семенам, восприимчив к антракнозу.

Эр. 130-3 – линия-донор, обладающая эффективными R-генами, позволяющая обеспечить высокую эффективность отбора на устойчивость к антракнозу в ранних поколениях, относительно устойчивая к антракнозу.

Штаммы 527, 680, 677\* – сильновирulentные штаммы возбудителя антракноза. Быстрорастущие, с обильным спороношением.

Штамм 674 – средневирulentный штамм возбудителя антракноза. Быстрорастущий, с обильным спороношением.

Штамм 602, 674\* – слабовирulentный штамм возбудителя антракноза. Быстрорастущий, с обильным спороношением.

Искусственная полевая популяция биообразцов возбудителя антракноза для заражения льна состояла на 50% из сильновирulentных штаммов (725, 726, 729, 730, 735, 739) и по 25% средне- (724, 737, 728, 724) и слабовирulentных (712, 714) штаммов.

Родительские формы высевали в сосудах Митчерлиха в вегетационном домике согласно методике Доспехова [7]. Размножение гибридного материала и семян чистых линий льна осуществляли на светоустановке (осенне-зимний период) и в условиях вегетационного домика (весенне-летний период).

Оценку растений-регенерантов и линий выполняли с использованием Методических рекомендаций по созданию, поддержанию, хранению и практическому использованию «Коллекции микроорганизмов возбудителей болезней льна» [8].

Интенсивность спороношения определяли в капле дистиллированной воды с помощью камеры Горяева под микроскопом МБИ-6. Количество спор в 1 см<sup>3</sup> рассчитывали по формуле:

$$N / 20 \cdot 10^6,$$

где N – количество спор в поле зрения микроскопа в камере Горяева.

Фитотоксические свойства культурального фильтрата (КФ) определяли путём замачивания в нём семян льна в течение 24 часов по методике Курчаковой [9].

### **Результаты и обсуждение**

Начальным этапом работы была наработка токсичного КФ гриба – возбудителя антракноза *Colletotrichum lini* Manns et Bolley, 527 и 602 штам-

мов. Мы проследили влияние минерального состава питательных сред Чапека и Sh-2 на продолжительность роста гриба на этих средах, на токсичность полученного КФ, и, как следствие, на возможность использования среды Sh-2 для наращивания биомассы возбудителя антракноза льна.

Наблюдения показали, что гриб хорошо развивался как на среде Чапека, так и на среде Sh-2. Культуральные фильтраты, полученные на основе этих сред, после 40 суток культивирования гриба обладали высокой токсичностью. При анализе проростков фиксировали стабильное снижение роста корешков, загнивание их кончика, угнетение и гибель проростков у восприимчивого к антракнозу образца Пенджаб (у 86,7–90,0% проростков) и у относительно устойчивой линии Эр. 130-3 (у 66,7–70,0 % проростков).

Отмечено повышение токсичности культуральных фильтратов на обеих средах в течение 40 суток с момента культивирования возбудителя антракноза. При более длительных сроках культивирования гриба токсичность фильтратов практически не изменялась. Вероятно, к 40 суткам запасы питательных веществ, находящихся в среде, были исчерпаны, и гриб не имел возможность продолжать рост и, как следствие – накапливать токсические метаболиты. Выделяемые в среду продукты жизнедеятельности были незначительные и не оказывали влияние на изменение токсичности КФ.

Решение вопроса о том, чем была вызвана токсичность КФ антракноза, привело к необходимости определения аминокислотного состава фильтрата в динамике. Проведённые исследования позволили установить наличие в нём таких аминокислот, как аланин, глицин, аспарагин, цистеин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, а также аргинин (у штамма 602). По мере роста мицелия гриба в КФ происходило снижение концентраций аланина, аспарагина, глицина, аспарагиновой и глютаминовой кислот, а к 23-м суткам культивирования наблюдали появление треонина – продукта метаболизма гриба. В то же время концентрация цистеина в КФ возрастала, и максимальной была у 40-суточного КФ. Эта аминокислота, являющаяся продуктом синтеза фенилаланина – сильнейший ингибитор роста растительных клеток. Поэтому, возможно, одним из слагающих токсичности является факт наличия данной аминокислоты.

В то же время присутствие таких аминокислот, как аспарагин, аланин, глицин, аспарагиновая и глютаминовая кислота, доказывают воз-

возможность индуцирования морфогенетической активности клеток льна-долгунца при соответствующем подборе оптимальных концентраций КФ в селективной среде.

В дальнейшем токсичный КФ вносили в среду Sh-2 на нулевом этапе селекции *in vitro* и в среду для субкультивирования каллуса. Было выявлено, что размах варьирования концентрации КФ зависит от величины первоначального экспланта льна.

При добавлении в среду Sh-2 КФ в концентрациях 0–20,0 мл/л, с целью последующего культивирования пыльников, наблюдали дифференцировку клеток пыльниковых эксплантов во всех вариантах, кроме варианта «20,0 мл/л». Это позволило выделить клеточные клоны, устойчивые к КФ в концентрациях 5,0; 10,0; 15,0 мл/л. Однако в клеточных колониях как восприимчивого сорта Пенджаб, так и устойчивой линии Эр 130-3, морфогенные очаги не формировались. При последующем субкультивировании клетки погибали даже на свободной от токсических метаболитов среде. При использовании в питательной среде КФ в концентрации 15,0 мл/л наблюдали индукцию дифференцировки клеток пыльников (по сравнению с контролем и другими вариантами). В этом варианте быстро формировался каллус и морфогенные очаги. Тем не менее, при последующих пересадках морфогенные свойства каллусов утрачивались. Вероятно, в селективных условиях клетки пыльников слишком уязвимы. Влияние продуктов метаболизма гриба на жизнедеятельность клеток пыльниковых эксплантов слишком большое. При использованных нами концентрациях культурального фильтрата интоксикация была слишком высокой. Патологический процесс гибели клеток запускался буквально с момента культивирования первичного экспланта. Поэтому мы решили использовать незрелые зародыши льна, как более защищённые.

Для культивирования незрелых зародышей на начальном этапе селекции в питательную среду Sh-2 добавляли 0; 4; 8; 12; ...; 44 мл/л культурального фильтрата (КФ). Использовали КФ, состоящий из смеси штаммов (два сильновирulentных и по одному средне- и слабовирulentному штамму), взятых в равных количествах (по 1 мл, по 2, 3, 4, 5, 6, ... 11 мл). После 10–14 суток инкубации незрелых зародышей наблюдалось появление двух типов структур – каллуса и (или) побегов. Стимулирование пролиферации каллуса было отмечено при концентрациях КФ 28; 32 и 36 мл/л. В этих вариантах формировались морфо-

генные каллусные очаги и стекловидные, слабохлорофильные побеги. Отобраны морфогенные колонии, устойчивые к действию КФ. На средах с более низкой концентрацией КФ (4; 8; 12; 16; 20; 24) наблюдалось стремительное нарастание водянистой клеточной биомассы, при этом морфогенные очаги не формировались, либо формировались в единичных количествах. В вариантах, где КФ добавляли в среду в количестве 40 и 44 мл/л, формировался твёрдый каллус без признаков морфогенеза.

На этапе субкультивирования каллуса использовали три концентрации КФ: 32; 36 и 40 мл/л, которые добавляли в среду Sh-2. В ходе исследований было выявлено, что первичная каллусная ткань, сформированная на селективной среде, обладала пролиферативной способностью и морфогенетической активностью, в отличие от каллусной ткани, сформированной на среде, свободной от КФ. Было отмечено некоторое (0–31%) ингибирование роста и развития каллуса на среде, содержащей 32 и 36 мл/л КФ. В этих вариантах были получены побеги, однако они были слаборазвитые и уродливые. В варианте использования КФ в концентрации 40 мл/л морфогенные участки не развивались, и клетки каллуса через неделю погибали.

Морфогенная каллусная ткань, перенесённая в дальнейшем на среду Sh-2, не содержащую КФ, продолжала развиваться и формировать морфогенные очаги. В них формировались побеги. В результате селекции были получены побеги льна и растения-регенеранты, устойчивые к культуральному фильтрату *in vitro*.

На этапе субкультивирования проявлялось влияние генотипа на потенции к морфогенезу в селективных условиях. Клетки генотипов Л 957-8-7, Алексим, Пенджаб, Зарянка обладали высокой морфогенетической активностью. В течение семи пассажей у них формировались морфогенные очаги, и были отобраны устойчивые к КФ клетки. Морфогенетический потенциал генотипов Л 1506-8-4, Росинка был исчерпан уже ко 2–3 пассажу.

При разработке схемы селекции льна *in vitro* на устойчивость к антракнозу с использованием эмбриокультуры было получено 86 побегов различной степени приживаемости.

Проверка полученных в ходе исследований растений-регенерантов на искусственном инфекционно-провокационном фоне показала, что генотипы различались по устойчивости. Наряду с устойчивыми и среднеустойчивыми к антракнозу

линиями (на уровне 50,0–75,0%) были и формы, восприимчивые к болезни (табл. 1). У устойчивых и среднеустойчивых генотипов параметры устойчивости были на 12,0–37% выше, чем у исходных

форм. Однако линии, проявившие вначале высокую устойчивость к антракнозу, в последующие годы снизили свою устойчивость на 10,0–50,0%. Линии же, характеризовавшиеся как среднеу-

Таблица 1 – Устойчивость к антракнозу некоторых линий льна, полученных при селекции *invitro* на инфекционно-провокационном фоне

Линия	Устойчивость, % ± Sp		
	1 год	2 год	3 год
НЭ-36	75±1,7	51,3±1,1	45±2,1
НЭ-17	57±2,2	39,2±3,1	48,3±2,7
НЭ-17-5	75±2,1	23,6±2,4	54,6±2,4
НЭ-17-2	57±3,2	34±2,2	36,6±2,8
НО-85	43,7±4,4	51±2,7	48,3±3,1
<b>НЭ-38</b>	<b>66,7±2,1</b>	<b>62,5±1,9</b>	<b>62,5±2,4</b>
НО-65	45±2,8	54,6±1,3	49±2,1
НЭ-36	75±1,4	48,3±3,4	62,5±2,1
НП-8	26,7±1,3	28,5±2,6	16,3±1,9
<b>НЭ-17</b>	<b>57±2,2</b>	<b>57,1±1,2</b>	<b>48,3±1,9</b>
НЭ-38-8	62,5±4,1	60±2,7	66,7±3,1
НО-65	45±3,4	48,3±2,1	45±3,2
НО-85	43,7±1,5	43±2,1	39±3,2
НЭ-17-5	75±2,4	62,5±1,9	58±1,7
НЭ-15	12,3±2,1	18,6±1,2	15,3±1,6
НП-16	6,3±1,1	10,3±2,1	6,3±1,9

стойчивые, повысили устойчивость на 2,2–26,8%. В течение последующих двух лет устойчивость к антракнозу у полученных линий была на уровне среднеустойчивых – устойчивых (50,0–62,0%). Ряд полученных линий, кроме устойчивости к антракнозу, характеризовались устойчивостью к ржавчине и фузариозному увяданию. Это связано с тем, что родительские формы в основном были высокоустойчивыми к этим возбудителям.

При оценке хозяйственно ценных признаков у выделенных линий было выявлено, что все они в основном несколько уступают исходным формам. В то же время у ряда линий некоторые показатели (высота растения, масса технической части стебля, количество семян с одного растения, содержание волокна) превосходили сорт-стандарт Алексим на 1–38,9%.

Согласно полученным данным, приобретённые изменения носили относительно стабильный характер. Возможно, это было связано с различной по годам инфекционной нагрузкой в

инфекционно-провокационном питомнике (годы значительно различались по метеоусловиям в период вегетации льна при проявлении болезни).

### **Выводы**

Таким образом, созданные нами селективные условия *invitro* были эффективны при селекции льна-долгунца на устойчивость к антракнозу и позволили получить формы, более устойчивые к болезни, чем исходные.

В культуральных фильтратах исследуемых штаммов возбудителя антракноза установлено наличие аминокислот: аланин, глицин, аспарагин, цистеин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, треонин. Сделано предположение о взаимосвязи между присутствием в культуральных фильтратах аминокислоты цистеина и токсичностью.

Выявлена зависимость отзывчивости клеток льна на присутствие в среде продуктов жизнедеятельности гриба – возбудителя антракноза от

величины экспланта. Клетки пыльников в селективных условиях были более уязвимы, чем клетки незрелых зародышей.

Выявлено влияние генотипа льна на потенции клеток к морфогенезу в селективных условиях. Клетки генотипов Л 957-8-7, Алексим, Пенджаб, Зарянка обладали высокой морфогенетической активностью. Морфогенетический потенциал ге-

нотипов Л 1506-8-4, Росинка был исчерпан уже ко 2–3 пассажу. Проверка полученных в ходе исследований растений-регенерантов на искусственном инфекционно-провокационном фоне показала, что генотипы различались по устойчивости. У устойчивых и среднеустойчивых генотипов параметры устойчивости были на 12,0–37% выше, чем у исходных форм.

### Литература

1. Павлова, Л.Н. Инновации в селекции льна-долгунца [Текст] / Л.Н. Павлова, Е.Г. Герасимова, В.Н. Румянцева // Инновационные разработки производства и переработки лубяных культур: материалы Международ. науч.-практ. конф. – Тверь: Твер. гос. ун-т, 2016. – С. 46–49.
2. Кудрявцева, Л.П. Методологическое обеспечение селекции льна на устойчивость к антракнозу [Текст] / Л.П. Кудрявцева, Н.В. Пролётова // Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском хозяйстве России, СНГ и ЕС: материалы докладов, сообщений Международ. науч.-практ. конф. (9–12 августа 2016 г.). – М., 2016. – Т. 2. – С. 149–158.
3. Алырчиков, Ф.В. Агротомическая и организационно-экономическая разработка способов применения средств, снижающих проявление сорняков и болезней в посевах льна, как элементов технологии его возделывания в Центральном Федеральном округе РФ [Текст] / Ф.В. Алырчиков, О.А. Савоськина, Н.А. Кудрявцев, Л.А. Зайцева // АгроЭкоИнфо. – 2018. – № 1 (31). – С. 3.
4. Пролётова, Н.В. Повышение устойчивости льна-долгунца к антракнозу (*Colletotrichum lini* Manns et Volley) методами *in vitro*. Масличные культуры [Текст] / Н.В. Пролётова // Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2018. – № 3 (175). – С. 128–131.
5. Пролётова, Н.В. Создание *in vitro* новых, устойчивых к болезням сортов льна – один из способов повышения биоразнообразия культуры [Текст] / Н.В. Пролётова, Л.П. Кудрявцева // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты): материалы VII международ. науч.-практич. конф., посвящ. 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада. – Ялта, Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2016. – С. 50–51.
6. Чекалин, Н.М. Генетические основы селекции зернобобовых культур на устойчивость к патогенам [Текст] / Н.М. Чекалин. – Полтава: Изд-во «Интерграфика», 2003. – 186 с.
7. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований) [Текст] / Б.А. Доспехов. – Изд. 5-е, перераб. и доп. – М.: «Агропромиздат», 1985. – 351 с. с иллюстр.
8. Методические рекомендации по созданию, поддержанию, хранению и практическому использованию «Коллекции микроорганизмов возбудителей болезней льна» [Текст]. – Торжок, 2006. – 10 с.
9. Курчакова, Л.Н. Методика получения культуральных фильтратов гриба *Fusarium oxysporum* и *F. semitectum* и их применение в культуре *in vitro* для получения фузариозоустойчивых форм льна-долгунца [Текст] / Л.Н. Курчакова // Сб. науч. тр. ВНИИЛ, Вып. 28–29. – Торжок, 1994. – С. 127–128.

### References

1. Pavlova, L.N. Innovacii v selekcii l'na-dolgunca [Tekst] / L.N. Pavlova, E.G. Gerasimova, V.N. Rummyantseva // Innovacionnyye razrabotki proizvodstva i pererabotki lubjanyh kul'tur: materialy Mezhdunarod. nauch.-prakt. konf. – Tver': Tver. gos. un-t, 2016. – S. 46–49.
2. Kudryavtseva, L.P. Metodologicheskoe obespechenie selekcii l'na na ustojchivost' k antraknozu [Tekst] / L.P. Kudryavtseva, N.V. Proletova // Fundamental'nye i prikladnye issledovanija v bioorganicheskom sel'skom hozjajstve Rossii, SNG i ES: materialy dokladov, soobshhenij Mezhdunarod. nauch.-prakt. konf. (9–12 avgusta 2016 g.). – M., 2016. – T. 2. – S. 149–158.
3. Alyrchikov, F.V. Agronomicheskaja i organizacionno-jekonomicheskaja razrabotka sposobov primenenija sredstv, snizhajushhijh pojavlenie sornjakov i boleznej v posevah l'na, kak jelementov tehnologii ego vzdelyvanija v Central'nom Federal'nom okruge RF [Tekst] / F.V. Alyrchikov, O.A. Savos'kina, N.A. Kudryavtsev, L.A. Zajtseva // AgroJekolInfo. – 2018. – № 1 (31). – S. 3.

4. Proletova, N.V. Povyshenie ustojchivosti l'na-dolgunca k antraknozu (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) metodami invitro. Maslichnye kul'tury [Tekst] / N.V. Proletova // Nauchno-tehnicheskij bjulleten' Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnyh kul'tur. – 2018. – № 3 (175). – S. 128–131.

5. Proletova, N.V. Sozdanie invitro novyh, ustojchivyh k boleznyam sortov l'na – odin iz sposobov povyshenija bioraznoobrazija kul'tury [Tekst] / N.V. Proletova, L.P. Kudryavtseva // Biotehnologija kak instrument sohraneniya bioraznoobrazija rastitel'nogo mira (fiziologo-biohimicheskie, jembriologicheskie, geneticheskie i pravovye aspekty): materialy VII mezhdunarod. nauch.-praktich. konf., posvjashh. 30-letiju otdela biotehnologii rastenij Nikitskogo botanicheskogo sada. – Jalta, Simferopol': IT «ARIAL», 2016. – S. 50–51.

6. Chekalin, N.M. Geneticheskie osnovy selekcii zernobobovyh kul'tur na ustojchivost' k patogenam [Tekst] / N.M. Chekalin. – Poltava: Izd-vo «Intergrafika», 2003. – 186 s.

7. Dospikhov, B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovanij) [Tekst] / B.A. Dospikhov. – Izd. 5-e, pererab. i dop. – M.: «Agropromizdat», 1985. – 351 s. s illjustr.

8. Metodicheskie rekomendacii po sozdaniyu, podderzhaniju, hraneniju i prakticheskomu ispol'zovaniju «Kollekcii mikroorganizmov vzbuditelej boleznej l'na» [Tekst]. – Torzhok, 2006. – 10 s.

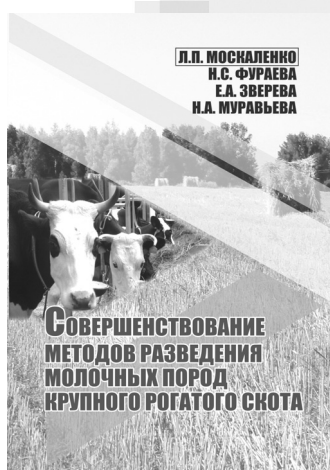
9. Kurchakova, L.N. Metodika poluchenija kul'tural'nyh fil'tratov griba *Fusarium oxysporum* i *F. semitectum* i ih primenenie v kul'ture invitro dlja poluchenija fuzariozoustojchivyh form l'na-dolgunca [Tekst] / L.N. Kurchakova // Sb. nauch. tr. VNIL, Vyp. 28–29. – Torzhok, 1994. – S. 127–128.

## ОБЪЯВЛЕНИЕ

В издательстве ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА в 2018 году  
вышла монография

**Л.П. МОСКАЛЕНКО, Н.С. ФУРАЕВОЙ, Е.А. ЗВЕРЕВОЙ, Н.А. МУРАВЬЕВОЙ**

### «СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ РАЗВЕДЕНИЯ МОЛОЧНЫХ ПОРОД КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА»



Авторами рассмотрено состояние молочного скотоводства в Ярославской области, исследована и обобщена эффективность использования голштинской породы для совершенствования племенных и продуктивных качеств животных, изучена и усовершенствована генеалогическая структура молочных пород скота, установлены факторы, влияющие на молочную продуктивность активной части популяции.

Монография предназначена для научных работников, аспирантов и студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений, специалистов агропромышленного комплекса.

**УДК 636.2.084.1; ББК 45.3; ISBN 978-5-98914-206-4; 304 стр.**

**ПО ВОПРОСАМ ПРИОБРЕТЕНИЯ ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ:  
150042, г. Ярославль, Тутаевское шоссе, 58, ФГБОУ ВО Ярославская ГСХА**

**e-mail: e.bogoslovskaya@yarcx.ru**