

УДК 633.521:631.52:632.4

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-341-9-88-94>

Тип статьи: Оригинальное исследование

Type of article: Original research

Пролётова Н.В.ФГБНУ «Федеральный научный центр
лубяных культур»

Торжок, Россия

E-mail: natalajprjotva@rambler.ru

Ключевые слова: лен, антракноз,
устойчивость, селективный агент,
культуральный фильтрат, аминокислоты.**Для цитирования:** Пролётова Н.В.
Аминокислоты культуральных фильтратов
штаммов возбудителя антракноза льна
как источники тормоза или индукции
морфогенеза льна in vitro. *Аграрная наука.*
2020; 341 (9): 88–94.<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-341-9-88-94>**Конфликт интересов отсутствует****Natalya V. Proletova**Federal Scientific Center of Fiber Crops
Breeding

Torzhok, Russia

Key words: flax; anthracnose; sustainability;
selective agent; culture filtrate; amino acids.**For citation:** Proletova N.V. Amino acids
of cultural filtrates of strains antraknosis
as sources of brake or induction of flax
morphogenesis in vitro. *Agrarian Science.*
2020; 341 (9): 88–94. (In Russ.)<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-341-9-88-94>**There is no conflict of interests**

Аминокислоты культуральных фильтратов штаммов возбудителя антракноза льна как источники тормоза или индукции морфогенеза льна *in vitro*

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Цель работы — определение аминокислотного состава культуральных фильтратов штаммов возбудителя антракноза льна *Colletotrichum lini* Manns et Bolley для корректировки концентрации селективного агента в питательной среде при создании *in vitro* новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу.**Результаты.** Установлено, что в культуральных фильтратах штаммов 527 и 608 присутствуют аминокислоты аланин, глицин, аспарагин, цистеин, треонин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, а также аргинин — у сильновирulentного штамма 527 и следы тирозина и лизина — слабовирulentного штамма 608. К 40 суткам культивирования запас питательных веществ в среде культивирования, по-видимому, был исчерпан, и для жизнеобеспечения гриб начал использовать продукты своей жизнедеятельности. В культуральном фильтрате сильновирulentного штамма 527 концентрация всех определённых аминокислот была значительно выше, чем в культуральном фильтрате слабовирulentного 608 штамма. Показано, что наибольшей токсичностью обладал 23-суточный культуральный фильтрат сильновирulentного штамма 527. Прирост корешков и гипокотилей льна при использовании культурального фильтрата сильновирulentного штамма 527 был меньшим у всех генотипов, взятых в исследования. Токсичность культурального фильтрата зависела от вирулентности штамма возбудителя антракноза — культуральный фильтрат сильновирulentного штамма более токсичен, чем слабовирulentного штамма. Присутствие цистеина в культуральных фильтратах штаммов повышает возможность ингибирования роста и развития клеток льна в культуре *in vitro*. При использовании культурального фильтрата штаммов возбудителя антракноза, содержащего аспарагин, глутамин, серин, глицин, аспарагиновая и глютаминовая кислоты, существует возможность индуцирования роста и развития клеток льна в условиях *in vitro*. По мере роста мицелия гриба в культуральных фильтратах происходило снижение концентраций аминокислот аланина, аспарагина, глицина, аспарагиновой и глютаминовой кислот. Из-за высокой концентрации цистеина и тирозина культуральные фильтраты штаммов 419 и 639 были токсичными в течение всего периода исследований (до 42 суток).

Amino acids of cultural filtrates of strains antraknosis as sources of brake or induction of flax morphogenesis *in vitro*

ABSTRACT

Relevance. The aim of the work was to determine the amino acid composition of the culture filtrates of the strains, the causative agent of flax anthracnose *Colletotrichum lini* Manns et Bolley, to adjust the concentration of the selective agent in the nutrient medium when creating *in vitro* new flax genotypes resistant to anthracnose.**Results.** It was established that in the culture filtrates of strains 527 and 608 there are amino acids alanine, glycine, asparagine, cysteine, threonine, aspartic acid, glutamic acid, as well as arginine in the highly virulent strain 527 and traces of tyrosine and lysine in the weakly virulent strain 608. К 40 days of cultivation, the supply of nutrients in the cultivation medium, apparently, was exhausted, and for life support the fungus began to use the products of its vital functions. In the culture filtrate of the highly virulent strain 527, the concentration of all defined amino acids was significantly higher than in the culture filtrate of the weakly virulent 608 strain. It was shown that the 23-day-old culture filtrate of the strongly virulent strain 527 had the highest toxicity. The increase in the roots and hypocotyl of flax when using the culture filtrate of the strongly virulent strain 527 was smaller in all genotypes taken in the study. The toxicity of the culture filtrate depended on the virulence of the anthracnose pathogen strain — the culture filtrate of a strongly virulent strain is more toxic than a weakly virulent strain. The presence of cysteine in the culture filtrates of the strains increases the possibility of inhibiting the growth and development of flax cells in an *in vitro* culture. When using a culture filtrate of anthracnose pathogen strains containing asparagine, glutamine, serine, glycine, aspartic and glutamic acid, it is possible to induce the growth and development of flax cells *in vitro*. As the fungal mycelium grew in the culture filtrates, the concentrations of amino acids alanine, asparagine, glycine, aspartic and glutamic acids decreased. Due to the high concentration of cysteine and tyrosine, the culture filtrates of strains 419 and 639 were toxic throughout the study period (up to 42 days).

Поступила: 15 июля

После доработки: 31 июля

Принята к публикации: 10 сентября

Received: 15 July

Revised: 31 July

Accepted: 10 September

Введение

Одним из лимитирующих факторов возделывания льна является поражаемость патогенами. Из комплекса болезней, поражающихся на культуре, вредоносной является антракноз — болезнь, которую вызывает несовершенный гриб *Colletotrichum lini*. Возбудитель поражает всходы, листья, стебли, коробочки и семена в течение всего вегетационного периода с разной интенсивностью поражения. Выжившие растения отстают в росте. Это снижает урожайность и затрудняет механизированную уборку. При сильном развитии инфекции недобор льноволокна достигает 30%. Кроме того, всхожесть семян, собранных с инфицированных растений, гораздо ниже, чем у здоровых. Солома пораженных растений легкая и ломкая, волокно низкого качества. Агрессивность возбудителя антракноза объясняется высокой воспроизводимостью патогена [1, 2, 3].

В настоящее время проблема устойчивости льна к антракнозу приобретает все большее значение, так как в производственных условиях потери от проявления болезни составляют 30–35%. Протравливание семян химическими средствами создает дополнительную экологическую нагрузку и приводит к снижению ареала использования льнопродукции. Одним из путей решения данной проблемы является создание новых, устойчивых к антракнозу сортов льна селекционными методами, в том числе с использованием биотехнологических приемов. Актуальным является получение нового селекционного материала льна с использованием селективных систем *in vitro*, имитирующих искусственный инфекционный фон, что обеспечивает экспрессию генов устойчивости и дает возможность отбирать нужные варианты. Селективные агенты вносят на этапах пролиферации и морфогенеза каллусной ткани раздельно и в различных комбинациях для создания форм — соматоклонов, устойчивых к патогену [4]. Подобные инновационные способы позволяют вести *in vitro* отбор растений, устойчивых к антракнозу, уменьшают физические объемы экспериментального материала, трудозатраты и значительно сокращают сроки получения новых высокопродуктивных сортов. В качестве селективного агента при селекции *in vitro* на устойчивость к антракнозу используют культуральные фильтраты штаммов патогена [5]. Как штаммы возбудителя различаются между собой, так и культуральные фильтраты, полученные на основе этих штаммов, отличаются друг от друга. Характеристика

культуральных фильтратов во многом зависит от вирулентности используемого штамма, скорости формирования спор и выделения продуктов жизнедеятельности в среду культивирования. Поэтому решение вопроса о структуре метаболитов штаммов гриба, продуцируемых его клетками в среду культивирования, токсичности такой среды для клеток льна, привело к необходимости определения аминокислотного состава культурального фильтрата и содержания в нём белков в динамике.

Методика

Исследования проводили на базе лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института льна (ВНИИЛ) в 2010–2018 годах. В качестве объекта исследования в эксперименте использовали несколько штаммов возбудителя антракноза *Colletotrichum lini* Manns et Bolley. Штаммы любезно предоставлены сотрудниками лаборатории иммунитета ВНИИЛ из коллекции микроорганизмов — возбудителей болезней льна. Штаммы 527, 639 — сильновирulentные штаммы возбудителя антракноза, быстрорастущие, с обильным спороношением. Штамм 419 — средневирулентный штамм возбудителя антракноза, быстрорастущий, с обильным спороношением. Штамм 608 — слабовирулентный штамм возбудителя антракноза, быстрорастущий, с обильным спороношением.

Сорта льна — Пенджаб, Алексим и селекционные линии — Л 957-8-4, Л 1506-8-4, использованные в исследованиях, любезно предоставлены сотрудниками лаборатории селекции ВНИИЛ, характеризовались высокими показателями хозяйственно ценных признаков, восприимчивостью к антракнозу.

Схема проведения исследований включала следующие этапы.

Культивирование мицелия гриба на жидкой среде Sh-2, не содержащей регуляторы роста, в течение 50 суток (рис. 1). Использовали модифицированную методику Проценко М.А. с соавторами [6]. Интенсивность спороношения биообразцов определяли в капле дистиллированной воды с помощью камеры Горяева под микроскопом МБИ-6. Количество спор в 1 см³ рассчитывали по формуле: $N/20 \cdot 10^6$, где N — количество конидий в поле зрения микроскопа в камере Горяева.

Определение аминокислотного состава культурального фильтрата (КФ) штаммов 608, 527 на 9, 23, 40 суток. Аминокислотный состав КФ определяли методом бумажной хроматографии [7].

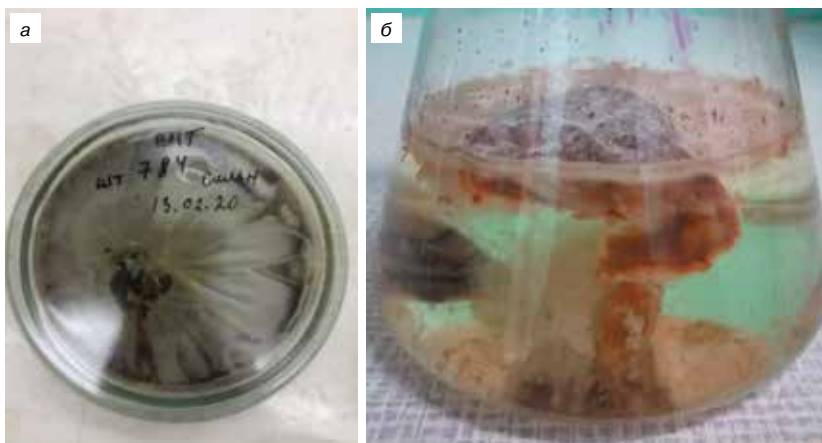
Определение оптической плотности культуральных фильтратов штаммов 419 и 639 на 7, 14, 23, 30, 40, 50 суток. Оптическую плотность КФ штаммов определяли по методу биуретовой реакции, основанном на образовании биуретового комплекса пептидных связей белков с двухвалентными ионами меди [7].

Визуальная оценка прироста биомассы гриба-возбудителя антракноза на 7, 14, 23, 33, 40 и 50 суток и определение токсичности культурального фильтрата. Фитотоксические свойства КФ определяли путём проращивания на нём семян по методике Курчаковой [8]. Контроль — проращивание семян льна на воде.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью паке-

Рис. 1. Рост мицелия возбудителя антракноза: а — на твердой питательной среде; б — на жидкой питательной среде

Fig. 1. Growth of the mycelium of the causative agent of anthracnose: a — on a solid nutrient medium; b — on a liquid nutrient medium



та программ Microsoft Excel, с использованием метода первичной статистической обработки результатов эксперимента — определения выборочной средней величины.

Результаты и обсуждение

Антракноз — болезнь льна, широко распространена в его посевах. Встречается ежегодно. Во время всходов льна сильное поражение посевов данным патогеном вызывает изреживание стеблестоя, а иногда и полную гибель растений. Известно, что грибы рода *Colletotrichum* продуцируют разнообразные по химической структуре метаболиты с широким спектром биологической активности, среди которых выявлены вещества с антимикробными, цитотоксическими, антиоксидантными, гормоноподобными и фитотоксическими свойствами. Набор биологически активных соединений, известных у грибов рода *Colletotrichum*, не столь широк, как, например, у фитопатогенных грибов из родов *Alternaria*, *Fusarium* и *Phoma*. Ни один представитель рода *Colletotrichum* не отнесен к токсигенным видам [9, 10, 11]. Те токсины, которые продуцирует гриб — возбудитель болезни, влияют на жизнедеятельность клеток и тканей льна и способствуют возникновению угнетений с последующим снижением продуктивности растений льна [12]. Возбудитель антракноза льна *Colletotrichum Lini* Manns et Bolley относится к группе несовершенных грибов, порядку спородохизальные, роду *Colletotrichum*. В процессе своего развития гриб формирует под кутикулой спороложка, в которых образуются щетинки и короткие конидиеносцы. По мере роста щетинок и конидиеносцев эпидермис прорывается, и конидиеносцы выносят конидии наружу [10]. Половая стадия у *C. Lini* не обнаружена, отмечено явление гетерокариозиса. Гриб образует одноклеточные гаплоидные конидии — оранжевые, желтоватые, красноватые или бесцветные с капельками жира внутри; продолговато цилиндрические, слабо изогнутые или прямые, с закруглёнными концами. Размер конидий 14,3–21, 4х2, 9–5,7 мкм. Щетинки с 2–3 перегородками, кверху утончающиеся, длиной 64,3–157,3 мкм, толщиной у основания 2,9–7,1 мкм. Мицелий членистый, бесцветный, позднее буреет. Образует ложа (плотные сплетения гиф) размером до 200 мкм с массой конидий. Ложа могут иметь щетинки. Гриб в виде высохших лож может переносить повышенные температуры, кратковременную дезинфекцию спиртом, не теряя своей жизнеспособности [2, 10]. Возбудители антракноза сохраняют свою жизнеспособность пять–шесть лет.

Важная роль в повышении эффективности создания новых сортов льна, устойчивых к антракнозу, принадлежит биотехнологическим методам. Для получения *in vitro* новых, устойчивых к антракнозу форм льна в исследованиях используют культуральный фильтрат штаммов патогена. Токсичность культурального фильтрата связана с содержанием в нём веществ, ингибирующих рост и развитие клеток льна. Для определения таковых мы изучили аминокислотный состав культуральных фильтратов штаммов

кислотный состав культуральных фильтратов штаммов, используемых в исследованиях.

На начальном этапе в культуральных фильтратах штаммов 527 и 608 определяли аминокислоты методом распределительной восходящей бумажной хроматографии. В результате исследований установлено, что в культуральных фильтратах исследуемых штаммов 527 и 608 присутствуют такие аминокислоты, как аланин, глицин, аспарагин, цистеин, треонин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, а также аргинин — у сильновирulentного штамма 527 и следы тирозина и лизина — у слабовирulentного штамма 608 (табл. 1).

Выявленные аминокислоты имеют различные характеристики. Некоторые из них способствуют ингибированию растительных клеток, тогда как другие, наоборот, индуцируют иммунитет, рост и развитие клеток льна. Поэтому возникло предположение, что культуральный фильтрат возбудителя антракноза можно использовать как селективный фактор, так и как стимулирующий морфогенез. Это зависит от характеристики штаммов антракноза, длительности их культивирования на питательной среде, концентрации культурального фильтрата в питательной среде.

Анализ динамики роста мицелия гриба — возбудителя антракноза льна на жидкой питательной среде показал, что концентрация таких аминокислот, как аланин, глицин, треонин, цистеин в культуральных фильтратах обоих штаммов (сильновирulentного штамма 527 и слабовирulentного, 608) повышалась в течение всего периода культивирования. Содержание аспарагина, аспарагиновой и глутаминовой кислот в КФ штамма 608 к 40 суткам культивирования мицелия гриба снижалось. Видимо, к этому сроку клеткам мицелия для продолжения роста и развития требовались аминокислоты, которые до этого они продуцировали и выделяли в среду культивирования. К 40 суткам культивирования запас питательных веществ в среде, по-видимому, был исчерпан, и для жизнеобеспечения гриб начал использовать продукты своей жизнедеятельности.

В результате исследований выявлено, что в КФ сильновирulentного штамма 527 концентрация всех опре-

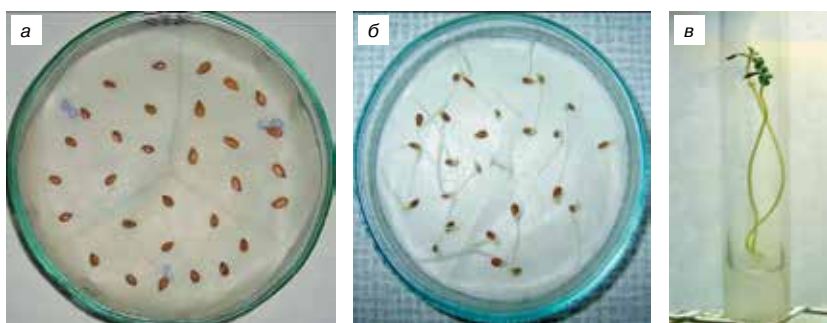
Таблица 1. Аминокислотный состав культуральных фильтратов штаммов возбудителя антракноза льна *Colletotrichum lini*

Table 1. Amino acid composition of the culture filtrates of the flax anthracnose pathogen *Colletotrichum lini*

Аминокислота	Концентрация, мкг/л				
	Штамм 608			Штамм 527	
	9 сутки	23 сутки	40 сутки	9 сутки	23 сутки
Аргинин	-	-	-	14,1	2,9
Аланин	1,8	2,6	3,5	7,5	13,1
Глицин	11,0	4,5	19,0	12,2	24,3
Треонин	0,3	1,1	7,0	0,8	1,9
Аспарагин	3,4	3,2	1,1	3,8	4,2
Цистеин	2,5	2,8	18,1	13,7	26,2
Аспарагиновая кислота	3,3	9,1	4,0	3,6	9,1
Глутаминовая кислота	11,5	10,0	4,0	2,0	4,2
Тирозин			следы		
Лизин			следы		

Рис. 1. Проращивание семян льна селекционной линии Л 957-8-4 на фильтровальной бумаге, смоченной КФ (а, б) и селективной среде, содержащей КФ возбудителя антракноза (в): а — подготовленные семена льна; б — пророщенные семена льна на 8 сутки; в — гипокотели льна на 8 сутки

Fig. 1. Germination of flax seeds of the selection line L 957-8-4 on filter paper moistened with CF (a, b) and a selective medium containing CF of the anthracnose pathogen (c): a — prepared flax seeds, b — germinated flax seeds for 8 day, c — flax hypocotels for 8 days



делённых аминокислот была значительно выше, чем в КФ слабовирулентного 608 штамма. На 23 сутки отмечено, что в КФ сильновирулентного штамма 527 содержание цистеина в 9,4 раза выше (26,2 и 2,8 мкг/л, соответственно), а глицина — в 5,4 раза выше (24,3 и 4,5 мкг/л, соответственно), чем в КФ слабовирулентного штамма 608. То есть сильновирулентный штамм к 23 суткам продуцирует и выделяет в КФ цистеин, который является сильнейшим ингибитором роста растительных клеток, гораздо больше, чем слабовирулентный штамм, что способствует повышению токсичности КФ. В то же

время концентрация глицина, способствующего росту клеток льна *in vitro*, так же выше у сильновирулентного штамма, чем у слабовирулентного. Это, в свою очередь, повышает возможность индуцирования роста и развития клеток льна *in vitro*. Токсичность полученных культуральных фильтратов оценивали по длине корешка проростков и гипокотелей четырех генотипов льна путем проращивания семян льна на фильтровальной бумаге, смоченной КФ, и на селективной среде, содержащей КФ штаммов возбудителя антракноза (рис. 2).

Анализ токсичности культуральных фильтратов в период роста мицелия гриба показал, что наибольшей токсичностью обладал 23-суточный КФ сильновирулентного штамма 527 (табл. 2). Прирост корешков и гипокотилей льна при использовании КФ сильновирулентного штамма 527 был меньшим у всех генотипов, взятых в исследования. Так, например, у генотипа Пенджаб при анализе на 15 сутки средней длины корешка (проращивание семян на фильтровальной бумаге, смоченной КФ) установлено, что у КФ штамма 608 (слабовирулентного) эта величина составила 20,9% к контролю (16,3 мм), у КФ штамма 527 (сильновирулентного) — 17% (13,3 мм). У генотипа Л 957-8-4 этот показатель составил, соответ-

Таблица 2. Влияние 23-суточного КФ штаммов возбудителя антракноза льна *Colletotrichum lini* на величину проростков

Table 2. Influence of 23-day CF of flax anthracnose pathogen *Colletotrichum lini* strains on the size of seedlings

Генотип льна	Средняя длина корешка, мм ± Sp						Средняя длина гипокотеля, мм ± Sp					
	3 сутки	% к контролю	8 сутки	% к контролю	15 сутки	% к контролю	3 сутки	% к контролю	8 сутки	% к контролю	15 сутки	% к контролю
Пенджаб — КФ штамма 608	1±0,1	12,5	7,1 ±0,2	23,7	16,3±0,16	20,9	0	0	1±0,2	12,5	23±0,4	29,1
Пенджаб — КФ штамма 527	1±0,08	12,5	4,9±0,16	16,3	13,3±0,2	17	0	0	1±0,17	12,5	11,9 ±0,22	14,4
Алексим — КФ штамма 608	2±0,1	19,4	8,1±0,1	20,3	13±0,17	21,5	7,1	10,8±0,1	34,4±0,22	39,8	2±0,13	19,4
Алексим — КФ штамма 527	1,2±0,15	11,7	6,2±0,06	15,5	10,8±0,1	17,9	4,4	6,7±0,1	18,9±0,24	21,9	1,2±0,08	11,7
Л 957–8-4 — КФ штамма 608	0,7±0,22	25	4,3±0,2	23,5	7,8±0,2	22,3	10	25,3±0,12	12,5±0,15	24,4	0,7±0,16	25
Л 957–8-4 — КФ штамма 527	0,5±0,03	17,9	3,7±0,17	20,2	7,4±0,13	19,5	2,9	7,3±0,08	12,4±0,13	20,8	0,5±0,15	17,9
Л 1506–8-4 — КФ штамма 608	0,8±0,1	8,2	4,8±0,12	13	9,5±0,22	13,8	3,3	6,5±0,03	11,7±0,14	15,1	0,8±0,15	8,2
Л 1506–8-4 — КФ штамма 527	0,7±0,05	7,5	3,4±0,15	9,3	7, ±0,22	10,4	0	0	8,9±0,2	11,5	0,7±0,12	7,5

ственно, 22,3% (7,8 мм) — у КФ штамма 608, 19,5% (7,4 мм) — у КФ штамма 527. При анализе средней длины гипокотыля (проращивание семян льна на селективной среде, содержащей КФ) у всех генотипов, взятых в исследование, эта величина была выше у КФ слабовирулентного штамма (29,1% — у сорта Пенджаб, 19,4% — у сорта Алексим, 25% — у линии Л 957-8-4, 8,2% — у линии Л 1506-8-4). В то время как на селективной среде, содержащей КФ сильновирулентного штамма 527 средняя длина гипокотыля была ниже (14,4%; 11,7%; 17,9%; 7,5%, соответственно). Это подтверждает, что КФ сильновирулентного штамма обладал большей токсичностью, чем КФ слабовирулентного штамма.

Исходя из полученных данных следует, что токсичность культурального фильтрата зависела от вирулентности штамма возбудителя антракноза — КФ сильновирулентного штамма более токсичен, чем КФ слабовирулентного штамма, и возможно, одним из слагающих токсичности является наличие аминокислоты — цистеина, отличающейся высокой реакционной способностью и тирозина.

На следующем этапе для определения оптической плотности КФ использовали штаммы 419 и 639. В результате исследований выявлено, что на 7 сутки культивирования мицелия возбудителя антракноза в КФ определяется цистеин. Молярная концентрация цистеина в КФ средневирулентного штамма 419 составила $C = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, m (цистеина) = $C \cdot V \cdot M = 1,25 \cdot 10^{-4}$ г. Концентрация цистеина была практически в 15 раз выше — $C = 3,2 \cdot 10^{-2}$ моль/л, m (цистеина) = $1,9 \cdot 10^{-3}$ г в КФ сильновирулентного штамма 639. При определении токсичности КФ установлено, что проращиваемые семена льна имели наименьший прирост корешков, находясь на фильтровальной бумаге, смоченной культуральным фильтратом сильновирулентного штамма 639. Следовательно, его токсичность была выше, чем КФ средневирулентного штамма 419. Концентрация цистеина в КФ повышалась у обоих штаммов с 21-суток культивирования и к 42-м суткам культивирования была наибольшей. Высокая реакционная способность сульфгидрильной группы является характерной особенностью химического строения цистеина [13]. Следовательно, присутствие цистеина в культуральных фильтратах штаммов гриба — возбудителя антракноза льна — повышает возможность ингибирования роста и развития клеток льна в культуре *in vitro*.

Присутствие серина в КФ 419 и 639 установлено на 14 сутки культивирования гриба на питательной среде. Концентрация серина в КФ штамма 419 составила $C = 1,9 \cdot 10^{-2}$ моль/л, m (серина) = $1,2 \cdot 10^{-3}$ г. В КФ сильновирулентного штамма 639 концентрация серина была выше в 6 раз по сравнению со средневирулентным штаммом 419 — $C = 1,2 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (серина) = $7,8 \cdot 10^{-3}$ г. Прирост корешков, визуальное их загнивание у проращиваемых семян льна на фильтровальной бумаге, смоченной культуральным фильтратом сильновирулентного штамма 639, был наименьший. Токсичность КФ штамма 639 была выше по сравнению с КФ штамма 419. Важное значение в механизмах межклеточной передачи сигналов имеет фосфорилирование остатков серина в составе белков. Серин участвует в биосинтезе ряда других заменимых аминокислот: глицина, цистеина, метионина, триптофана [13]. Можно предположить, что серин в исследуемых культуральных фильтратах в результате биосинтеза образует глицин (зафиксированный у КФ штаммов 527 и 608). Следовательно, существует возможность индуцирования роста и развития клеток льна

в условиях *in vitro* при подборе оптимальных концентраций этой аминокислоты в среде культивирования.

Наличие глутамина на 21 сутки отмечено в КФ штаммов 419 и 639. Концентрация глутамина в КФ средневирулентного штамма 419 составляла $C = 1,1 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (глутамина) = $1,12 \cdot 10^{-2}$ г, концентрация глутамина в КФ сильновирулентного штамма 639 — $C = 7,4 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (глутамина) = $7,5 \cdot 10^{-2}$ г. В 6,7 раза концентрация глутамина выше в КФ штамма 639, чем в КФ штамма 419. Группирование азотистого обмена — роль глутамина как аминокислоты. К тому же глутамин участвует в синтезе других аминокислот, биосинтезе углеводов и ряде других операций. Глутамин входит в состав питательных сред для культивирования клеток и тканей льна.

Появление треонина в КФ исследуемых штаммов также отмечено на 21 сутки культивирования гриба — возбудителя антракноза. В процессе обезвреживания ряда токсинов отмечено участие треонина. Вместе с другими аминокислотами — цистеином, аланином, лизином и аспарагиновой кислотой треонин укрепляет иммунитет, повышает устойчивость клеток к патогенам и вирусам [13]. Наличие этой аминокислоты, которую так же добавляют в питательную среду для культивирования клеток и тканей льна, является одним из индукторов морфогенеза клеток льна *in vitro*.

Аминокислота аспарагин в КФ штаммов 419 и 639 выявлена на 28 сутки культивирования на питательной среде гриба — возбудителя антракноза. Концентрация аспарагина в КФ штамма 419 составляла $C = 1,4 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (аспарагин) = $1,3 \cdot 10^{-2}$ г; в КФ штамма 639 — $C = 2,0 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (аспарагин) = $1,8 \cdot 10^{-2}$ г. Концентрация аспарагина в КФ сильновирулентного штамма 639 была в 1,4 раза выше, чем в КФ средневирулентного штамма 419. Аспарагин является одной из 20 аминокислот, наиболее распространенных в природе [13]. Аспарагин используется при приготовлении питательных сред для культивирования клеток и тканей льна и является одним из стимулов морфогенеза клеток льна на питательной и селективной среде *in vitro*.

Присутствие аминокислоты аргинина в КФ штаммов 419 и 639 отмечено на 35 сутки. Концентрация аргинина в КФ штамма 419 составила $C = 1,2 \cdot 10^{-2}$ моль/л, m (аргинина) = $1,3 \cdot 10^{-3}$ г; в КФ штамма 639 — $C = 2,0 \cdot 10^{-2}$ моль/л, m (аргинина) = $2,2 \cdot 10^{-3}$ г. Концентрация аспарагина в КФ сильновирулентного штамма 639 была в 1,7 раза выше, чем в КФ средневирулентного штамма 419. Характерной особенностью аргинина является наличие в его молекуле, наряду с α -аминогруппой и амидиновой группой ($\text{NH}_2\text{-CNH}$), расположенной у δ -аминогруппы, которой принадлежит важная роль в обмене азотистых веществ [13]. Аргинин является аминокислотой, которую добавляют в питательную среду для культивирования клеток и тканей льна *in vitro*. Регулирование его концентрации в питательной среде позволяет изменять способность клеток льна к морфогенезу.

При определении аминокислотного состава культуральных фильтратов штаммов 419 и 639 на 42-е сутки в них выявлен тирозин. Концентрация данной аминокислоты в КФ штамма 419 составила $C = 3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л, m (тирозина) = $3,8 \cdot 10^{-4}$ г; в КФ штамма 639 — $C = 8,2 \cdot 10^{-2}$ моль/л, m (тирозина) = $1,04 \cdot 10^{-3}$ г. Тирозин является ароматической альфа-аминокислотой. Эта аминокислота входит в состав ферментов, во многих из которых именно тирозину отведена ключевая роль в ферментативной активности и её регуляции. В природе тирозин синтезируют микроорганизмы, грибы и растения [13]. Возможно, что исследуемые нами штаммы

возбудителя антракноза, 639 и 419 также синтезируют тирозин. Наличие данной аминокислоты способствует повышению токсичности культуральных фильтратов.

Исследования позволили выявить, что при культивировании гриба — возбудителя антракноза на питательной среде по мере роста мицелия гриба в КФ происходило снижение концентраций аминокислот аланина, аспарагина, глицина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Из-за высокой концентрации цистеина и тирозина культуральные фильтраты штаммов 419 и 639 были токсичными в течение всего периода исследований (до 42 суток).

Выводы

Таким образом, в результате исследований установлено, что в культуральных фильтратах исследуемых штаммов 527 и 608 присутствуют такие аминокислоты, как аланин, глицин, аспарагин, цистеин, треонин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, а также аргинин — у сильновирulentного штамма 527 и следы тирозина и лизина — у слабовирulentного штамма 608. К 40-м суткам культивирования запас питательных веществ в среде культивирования штаммов гриба — возбудителя антракноза льна, по-видимому, был исчерпан, и для жизнеобеспечения гриб начал использовать продукты своей жизнедеятельности. Установлено, что в КФ сильновирulentного штамма 527 концентрация всех определённых аминокислот была значительно выше, чем в КФ слабовирulentного 608 штамма. Анализ токсичности культуральных фильтратов в период роста мицелия гриба показал, что наибольшей токсичностью обладал 23-суточный КФ сильновирulentного

штамма 527. Прирост корешков и гипокотилей льна при использовании КФ сильновирulentного штамма 527 был меньшим у всех генотипов, взятых в исследовании.

Токсичность культурального фильтрата зависела от вирулентности штамма возбудителя антракноза — КФ сильновирulentного штамма более токсичен, чем КФ слабовирulentного штамма и, возможно, одним из слагающих токсичности является наличие аминокислот — цистеина, отличающейся высокой реакционной способностью и тирозина. Присутствие цистеина в культуральных фильтратах штаммов гриба — возбудителя антракноза льна повышает возможность ингибирования роста и развития клеток льна в культуре. В то же время при использовании КФ штаммов возбудителя антракноза, содержащего аминокислоты аспарагин, глутамин, серин, глицин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, существует возможность индуцирования роста и развития клеток льна в условиях *in vitro*. Это может осуществляться оптимальным подбором штаммов по вирулентности, длительности их культивирования на питательной среде и определённой концентрации в селективной среде.

Исследования позволили выявить, что при культивировании гриба — возбудителя антракноза — на питательной среде по мере роста мицелия гриба в КФ происходило снижение концентраций аминокислот аланина, аспарагина, глицина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Из-за высокой концентрации цистеина и тирозина культуральные фильтраты штаммов 419 и 639 были токсичными в течение всего периода исследований (до 42 суток).

ЛИТЕРАТУРА

1. Руцкая В.И. Антракноз люпина и его биологические особенности. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018;4(28):130-135.
2. Кудрявцева Л.П., Прасолова О.В. Групповая устойчивость сортов — важный приоритет селекции льна-долгунца. *Аграрный вестник Верхневолжья*. 2018;3(24):25-30.
3. Rozhmina T.A., Fu Y.B., Diederichsen A., et al. Research of Genetic Polymorphism Species *Linum usitatissimum* L. on a Basis a RAPD-Method. *Journal of Natural Fibers*. 2018;15(2):155-161.
4. Пролётова Н.В. Использование биотехнологических методов для создания новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу. *Достижения науки и техники АПК*. 2019;33(8):24-28.
5. Пролётова Н.В. Повышение устойчивости льна-долгунца к антракнозу (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) методами *in vitro*. Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. 2018;3(175):128-131.
6. Проценко М.А., Костина Н.Е., Теплякова Т.В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et singer. *Биотехнология*. 2018;34(1):45-51.
7. Рудаков, О.Б., Рудакова, Л.В., Букша, М.С. Генотипическая изменчивость аминокислотного состава белков жи-

вотного и растительного происхождения. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2020;20(1):8-21. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/2375>

8. 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. *Сборник науч. трудов ВНИИЛ*. 1994;(28-29):127-128.

9. Полуэктова Е.В., Берестецкий А.О. Грибы рода *Colletotrichum* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов. *Микология и фитопатология*. 2018;52(6):367-381.

10. Карпунин Б. Ф. Антракноз льна: селекция на устойчивость. *Lap Lambert Academic Publishing*. 2016. 113 с.

11. Рожмина Т.А., Лошакова Н.И. Образцы прядильного и масличного льна (*Linum usitatissimum* L.) — источники эффективных генов устойчивости к фузариозному увяданию и ее зависимость от температуры. *Сельскохозяйственная биология*. 2016;51(3):310-317.

12. Jayawardena R. S., Li X. H., Liu M., et al. *Colletotrichum*: Biological control, bio-catalyst, secondary metabolites and toxins. *Mycosphere*. 2016;7(8):1164-1176.

13. Досон Р., Эллиот У., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. М.: Мир, 1991. 250 с.

(In Russ.)

5. Proletova N.V. Increasing the resistance of fiber flax to anthracnose (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) by *in vitro* methods. *Oilseeds. Scientific and technical bulletin of the All-Russian Scientific Research Institute of Oilseeds*. 2018;3(175):128-131. (In Russ.)

6. Protsenko M.A., Kostina N.E., Teplyakova T.V. Selection of nutrient media for submerged cultivation of the wood-destroying fungus *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et singer. *Biotechnology*. 2018;34(1):45-51. (In Russ.)

7. Rudakov, O.B., Rudakova, L.V., Buksha, M.S. Genotypic variability of the amino acid composition of proteins of animal and plant origin. *Sorption and chromatographic processes*.

REFERENCES

1. Rutskey V.I. Lupine anthracnose and its biological characteristics. *Legumes and cereals*. 2018;4(28):130-135. (In Russ.)
2. Kudryavtseva L.P., Prasolova O.V. Group resistance of varieties is an important priority for fiber flax breeding. *Agrarian Bulletin of the Upper Volga Region*. 2018;3(24):25-30. (In Russ.)
3. Rozhmina T.A., Fu Y.B., Diederichsen A., et al. Research of Genetic Polymorphism Species *Linum usitatissimum* L. on a Basis a RAPD-Method. *Journal of Natural Fibers*. 2018;15(2):155-161.
4. Proletova N.V. Using biotechnological methods to create new anthracnose-resistant flax genotypes. *Achievements of science and technology of the agro-industrial complex*. 2019;33(8):24-28.

2020;20(1):8-21. (In Russ.) <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/2375>

8. Kurchakova L.N. Methods for obtaining culture filtrates of the fungus *Fusarium oxysporum* and *F. semitectum* and their application *in vitro* culture to obtain fusarium-resistant forms of fiber flax. *Collection of scientific works of VNIIL*. 1994;(28-29):127-128. (In Russ.)

9. Poluektova E.V., Berestetskiy A.O. Colletotrichum mushrooms as producers of biologically active compounds and bioherbicides. *Mycology and phytopathology*. 2018;52(6):367-381. (In Russ.)

10. Karpunin B.F. Flax anthracnose: selection for stability. *Lap*

Lambert Academic Publishing. 2016. 113 p. (In Russ.)

11. Rozhmina T.A., Loshakova N.I. Samples of spinning and oil flax (*Linum usitatissimum* L.) are sources of effective genes for resistance to fusarium wilt and its dependence on temperature. *Agricultural biology*. 2016;51(3):310-317. (In Russ.)

12. Jayawardena R. S., Li X. H., Liu M., et al. *Colletotrichum*: Biological control, bio-catalyst, secondary metabolites and toxins. *Mycosphere*. 2016;7(8):1164-1176.

13. Dawson R., Elliot W., Elliot W., Jones K. *Biochemist's Handbook*. Moscow: Mir, 1991. 250 p. (In Russ.)

ОБ АВТОРЕ:

Пролётова Наталья Викторовна, кандидат биологических наук, руководитель отдела селекционных технологий

ABOUT THE AUTHOR:

Natalya V. Proletova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher

НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ •

Урожай масличных позволит загрузить масложировую промышленность

Минсельхоз России прогнозирует, что общий объем производства масличных культур в Российской Федерации в 2020 году составит 21,5 млн т. Однако в ведомстве обеспокоены низкой урожайностью масличных на юге России, которая существенно отстает от прошлогодней.

Ситуация должна выправиться за счет более высоких урожаев в Центральном и Приволжском федеральных округах. Отраслевые эксперты указывают, что общее снижение по подсолнечнику будет в пределах 10%, но валовой сбор культуры при этом будет выше средних многолетних значений. Кроме того, отмечается рост производства других масличных культур, в частности рапса. В России в промышленных объемах выращиваются также и другие масличные культуры – лен, горчица, рыжик. Все это позволит полностью загрузить масложировую отрасль.



Рынок органической продукции в России растет опережающими темпами

По прогнозу Центра отраслевой экспертизы «Россельхозбанка», в ближайшие годы российский рынок органической продукции будет расти со средним темпом 10–12%.

В настоящее время российский рынок органической продукции находится на начальном этапе развития. В стране преобладает импортная органическая продукция: ее доля, по разным оценкам, составляет 80–90%. Важным фактором, который способствует переходу на органическое производство, является доля конкурентоспособных крестьянских (фермерских) хозяйств и небольших сельскохозяйственных организаций, которые обладают достаточной гибкостью, способны быстро менять производственные процессы. Среди востребованных российских культур – органическая пшеница, зеленый горох, соя, гречиха. Благодаря высокой доле КФХ большой потенциал роста производства органической продукции имеет овощеводство открытого грунта. В животноводстве, по оценке Центра отраслевой экспертизы «Россельхозбанка», наиболее перспективным направлением для производства органической продукции является молочное скотоводство. Этот один из сегментов российского АПК, где фермерские хозяйства наиболее конкурентоспособны, мобильны и могут удовлетворить растущий спрос на органическую продукцию. В свиноводстве же и бройлерном птицеводстве перспективы развития органического производства ограничены, поскольку они ориентированы на масштабное производство.