

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ В СЕЛЕКЦИИ ЛЬНА IN VITRO НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТРАКНОЗУ

**Пролётова Наталья Викторовна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник  
ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур»

172002, РФ, Тверь, Комсомольский проспект, 17/56, тел. 8 904 007 48 43

e-mail: science.trk@fnclk.ru

**Ключевые слова:** лен, антракноз, устойчивость, штамм, культуральный фильтрат, незрелый зародыш, каллусные клетки

Исследования проводили на базе лаборатории селекционных технологий ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур» (Тверская обл.) в 2018–2020 гг. Цель исследований – создание *in vitro* новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу – одному из наиболее вредоносных грибных болезней. В результате исследований уточнен состав культурального фильтрата возбудителя антракноза. Выявлено, что токсичность культуральных фильтратов не зависела от вирулентности используемых в настоящих исследованиях штаммов – более токсичными оказались культуральные фильтраты штаммов 784 (сильновирulentного) и 780 (средневирулентного) (загнивание и отмирание первичных корешков на 5 сутки наблюдали у 67 – 88 % проросших семян), менее токсичны – штаммы 793 (сильновирulentный) и 788 (слабовирulentный) (на 5 сутки загнивание и отмирание первичных корешков отмечено у 9 – 15 % проросших семян). Установлено, что морфогенные очаги формировались активнее у генотипов, морфогенный каллус которых переносили на среду с более высокой концентрацией культурального фильтрата; показано, что во втором пассаже при переносе морфогенных каллусов с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую также 40 мл/л культурального фильтрата, а также при переносе морфогенных каллусов с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую 44 мл/л культурального фильтрата на 14 сутки, количество сформированных морфогенных каллусов и зелёных почек значительно больше, чем при переносе с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую 36 мл/л культурального фильтрата. Получены жизнеспособные растения-регенеранты и выделены генотипы, которые в течение трёх поколений сохраняли устойчивость к антракнозу на уровне 50 – 60 %: НО-78 х Ленок, НИ-103-2 х Ленок, НЛ-40-1 х Ленок, НЭ-38 х Росинка, НЭ-36 х Ленок, НЭ-17 х Ленок, НЭ-16-2 х Росинка.

**Исследования выполнены в рамках Госзадания Министерства науки и высшего образования**

### Введение

Лен является стратегической культурой России. Актуальным направлением селекционной работы является создание сортов льна, сочетающих высокую урожайность с устойчивостью к наиболее вредоносным болезням. Антракноз является одной из них и проявляется ежегодно и, по данным Адушкевич (2000), Кудрявцевой, Павловой, Рожминой (2016) отмечается на 48,9 % обследованных площадей с поражением 5-65 % растений и развитием болезни от 1 до 19 % [1, 2, 3]. Урожайность волокна при сильном поражении льна антракнозом может снижаться до 37,5%. Полученные от больных растений семена могут быть заражены антракнозом на 80% и более [3, 4, 5]. Успех селекционной работы на устойчивость к болезням зависит от многих причин, в частности, от исходного селекционного материала, обладающего этой устойчивостью [6, 7]. Применение биотехнологических приемов и методов как дополнительного инструмента классической селекции, с использованием генетического разнообразия каллусных клеток позволяет проводить *in vitro* отбор устойчивых к

селективному агенту клеток и впоследствии получать на их основе устойчивые к болезни формы [8, 9, 10]. Однако низкая регенерационная активность клеток льна-долгунца в селективных условиях не позволяет получать формы, устойчивые к данным болезням, в массовом количестве [11, 12]. Поэтому в задачу исследований входила оптимизация селективных сред для проведения отбора устойчивых каллусных клеток льна к антракнозу в условиях *in vitro* в первом – третьем пассажах и создание новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу.

### Материалы и методы исследований

Исследования по созданию новых генотипов льна, характеризующихся устойчивостью к антракнозу, проводились в условиях *in vitro* и вегетационного опыта [13, 14]. Селекцию *in vitro* на устойчивость к антракнозу выполняли согласно методических рекомендаций «Методы создания *in vitro* растений-регенерантов льна-долгунца устойчивых к антракнозу (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) и токсичным ионам алюминия» [15]. Интенсивность спороношения определяли в капле

дистиллированной воды с помощью камеры Горяева под микроскопом МБИ-6. Количество спор в  $1 \text{ см}^3$  рассчитывали по формуле:  $N / 20 \times 10^6$ , где  $N$  – количество конидий в поле зрения микроскопа в камере Горяева. Визуальную оценку прироста биомассы гриба – возбудителя антракноза проводили на 7, 14, 28, 35 и 40 сутки. Токсичность культуральных фильтратов определяли по методике Курчаковой Л.Н. путем замачивания семян льна восприимчивого (Пенджаб) и устойчивого (Леона) сортов и проращивания их на фильтровальной бумаге в течение 7 суток [16]. Искусственная полевая популяция биообразцов возбудителя антракноза для заражения льна состояла на 50% из сильновирулентных штаммов (725, 726, 729, 730, 735, 739) и по 25% средне (724, 737, 728, 724) – и слабовирулентных штаммов (712, 714) [15].

Схема проведения исследований в условиях *in vitro*:

- подбор исходного растительного материала льна; подбор штаммов гриба – возбудителя антракноза льна; культивирование мицелия гриба *Colletotrichum lini* на жидкой среде MS, в течение 40 суток; культивирование незрелых зародышей (НЗ), первичного и пересадочного морфогенного каллуса льна на селективной среде, состоящей из компонентов питательной среды MS и культурального фильтрата (КФ) в концентрации 36; 40 и 44 мл/л; отбор устойчивых к КФ клеток льна; получение растений-регенерантов, обладающих устойчивостью к КФ возбудителя антракноза льна; оценка регенерантов на искусственном инфекционно-провокационном фоне и в условиях *in vitro* по устойчивости к антракнозу.

Объектом исследований при селекции *in vitro* на устойчивость к антракнозу являлись незрелые зародыши, изолированные на 10 сутки, растения сортов льна и форм, полученных в результате селекции *in vitro* на устойчивость к антракнозу и гибридов третьего – пятого поколений: Л 2053-5-11, НЭ-15, НЭ-39, ЛМ-98, Ленок, Росинка, F<sub>5</sub> ДБ 121-22, F<sub>5</sub> БД 215-14, F<sub>3</sub> НОЛ-78, F<sub>3</sub> НОР-78, F<sub>3</sub> НЛЛ-103-2, F<sub>3</sub> НЛР-40-2, F<sub>3</sub> НЛЛ-40-1, F<sub>3</sub> НЭЛ-38, F<sub>3</sub> НЭР-38, F<sub>3</sub> НЭЛ-36, F<sub>3</sub> НЭЛ-17, F<sub>3</sub> НЭР-16-2, а также штаммы гриба – возбудителя антракноза льна *C. lini*: сильновирулентные – 793 и 784, средневирулентный – 780, слабовирулентный – 788.

В качестве селективного агента при культивировании *in vitro* незрелых зародышей льна вышеуказанных генотипов использовали КФ штаммов гриба – возбудителя антракноза в концентрациях – 0 - контроль (питательная среда MS без селективного агента); 36 мл/л, 40 мл/л, 44 мл/л. Для получения культуральных фильтратов штаммы культивировали на питательной среде в течение 40 суток.

Для культивирования мицелия гриба использовали жидкую питательную среду MS, не содержащую витамины, хелатный комплекс, регуляторы роста. Для контроля состояния мицелия гриба – возбудителя антракноза проводили измерение объёма и, соответственно, прироста в динамике [17, 18].

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета программ Microsoft Excel с использованием метода первичной статистической обработки результатов эксперимента – определения выборочной средней величины.

#### Результаты исследований

Для получения культуральных фильтратов на питательной среде MS проведено культивирование четырёх штаммов гриба – возбудителя антракноза *Colletotrichum lini* Manns et Bolley: двух сильновирулентных – 793 и 784, одного средневирулентного – 780 и одного слабовирулентного – 788.

В результате проведённых исследований выявлено, что у мицелиев всех используемых штаммов гриба на 7-е сутки визуально фиксировались единичные конидии, которые разрастались и к 14 суткам культивирования образовывали желтообразную биомассу. Биомасса различных штаммов возбудителя антракноза имела различную окраску, приобретать которую штаммы начинали с 10-12 суток. Штамм 793 имел бледно-оранжевую окраску мицелия, серо-белое опушение с вкраплениями черного, которое начинало появляться к 28 суткам. У штамма 784 фиксировали оранжево-коричневую окраску мицелия и бело-серое опушение с желтыми пятнами, которое появлялось уже на 21-23 сутки. Штамм 780 имел бледно-розовую с оранжевыми прожилками окраску мицелия, бело-желто-розовое опушение, появляющееся на 21-23 сутки. Штамм 788 – с розово-оранжевой окраской мицелия и бело-желтым опушением, которое визуально фиксировалось на 26-28 сутки. К 40 суткам культивирования мицелий у всех исследуемых штаммов приобретал плотную консистенцию и к расцветкам, которые имели, добавлялся темно-коричневый цвет.

При измерении объёма и прироста биомассы мицелия штаммов возбудителя антракноза установлено, что при культивировании мицелия гриба штаммов 784 (сильновирулентного), 780 (средневирулентного) в течение 40 суток прирост биомассы составлял 32,7 и 30,8 %, соответственно, тогда как у штаммов 793 (сильновирулентного), 788 (слабовирулентного) – 10,5 и 9,8 %, соответственно (табл. 1). Результаты исследований показали, что наращивание биомассы, интенсивность роста гриба не зависели от вирулентности штамма. Сильновирулентный штамм 784 и средневиру-

**Таблица 1**  
**Рост мицелия гриба – возбудителя антракноза льна на жидкой питательной среде MS**

Штамм	Масса мицелия, г		Прирост биомассы, % ± Sp
	на 28 сут-ки ± Sp	на 40 сутки ± Sp	
784 сильновирulentный	10,61 ± 1,1	14,08 ± 0,8	32,7 ± 0,9
793 сильновирulentный	11,43 ± 0,6	12,63 ± 0,7	10,5 ± 0,6
780 средневирulentный	10,95 ± 2,1	14,32 ± 0,9	30,8 ± 1,5
788 слабовирulentный	10,93 ± 0,8	12,00 ± 1,0	9,8 ± 0,9

**Таблица 2**  
**Влияние культурального фильтрата штаммов гриба *Colletotrichum lini* на жизнеспособность семян (проращивание на 5 сутки)**

Культуральные фильтраты штаммов:	Количество загнивших первичных корешков, % ± Sp	
	Пенджаб	Леона
784	86,0 ± 0,4	67,0 ± 0,4
793	14,0 ± 0,3	9,0 ± 0,2
780	88,0 ± 0,4	71,0 ± 0,5
788	15,0 ± 0,2	10,0 ± 0,3

лентный – 780 к 40 суткам имели большую массу мицелия (14,08 г и 14,32 г) и прирост биомассы, тогда как у сильновирulentного штамма 793 и слабовирulentного – 788 масса мицелия была ниже (12,62 г и 12,00 г) и прирост биомассы гораздо меньше.

Оценка токсичности полученных культуральных фильтратов показала, что токсичность КФ не зависела от вирулентности вышеуказанных штаммов. Более токсичными оказались КФ штаммов 784 (сильновирulentного) и 780 (средневирulentного). Загнивание и отмирание первичных корешков наблюдали на 5 сутки у 67 – 88 % проросших семян как у устойчивого к антракнозу сорта Леона, так и у восприимчивого – Пенджаб. Менее токсичными оказались штаммы 793 (сильновирulentный) и 788 (слабовирulentный). На 5 сутки загнивание и отмирание первичных корешков отмечено у 9 – 15 % проросших семян (табл. 2).

Незрелые зародыши культивировали на среде MS, содержащей 0, 36, 40 мл/л культурального фильтрата смеси изучаемых штаммов, по 9 мл/л каждого штамма при концентрации 36 мл/л и по 10 мл/л – при концентрации 40 мл/л. Морфогенные каллусы через 14 суток переносили на среду MS, содержащую 0, 36, 40, 44 мл/л культурального фильтрата смеси изучаемых штаммов (по 9 мл/л каждого штамма при концентрации 36 мл/л, по 10 мл/л – 40 мл/л, по 11 мл/л – при концентрации 44 мл/л). Установлено, что морфогенные очаги формировались активнее у генотипов, морфогенный каллус которых переносили на среду с более высокой концентрацией культураль-

ного фильтрата штаммов возбудителя антракноза. Так, во втором пассаже, при переносе 9 морфогенных каллусов генотипа НЭ-17хЛенок с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую также 40 мл/л культурального фильтрата на 14 сутки сформировалось 8 морфогенных каллусов и 45 зелёных почек, 8 морфогенных каллусов с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую 44 мл/л культурального фильтрата на 14 сутки сформировалось 8 морфогенных каллусов и 46 зелёных почек, тогда как при переносе 10 морфогенных каллусов с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую 36 мл/л культурального фильтрата на 14 сутки сформировалось 9 морфогенных каллусов и 16 зелёных почек (табл. 3). Аналогичные результаты получены для всех генотипов, используемых в исследованиях.

В результате последующих отборов *in vitro* устойчивых клеток льна, которые на селективном фоне не утратили морфогенетические свойства, получены растения-регенеранты, устойчивые к действию культурального фильтрата *in vitro*.

В инфекционно-провокационном питомнике проводили оценку генотипов на устойчивость к антракнозу. В результате исследований выявлено, что устойчивость ряда генотипов льна к патогену (гибриды третьего поколения, полученные от скрещивания устойчивых в результате отбора *in vitro* форм с восприимчивыми сортами Ленок и Росинка) сохраняется до третьего поколения на уровне 51,2 – 59,4 %. Так, например, в третьем поколении гибридов, полученных от скрещивания устойчивой к антракнозу *in vitro* формы НО-78 (устойчивость 58 – 60 %) и восприимчивого сорта Ленок (устойчивость 32 – 35 %), устойчивость составляет 55 % (табл. 4). В первом и втором поколении устойчивость этой формы составляла 55 – 60 %. В третьем поколении гибридов, полученных от скрещивания устойчивой к антракнозу *in vitro* формы НЭ-38 (устойчивость 50 – 59 %) и восприимчивого сорта Росинка (устойчивость 32 – 35 %), устойчивость составляет 51,7 %. В первом и втором поколении устойчивость этой формы составляла 50 – 59 %.

Таким образом, в результате исследований с использованием биотехнологических методов и приёмов созданы новые формы льна, устойчивые к антракнозу – одному из вредоносных заболеваний льна-долгунца.

#### **Обсуждение**

Исследования, проведенные с целью соз-

## Морфогенез льна на селективных средах (2 пассаж)

Генотип	Концентрация КФ, мл/л (в 1 пассаже/в текущем пассаже)	Кол-во перенесённых морфогенных каллусов, шт.	Сформировалось на 14 сутки, шт		
			почек	побегов	морфогенных каллусов
НЭ-17хЛенок	40/40	9	45	3 (не ж/с)*	8
	40/36	10	16	1 (не ж/с)	9
	40/44	8	46	3 (не ж/с)	8
НЭ-17	40/40	6	40	-	4
	40/36	3	6	-	2
	40/44	6	42	-	5
Л 2053-5-11	40/40	16	52	5 (не ж/с)	12
	40/36	4	28	3 (не ж/с)	3
	40/44	12	54	3 (не ж/с)	11
F <sub>3</sub> НЛ 103-2хЛенок	40/40	12	12	4 (не ж/с)	11
	40/36	12	15	3 (не ж/с)	11
	40/44	11	14	3 (не ж/с)	11
НЭ-36хЛенок	40/40	9	48	1	9
	40/36	7	46	1	7
	40/44	8	50	2	8
Росинка	36/36	4	35	2	4
	36/40	5	34	2	5
	36/44	4	44	2	4

\*- не жизнеспособные

дания *in vitro* новых генотипов льна, характеризующихся устойчивостью к антракнозу – одному из наиболее вредоносных грибных болезней, позволили оптимизировать состав селективной среды для проведения отбора устойчивых каллусных клеток льна к антракнозу в условиях *in vitro* и выявить параметры мицелия для получения токсичных культуральных фильтратов. Получены в результате клеточной селекции *in vitro* устойчивые к культуральному фильтрату возбудителя антракноза растения-регенеранты. Созданы новые формы льна, проявившие устойчивость к антракнозу в течение трёх поколений.

#### Заключение

Уточнен состав культурального фильтрата возбудителя антракноза с целью создания *in vitro* новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу – одному из наиболее вредоносных грибных болезней.

Выявлено, что токсичность культуральных фильтратов не зависела от вирулентности используемых в настоящих исследованиях штаммов – более токсичными оказались культуральные фильтраты штаммов 784 (сильновирулентного) и 780 (средневирулентного) (загнивание и отмирание первичных корешков наблюдали на 5 сутки у 67 – 88 % проросших семян как у устойчивого к антракнозу сорта Леона, так и у восприимчивого – Пенджаб), менее токсичны – штаммы 793 (сильновирулентный) и 788 (слабовирулентный) (на 5 сутки загнивание и отмирание первичных корешков отмечено у 9 – 15 % проросших семян).

Таблица 4

## Устойчивость образцов льна к антракнозу

Генотип льна	Степень устойчивости, %		
	Первое поколение	Второе поколение	Третье поколение
Ленок* р.ф.*	35,3	35,2	35,7
Росинка* р.ф.	34,9	35,4	35,0
НО-78хЛенок	60,0	55,0	55,0
НО-78хРосинка	53,1	42,5	33,3
НЛ-103-2хЛенок	53,3	52,1	51,2
НЛ-40-2хРосинка	42,5	38,9	43,8
НЛ-40-1 х Ленок	58,3	58,3	59,4
НЭ-38хРосинка	50,0	59,0	51,7
НЭ-38хЛенок	43,9	48,3	38,9
НЭ-36хЛенок	60,0	58,7	59,6
НЭ-17хЛенок	55,0	55,0	55,0
НЭ-16-2хРосинка	59,6	59,0	58,3
Леона ст.**	75,0	75,0	75,0
Пенджаб ст.	31,3	30,9	31,3

\*- родительская форма, \*\*- сорт-стандарт

Установлено, что морфогенные очаги формировались активнее у генотипов, морфогенный каллус которых переносили на среду с более высокой концентрацией культурального фильтрата штаммов возбудителя антракноза; показано, что



во втором пассаже при переносе морфогенных каллусов с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую также 40 мл/л культурального фильтрата, а также при переносе морфогенных каллусов с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую 44 мл/л культурального фильтрата на 14 сутки количество сформированных морфогенных каллусов и зелёных почек значительно больше, чем при переносе с селективной среды, содержащей 40 мл/л культурального фильтрата на селективную среду, содержащую 36 мл/л культурального фильтрата. Получены жизнеспособные растения-регенеранты и выделены генотипы, которые в течение трёх поколений сохраняли устойчивость к антракнозу на уровне 50 – 60 %: НО-78 х Ленок, НЛ-103-2 х Ленок, НЛ-40-1 х Ленок, НЭ-38 х Росинка, НЭ-36 х Ленок, НЭ-17 х Ленок, НЭ-16-2 х Росинка.

#### Библиографический список

1. Адушкевич, Л. Л. Распространенность и развитие антракноза льна на территории Беларуси / Л. Л. Адушкевич // Защита растений : сборник научных трудов. – Минск, 2000. - Вып. XIX / XXIII. – С.125-127.
2. Кудрявцева, Л. П. Исходный материал для селекции льна на горизонтальную устойчивость к септориозу (пасмо) / Л. П. Кудрявцева, Л. Н. Павлова, Т. А. Рожмина // Инновационные разработки для производства льна : материалы заочной Международной научно-практической конференции, ВНИИМЛ (19-20 мая Тверь). – Тверь, 2016. – С. 15-23.
3. Карпунин, Б. Ф. Антракноз льна: селекция на устойчивость / Б. Ф. Карпунин. - Lap Lambert Academic Publishing, 2016. - 113 с.
4. Кудрявцева, Л. П. Групповая устойчивость сортов – важный приоритет селекции льна-долгунца / Л. П. Кудрявцева, О. В. Прасолова // Аграрный вестник Верхневолжья. - 2018. - № 3(24). - С. 25–30.
5. Скрининг образцов генофонда льна на устойчивость к неблагоприятным факторам / Т. А. Рожмина, Н. В. Мельникова, М. Г. Головлев, М. И. Смирнова, И. А. Кузмин // Достижения науки и техники АПК. - 2018. - Т. 32, № 10. - С. 11-14.
6. Data on genetic polymorphism of flax (*Linum usitatissimum* L.) pathogenic fungi of *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Aureobasidium*, *Septoria*, and *Melampsora* genera / R. O. Novakovskiy, E. M. Dvorianinova, T. A. Rozhmina [et al] // Data in Brief. - 2020. - Т. 31. - С. 105710.
7. Новые источники селекционно-значимых признаков льна, адаптивные к условиям Центрального нечерноземья / Т. А. Рожмина, А. А. Жученко, Н. Ю. Рожмина, Т. С. Киселева, Е. Г. Герасимова // Достижения науки и техники АПК. - 2020. - Т. 34, № 8. - С. 50-55.
8. Пролётова, Н. В. Использование биотехнологических методов для создания новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу / Н. В. Пролётова // Достижения науки и техники АПК. - 2019. - Т. 33, № 8. - С. 24-28.
9. Коваленко, Н. Н. Оптимизация питательных сред для культивирования *in vitro* зародышей из гибридов рода *Cerasus* Mill / Н. Н. Коваленко, Н. В. Поливара // Плодоводство и ягодоводство России. - 2017. - Т. 49. - С. 18-21.
10. Проценко, М. А. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et singer / М. А. Проценко, Н. Е. Костина, Т. В. Теплякова // Биотехнология. - 2018. - Т. 34, № 1. - С. 45-51.
11. Пролётова, Н. В. Повышение устойчивости льна-долгунца к антракнозу (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) методами *in vitro* / Н. В. Пролётова // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. - 2018. - № 3(175). - С. 128-131.
12. Патент № 2478282 Российская Федерация, RU 2478282 C2, 10.04.2013. Способ получения регенерантов льна-долгунца, устойчивых к антракнозу, методами *in vitro*: № 2011115728/10: заявл. 20.04.2011 / Пролётова Н. В., Кудрявцева Л. П., Виноградова Е.Г.; ГНУ ВНИИЛ Россельхозакадемии. 4 с.
13. Миллер, С. А. Методы культуры тканей в фитопатологии: грибы. В кн. Биотехнология растений: культура клеток / С. А. Миллер; перевод с английского В. И. Негрука ; под редакцией Р. Г. Бутенко. – Москва : ВО Агропромиздат, 1989. – С. 259 – 274.
14. Клейн, Р. М. Методы исследования растений / Р. М. Клейн, Д. Т. Клейн ; перевод с английского и предисловие В. И. Мельгунова. – Москва : Колос, 1974. – 528с.
15. Пролётова, Н. В. Методы создания *in vitro* растений-регенерантов льна-долгунца устойчивых к антракнозу (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) и токсичным ионам алюминия : методические рекомендации / Н. В. Пролётова, Е. Г. Виноградова, Л. П. Кудрявцева. – Тверь, 2014. – 19 с.
16. 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 / Л. Н. Курчакова // Сборник научных трудов ВНИИЛ. - Торжок, 1994. - Вып.28-

29. - С. 127–128.

17. Colletotrichum: Biological control, bio-catalyst, secondary metabolites and toxins / R. S. Jayawardena, X. H. Li, M. Liu [et al.] // *Mycosphere*. - 2016. - Vol. 7(8). - P. 1164–1176.

18. Полуэктова, Е. В. Грибы рода *Colletotrichum* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов / Е. В. Полуэктова, А. О. Берестецкий // *Микология и фитопатология*. - 2018. - Т. 52, № 6. - С. 367–381.

## USAGE OF CULTURAL FILTRATES IN IN VITRO SELECTION FOR ANTHRACNOSE RESISTANCE

Proletova N. V.

FSBSI "Federal Scientific Center of Fiber Crops"

172002, RF, Tver, Komsomolsky av., 17/56, tel. 8 904 007 48 43

e-mail: science.trk@fncl.ru

*Key words:* flax, anthracnose, resistance, strain, cultural filtrate, immature embryo, callus cells

The research was carried out on the basis of the laboratory of selection technologies of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Scientific Center of Fiber Crops" (Tver region) in 2018–2020. The aim of the research is in vitro development of new flax genotypes resistant to anthracnose, one of the most harmful fungal diseases. As a result of the research, the composition of the cultural filtrate of the anthracnose causative agent was clarified. It was revealed that toxicity of the cultural filtrates did not depend on the virulence of the strains used in the present studies, the cultural filtrates of strains 784 (highly virulent) and 780 (medium virulent) turned out to be more toxic (decay and death of radicle was observed on the 5th day in 67 - 88% of germinated seeds), less toxic are strains 793 (highly virulent) and 788 (weakly virulent) (decay and death of radicle was observed on the 5th day in 9-15% of germinated seeds). It was found that morphogenic foci were formed more actively in genotypes the morphogenic callus of which was transferred to a medium with a higher concentration of the cultural filtrate; it was shown that in the second passage, when transferring morphogenic calli from a selective medium, which contains 40 ml / L of cultural filtrate on a selective medium also containing 40 ml / L of cultural filtrate, as well as on a selective medium containing 44 ml / L of cultural filtrate, the number of formed morphogenic calli and green buds on the 14<sup>th</sup> day is significantly higher than in case of transferring on a selective medium containing 36 ml / L of cultural filtrate. Viable regenerant plants were obtained and genotypes were isolated, which retained resistance to anthracnose for three generations at a level of 50 - 60%: NO-78 x Lenok, NL-103-2 x Lenok, NL-40-1 x Lenok, NE-38 x Rosinka, NE-36 x Lenok, NE-17 x Lenok, NE-16-2 x Rosinka.

### Bibliography

1. Adushkevich, L. L. Prevalence and development of flax anthracnose in Belarus / L. L. Adushkevich // *Plant protection: collection of scientific works*. - Minsk, 2000. - Issue. XIX / XXIII. - P. 125-127.
2. Kudryavtseva, L. P. Initial material for flax selection for horizontal resistance to *Septoria spot* (pasma disease) / L. P. Kudryavtseva, L. N. Pavlova, T. A. Rozhmina // *Innovative development for flax production: materials of on-line International scientific-practical conference, All-Russian Research Institute of Flax Cultivation Mechanization* (May 19-20, Tver). - Tver, 2016. -- P. 15-23.
3. Karpunin, B.F. Anthracnose of flax: selection for stability / B.F. Karpunin. - Lap Lambert Academic Publishing, 2016. -- 113 p.
4. Kudryavtseva, L.P. Group resistance of varieties is an important priority of fiber flax selection / L.P. Kudryavtseva, O.V. Prasilova // *Agrarian Vestnik of the Upper Volga Region*. - 2018. - No. 3 (24). - P. 25-30.
5. Screening of flax gene pool samples for resistance to unfavorable factors / T.A. Rozhmina, N.V. Melnikova, M.G. Golovlev, M.I. Smirnova, I.A. Kuzemin // *Achievements of science and technology of the agro-industrial complex*. - 2018. - V. 32, No. 10. - P. 11-14.
6. Data on genetic polymorphism of flax (*Linum usitatissimum* L.) pathogenic fungi of *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Aureobasidium*, *Septoria*, and *Melampsora* genera / R. O. Novakovskiy, E. M. Dvorianinova, T. A. Rozhmina [et al.] // *Data in Brief*. - 2020. -- V. 31. -- P. 105710.
7. New sources of selection-significant flax traits, adaptive to the conditions of the Central Non-Black Earth Region / T. A. Rozhmina, A. A. Zhuchenko, N. Yu. Rozhmina, T. S. Kiseleva, E. G. Gerasimova // *Achievements of Science and agro-industrial complex equipment*. - 2020. - V. 34, No. 8. - P. 50-55.
8. Proletova, N.V. Usage of biotechnological methods to create new genotypes of flax resistant to anthracnose / N.V. Proletova // *Achievements of science and technology of the agro-industrial complex*. - 2019. - V. 33, No. 8. - P. 24-28.
9. Kovalenko, N.N. Improvement of nutrient media for in vitro cultivation of embryos from hybrids of *Cerasus Mill* genus / N.N. Kovalenko, N.V. Polivara // *Fruit and berry growing in Russia*. - 2017. -- V. 49. -- P. 18-21.
10. Protsenko, M.A. Selection of nutrient media for deep cultivation of wood-destroying fungus *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev et Singer / M.A. Protsenko, N.E. Kostina, T.V. Teplyakova // *Biotechnology*. - 2018. - V. 34, No. 1. - P. 45-51.
11. Proletova, N. V. Increase of resistance of fiber flax to anthracnose (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) by in vitro methods / N. V. Proletova // *Oil crops. Scientific and technical vestnik of the All-Russian Scientific Research Institute of Oilseeds*. - 2018. - No. 3 (175). - P. 128-131.
12. Patent No. 2478282 Russian Federation, RU 2478282 C2, 10.04.2013. Method for obtaining regenerants of fiber flax resistant to anthracnose by in vitro methods: No. 2011115728/10: Appl. 20.04.2011 / Proletova N. V., Kudryavtseva L. P., Vinogradova E. G.; SSI All-Russian Research Institute of Flax Growing Mechanization of Russian Agricultural Academy. 4 p.
13. Miller, S.A. Methods of tissue culture in phytopathology: fungi. In the book. *Plant biotechnology: cell culture* / S. A. Miller; translation from English by V.I. Negruk; edited by R.G. Butenko. - Moscow: Agropromizdat, 1989. -- P. 259 - 274.
14. Klein, R.M. Research Methods of plants / R.M. Klein, D.T. Klein; translation from English and foreword by V. I. Melgunov. - Moscow: Kolos, 1974. -- 528p.
15. Proletova, N. V. Methods of creating in vitro plants-regenerants of fiber flax resistant to anthracnose (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) and toxic aluminum ions: recommended practice / N. V. Proletova, E. G. Vinogradova, L. P. Kudryavtseva. - Tver, 2014. -- 19 p.
16. Kurchakova, L.N. Methodology for obtaining cultural filtrates of *Fusarium oxysporum* fungus and *F. semitectum* and their usage in the culture in vitro to obtain fusarium-resistant forms of fiber flax / L.N. Kurchakova // *Collection of scientific works of All-Russian Research Institute of Flax*. - Torzhok, 1994. - Issue 28-29. - P. 127–128.
17. Colletotrichum: Biological control, bio-catalyst, secondary metabolites and toxins / R. S. Jayawardena, X. H. Li, M. Liu [et al.] // *Mycosphere*. - 2016. - Vol. 7 (8). - P. 1164–1176.
18. Poluektova, E. V. Fungi of *Colletotrichum* genus as producers of biologically active compounds and bioherbicides / E. V. Poluektova, A. O. Berestetskiy // *Mycology and phytopathology*. - 2018. - V. 52, No. 6. - P. 367–381.