

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА СЕЛЕКТИВНОЙ СРЕДЫ НА МОРФОГЕНЕЗ ЛЬНА В КУЛЬТУРЕ *INVITRO*

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, science.trk@fncl.ru

Ключевые слова: лен, питательная среда, селективная среда, культуральный фильтр, незрелые зародыши, гипокотильные сегменты, морфогенный каллус

Исследования проводили на базе лаборатории селекционных технологий ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур» (Тверская обл.) в 2016, 2018, 2021 гг. Цель исследований – определить оптимальный минеральный состав селективной среды для проведения эффективной селекции *invitro* на устойчивость к антракнозу. Изучались различные по минеральному составу среды. Выявлено, что для получения культуральных фильтратов штаммов гриба – возбудителя антракноза льна возможно использование питательных сред Гамборга, MS, SH-2, не содержащих витамины, хелатный комплекс, фитогормоны. Полученные на основе этих сред культуральные фильтраты обладали высокой токсичностью и позволяли использовать их при селекции *invitro*. Отмечено, что каллус, сформированный на основе гипокотильных сегментов, имел более высокую способность к морфогенезу, относительно каллуса, сформированного на основе незрелых зародышей. На селективной среде, состоящей из минеральных солей среды Гамборга и культурального фильтрата, доля сформированного морфогенного каллуса была наименьшей у всех генотипов, взятых в исследования, и составила 0,1 - 6,8 %. Минеральный состав селективной среды и морфогенетический потенциал генотипа оказывали влияние на формирование морфогенного каллуса на основе первичного каллуса. В зависимости от генотипа доля морфогенных каллусов, сформированных на среде Гамборга + КФ составила 0,1 – 2,2 %, на среде MS + КФ – 3,3 – 8,0 %, на среде Sh-2 + КФ – 3,4 – 8,1 %, соответственно. Минеральный состав селективной среды не оказывал существенного влияния на формирование морфогенных клеток на основе пересадочного каллуса. Доля морфогенного каллуса составляла 3,0 – 5,2 % у сорта Ленок; 3,0 – 5,4 % - Росинка; 0,1 – 4,3 % - Зарянка; 3,1 – 5,5 % - у линии Л 2053-5-11; 6,1 – 7,4 % - Л 957-8-7. Высоким морфогенетическим потенциалом обладали селекционные линии Л 2053-5-11 и Л 957-8-7.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования ФГБНУ ФНЦ ЛК по теме № FGSS2019-0016.

Введение

Лён-долгунец – *Linum usitatissimum* L. – одна из основных лубяных культур, которую широко возделывают в различных странах мира для производства волокна и масла. До революции Россия была главным производителем этой культуры в мире (80 % мировых посевов, 70 % всего сбора – до 360 тыс. тонн), однако на сегодняшний день Российская Федерация сдает позиции [1, 2]. Этому способствует ряд причин. Одной из них является то, что возделываемые сорта льна-долгунца не в полной мере соответствуют требованиям сельхозпроизводителей. Поражаемость льна грибными болезнями составляет основную трудность в получении стабильно высоких урожаев волокна и семян, сохранении их товарности и, соответственно, качества получаемой продукции. Ежегодная потеря урожая льнопродукции от болезней составляет более 40%. Ситуация усугубляется появлением резистентных изолятов фитопатогенов, что делает нецелесообразным регулярное использование фунгицидов [3, 4, 5]. К тому же

применение сильнодействующих фунгицидов способствует ускоренному отбору наиболее агрессивных рас в популяции возбудителя и поэтому является неэффективным и опасным для окружающей среды [6]. Самые распространенные и вредоносные болезни льна – фузариоз, ржавчина, антракноз и пасмо. Поражение грибами рода *Colletotrichum* приводит к отмиранию корешков и точки роста у 70-80% растений льна, вследствие чего урожай волокна может снижаться на 20-35%, а инфекция – накапливаться в семенах и поражать всходы будущих посевов [3, 4]. И если селекция на устойчивость к фузариозному увяданию и ржавчине успешно проводится, то отбор устойчивых к антракнозу и пасмо форм льна сопровождается определенными трудностями. В связи с этим возникает необходимость создания сортов с комплексной толерантностью к болезням. Они должны стать основой интегрированной защиты, что особенно важно в период применения новых технологий сельскохозяйственного производства [7, 8].

Для получения новых устойчивых к болезням форм растений активно применяют биотехнологические методы. Эффективным способом повышения генетического разнообразия растений является направленная селекция клеточных культур в стрессовых условиях и получение соматклонов. Однако, несмотря на продолжительное время использования соматклональной изменчивости в селекционной практике, сортов на этой основе создано мало. Широкому применению клеточной селекции растений препятствуют низкая регенерационная способность в селективных условиях *in vitro* и нестабильность проявления целевых признаков у растений-регенерантов [9, 10].

Материалы и методы исследований

Исследования по оптимизации минерального состава селективной среды проводились в лабораторных условиях *in vitro*. Растения-доноры, регенеранты и их потомства в осенне-весенний период выращивали на светоустановке в искусственных климатических условиях (фото-период: 8 часов – день, 16 часов – ночь, температура 18 – 20° С), в весенне-летний период – в условиях вегетационного домика с естественным освещением, температурным режимом и искусственным поливом сосудов до полной влагоемкости почвы [11].

Объектом исследований являлись незрелые зародыши, изолированные из коробочек льна, сформированных на 10 сутки после опыления; семена; гипокотильные сегменты, полученные от стерильных 7-8-суточных проростков сортов и линий льна, любезно предоставленных сотрудниками лаборатории селекции – Леннок, Росинка, Зарянка, Л 2053-5-11, Л 957-8-7, а также штаммы гриба – возбудителя антракноза льна *C. lini*: сильновирulentные – 793 и 784, средневирулентный – 780, слабовирулентный – 788.

Культивирование первичных эксплантов и морфогенного каллуса выполняли согласно методических рекомендаций «Методы создания *in vitro* растений-регенерантов льна-долгунца устойчивых к антракнозу (*Colletotrichum lini* Mannset Bolley) и токсичным ионам алюминия» [11]. 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 [12].

Схема проведения исследований в условиях *in vitro*:

- подбор исходного растительного мате-

риала льна;

- подбор штаммов гриба – возбудителя антракноза льна;

- культивирование мицелия гриба *Colletotrichum lini* на жидкой среде Мурасиге-Скуга (MS) [13], Гамборга [13] и Sh-2 [14], не содержащих витаминов, хелатный комплекс и фитогормоны, в течение 40 суток;

- культивирование семян льна на жидкой питательной среде Sh-2, не содержащей фитогормоны, (концентрация сахарозы составляла 1,0%) в течение 7-8 суток;

- получение стерильных проростков;

- культивирование незрелых зародышей (НЗ), изолированных из коробочек, сформированных на 10 сутки с момента опыления; гипокотильных сегментов, размером 5-8 мм, полученных от 7-8-суточных проростков; первичного и пересадочного морфогенного каллуса льна на селективной среде, состоящей из компонентов питательной среды MS, или Sh-2, или Гамборга (табл.1) и культурального фильтрата (КФ) в концентрации 36 (для культивирования первичных эксплантов); 40 (для культивирования первичного морфогенного каллуса) и 44 мл/л (для культивирования пересадочного морфогенного каллуса);

- получение растений - регенерантов и их адаптация к условиям *in vivo*.

Каллусную ткань пересаживали в возрасте 3—4 недель (в зависимости от скорости развития культуры). Через 21-24 дня проводили учет числа рыхлых (но не водянистых) каллусов насыщенного зелёного цвета с видимыми участками роста (морфогенный каллус).

Некротизированные культуры с проявлением ризогенеза выбраковывали, а оставшийся каллус без признаков регенерации переносили на свежую среду без селективного агента (без КФ) для стимулирования морфогенетического потенциала.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета программ Microsoft Excel, с использованием метода первичной статистической обработки результатов эксперимента – определения выборочной средней величины. Долю морфогенного каллуса рассчитывали как процент от общего количества каллусных линий.

Результаты исследований

В связи с тем, что культуральный фильтрат в процессе исследований добавляли в различные по минеральному составу питательные среды, штаммы решено было выращивать на аналогичных средах. Для получения культураль-

Таблица 1

Состав питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей льна

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л		
	Мурасига — Скуга	Гамборга	Sh-2
NH_4NO_3	1650	2500	1650
KNO_3	1900	-	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	435
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	370
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	130	-
KH_2PO_4	170	-	170
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,35	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-
H_3BO_3	6,2	3,0	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	8,6
KI	0,83	0,75	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
$\text{CoU}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
Глицин	2,0	-	2,0
Мезоинозит	100	100	100
Никотиновая кислота	0,5	1,0	0,5
ПиридоксинHCl	0,5	1,0	0,5
ТиаминHCl	1	10,0	0,1
2,4-Д	-	0,1-1,0	-
Кинетин	-	0,1	-
Глутамин	-	-	25,0
Аспарагин	-	-	250,0
Глицин	-	-	2,0
L-серин	-	-	125,0
6-бензиладенин	1,0	-	1,0
НУК	0,05	-	0,05
Сахароза	30 000	30 000	30 000
Агар - агар	7 000	7 000	7 000
pH	5,6-5,8	5,6-5,8	5,6-5,8

ных фильтратов проводили культивирование штаммов гриба *Colletotrichum linina* на жидкой среде MS, Гамборга и Sh-2. Кусочки агаризованного мицелия, размером 1x1 см высаживали на поверхность жидкой среды, в объёме 1 л. Спороношение грибов начиналось на 5-7 сутки и единичные клетки – споры в фильтрате можно было определить уже на 7 сутки. По скорости роста и нарастанию биомассы гриба варианты культивирования различались не достоверно (таблица 2). Рост мицелия фиксировали от единичных клеток на 7 сутки культивирования, до плотного спорующего мицелия массой 13,4 – 15,6 г – на 40 сутки. Токсичность 40-суточных культуральных фильтратов, полученных на различных средах, была высокой и составляла в зависимости от штамма 86,3-88,0 %. В дальнейших исследованиях использовали культуральные фильтраты штаммов 793, 784, 780, 788, взятых в равных концентрациях – по 9 мл/л (в сумме 36 мл/л) – для культивирования незрелых зародышей и гипокотильных сегментов, по 10 мл/л (в сумме 40 мл/л) – для культивирования первичного морфогенного каллуса, по 11 мл/л (в сумме 44 мл/л) – для культивирования пересадочного морфогенного каллуса.

Таким образом, для получения токсичных культуральных фильтратов на основе штаммов гриба – возбудителя антракноза возможно использование питательных сред различного минерального состава – Гамборга, MS, SH-2, не содержащих витамины, хелатный комплекс и фитогормоны. Культуральные фильтраты, полученные на основе таких сред, обладают высокой токсичностью и позволяют использовать их в исследованиях в качестве селективного агента.

В результате проведённых исследований выявлено, что первичные экспланты, выбранные нами для формирования морфогенного каллуса на селективной среде, по-разному реагируют на созданные селективные условия. Каллус, сформированный на основе гипокотильных сегментов, имел более высокую способность к морфогенезу, чем каллус, сформированный на основе незрелых зародышей. Так, например, у сорта Ленок на основе незрелых зародышей, в зависимости от минерального состава селективной среды, сформировалось от 1,1 до 6,3 % морфогенного каллуса, тогда как на основе гипокотильных сегментов сформировано от 4,7 до 10,4 % морфогенного каллуса (таблица 3). У селекционной линии Л 2053-5-11 на основе незрелых зародышей сформировалось от 2,9 до 3,3 % морфогенного каллуса, тогда как на основе

гипокотильных сегментов сформировано от 14,9 до 16,2 % морфогенного каллуса.

В то же время выявлено, что минеральный состав селективной среды существенно влияет на формирование морфогенного каллуса, полученного на основе первичных эксплантов – гипокотильных сегментов и незрелых зародышей. На селективной среде, состоящей из минеральных солей среды Гамборга и культурального фильтрата, доля сформированного морфогенного каллуса была наименьшей у всех генотипов, взятых в исследования, и составила 0,1 - 6,8 %. На селективных средах, состоящих из минеральных солей сред MS, Sh-2 и КФ, формировались морфогенные каллусы с большей частотой.

Таблица 2

Рост мицелия штаммов гриба *Colletotrichum lini* на различных питательных средах

Штамм гриба	Среда культивирования	Масса мицелия, г±Sp			
		7 сутки	21 сутки	28 сутки	40 сутки
793	MS	Единичные клетки	5,6±1,2	10,7±2,2	14,6±1,5
	Гамборга	Единичные клетки	4,7±2,1	10,5±2,2	13,9±2,0
	Sh	Единичные клетки	5,8±1,9	11,0±2,1	14,7±2,2
784	MS	Единичные клетки	4,3±2,2	9,9±3,2	13,9±1,9
	Гамборга	Единичные клетки	4,5±1,3	9,3±2,1	14,1±2,1
	Sh	Единичные клетки	4,8±0,9	9,8±2,4	15,6±0,6
780	MS	Единичные клетки	4,9±1,6	10,6±1,9	14,9±1,6
	Гамборга	Единичные клетки	3,9±1,1	10,3±2,1	14,8±2,2
	Sh	Единичные клетки	5,2±1,0	10,8±2,3	15,1±1,4
788	MS	Единичные клетки	5,1±1,1	10,3±2,0	13,9±1,6
	Гамборга	Единичные клетки	4,9±1,2	10,3±1,1	13,4±2,1
	Sh	Единичные клетки	5,1±1,3	10,4±2,3	14,0±2,3

Доля сформированного морфогенного каллуса была не ниже 1,7 % и возрастала в зависимости от генотипа, до 16,5 %. В то же время более насыщенная аминокислотами среда Sh-2 не обладала преимуществами перед средой MS. Так, например, у сорта Росинка, проявившего на начальном этапе пониженную способность к морфогенезу, на селективной среде, состоящей из минеральных солей среды Гамборга+ КФ, формировалось 1,1 % (НЗ) и 4,7 % (ГС) морфогенного каллуса; на селективной среде, состоящей из минеральных солей среды MS+ КФ – 1,7 % (НЗ) и 11,6 % (ГС) морфогенных каллусов; на селективной среде, состоящей из минеральных солей среды Sh-2 + КФ – 2,1 % (НЗ) и 7,3 % (ГС) морфогенных каллусов.

В процессе отбора выживших в селективных условиях клеток льна визуально отмечено, что морфогенные и неморфогенные участки каллусов отличались по цвету, консистенции и скорости роста. Клетки каллусов, которые имели водянистую или очень плотную консистенцию и цвет – светло желтый – светло зелёный с коричневыми вкраплениями в течение 14-28 суток не проявляли признаков морфогенеза и либо отмирали, либо продолжали наращивать водянистую биомассу. Каллусные клетки, имеющие насыщенный зелёный цвет и рыхлую консистенцию, через 14-21 суток формировали морфогенные очаги, которые в последующем переносили на свежие селективные среды в течение 2-3 пассажей. После пересадки первичного морфогенного каллуса на селективную среду с различным минеральным составом и более высокой концентрацией селективного агента – КФ наблюдали уменьшение доли морфоген-

ных каллусов на среде Гамборга + КФ по сравнению со средами MS + КФ и Sh-2 + КФ. В зависимости от генотипа доля морфогенных каллусов сформированных на среде Гамборга + КФ составила 0,1 – 2,2 %, на среде MS + КФ – 3,3 – 8,0 %, на среде Sh-2 + КФ – 3,4 – 8,1 %, соответственно (табл.4). Наибольший морфогенетический потенциал при формировании морфогенных клеток на основе первичного каллуса проявила селекционная линия Л 957-8-7. Доля сформированного морфогенного каллуса составила 1,1 % на среде Гамборга + КФ, 8,0 % - на среде MS + КФ, 8,1 % - на среде Sh-2 + КФ.

Таблица 4

Влияние различных селективных сред на формирование морфогенных клеток на основе первичного каллуса (n=10)

Генотип	Среда культивирования + 40 мл/л КФ	Доля морфогенного каллуса, % ±Sp
Ленок	MS	6,1±1,1
	Гамборга	1,3±0,2
	Sh-2	5,0±1,2
Росинка	MS	4,3±1,7
	Гамборга	0,1±0,3
	Sh-2	5,0±1,1
Зарянка	MS	3,3±1,6
	Гамборга	1,0±0,1
	Sh-2	4,1±1,3
Л 2053-5-11	MS	7,2±1,2
	Гамборга	2,2±0,9
	Sh-2	3,4±0,6
Л 957-8-7	MS	8,0±1,1
	Гамборга	1,1±0,2
	Sh-2	8,1±2,2

В результате исследований выявлено, что на формирование морфогенного каллуса на основе первичного каллуса оказывает влияние минеральный состав селективной среды и морфогенетический потенциал генотипа. Селективная среда, состоящая из минеральных солей среды Гамборга и КФ штаммов возбудителя антракноза, была менее эффективна для формирования морфогенного каллуса, чем среды MS + КФ и Sh-2 + КФ.

Дальнейшая селекция *invitro* на устойчивость к КФ штаммов возбудителя антракноза предполагала перенос первичного морфогенного каллуса на селективную среду с более высокой концентрацией селективного агента – культурального фильтрата. Внесение КФ в концентрации 44 мл/л в питательные среды различного минерального состава позволило проводить отбор в селективных условиях *invitro*. На этапе формирования морфогенных клеток на основе пересадочного каллуса минеральный состав селективной среды не оказывал существенного влияния. Доля морфогенного каллуса составляла 3,0 – 5,2 % у сорта Ленок, 3,0 – 5,4 % - у сорта Росинка, 0,1 – 4,3 % - у Зарянка, 3,1 – 5,5 % - у линии Л 2053-5-11, 6,1 – 7,4 % - у Л 957-8-7 (табл.5).

Таблица 5
Влияние различных селективных сред на формирование морфогенных клеток на основе пересадочного каллуса (n=10)

Генотип	Среда культивирования + 44 мл/л КФ	Доля морфогенного каллуса, % ± Sp
Ленок	MS	3,0±1,0
	Гамборга	3,0±0,6
	Sh-2	5,2±1,5
Росинка	MS	5,4±1,1
	Гамборга	3,1±0,9
	Sh-2	3,0±1,1
Зарянка	MS	2,4±1,2
	Гамборга	0,1±0,1
	Sh-2	4,3±1,2
Л 2053-5-11	MS	5,5±1,2
	Гамборга	3,1±0,6
	Sh-2	4,4±0,9
Л 957-8-7	MS	6,1±1,1
	Гамборга	7,0±1,3
	Sh-2	7,4±1,2

На данном этапе большее влияние оказывал заложенный в генотипе морфогенетический потенциал сортов и линий льна. Высоким морфогенетическим потенциалом обладали селекционные линии Л 2053-5-11 и Л 957-8-7 в течение всего селекционного процесса. Сорта льна Ленок, Росинка, Зарянка снижали морфогенетический потенциал, и дальнейшая селекция *invitro* на устойчивость к антракнозу этих сортов была менее эффективна.

В результате исследований получены растения-регенеранты сортов и линий льна, устойчивые к КФ в условиях *invitro*.

Обсуждение

Изучались различные по минеральному

составу среды Гамборга, MS, SH-2 с добавлением культурального фильтрата. Влияние минерального состава вышеуказанных сред оценивали по формированию морфогенных каллусов на основе первичных эксплантов (НЗ и ГС), а также на основе первичного и пересадочного каллусов по показателю «доля морфогенных каллусов». Выявлено влияние минерального состава селективной среды и морфогенетического потенциала сортов и линий льна на формирование морфогенных каллусов в культуре *invitro*.

Заключение

В результате исследований установлено, что для получения культуральных фильтратов штаммов гриба – возбудителя антракноза льна возможно использование питательных сред Гамборга, MS, SH-2, не содержащих витамины, хелатный комплекс, фитогормоны. Культуральные фильтраты, полученные на основе этих сред, обладали высокой токсичностью (86,3-88,0 %, в зависимости от штамма) и позволяли использовать их при селекции *invitro*.

Проведенные исследования позволили установить, что морфогенетический потенциал генотипа оказывал влияние на формирование морфогенного каллуса на основе первичных эксплантов. Каллус, сформированный на основе гипокотильных сегментов, имел более высокую способность к морфогенезу, относительно каллуса, сформированного на основе незрелых зародышей.

Результаты исследований позволили сделать вывод, что формирование морфогенного каллуса в селективных условиях находилось в зависимости от минерального состава селективной среды. Установлено, что на селективной среде, состоящей из минеральных солей среды Гамборга и культурального фильтрата, доля сформированного морфогенного каллуса была наименьшей у всех генотипов, взятых в исследования, и, следовательно, питательная среда Гамборга менее других подходила для проведения исследований по селекции *invitro*. Выделены две селекционные линии Л 2053-5-11 и Л 957-8-7, обладающие высоким морфогенетическим потенциалом.

Установлено, что использование среды Sh-2 – более насыщенной аминокислотами по сравнению с MS не способствовало формированию значительно большего количества морфогенных каллусов в селективных условиях.

Библиографический список

1. Понажев, В. П. Влияние методов отбора

растений и способов посева на эффективность создания оригинальных семян льна-долгунца в первичном семеноводстве / В. П. Понажев // Аграрный вестник Верхневолжья. - 2020. - № 2(31). - С. 51-56.

2. Великанова, И. В. Региональные особенности развития льняного подкомплекса в условиях нарастающих кризисных явлений / И. В. Великанова, Р. А. Попов // Вестник АПК Верхневолжья. - 2020. - № 2(50). - С. 66-71.

3. Карпунин, Б. Ф. Антракноз льна: селекция на устойчивость : монография / Б. Ф. Карпунин. - Lap Lambert Academic Publishing, 2016. - 113 с. – ISBN 978-3-659-91625-0.

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. Biological Control and Biopesticide Suppression of Botrytis-Induced Diseases. Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems. The online version of the updated original chapter can be found at / P. C. Nicot, A. Stewart, M. Bardin, Y. Elad. - Springer International Publishing Switzerland, 2016. - P. 165-187. – URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_9

6. Lorenzini, M. Characterization and pathogenicity of *Alternaria* spp. strains associated with grape bunch rot during post-harvest withering / M. Lorenzini, G. Zapparoli // International journal of food microbiology. - 2014. - 186. - P. 1-5. - DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.008

7. Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, reveals evidence of horizontal gene transfer / E. Czisłowski, S. Fraser-Smith, M. Zander, W. T. O'Neill, R. A. Meldrum, L. T. Tran-Nguyen [et al.] // Molecular plant pathology. – 2018. - 19(5). – P. 1155-1171. - doi: 10.1111/mp.12594. Epub 2017 Nov. 10

8. Анализ состояния и перспективные направления развития селекции и семеноводства технических культур : научный аналитический обзор / И. В. Ущуповский, А. С. Васильев, Т. А. Щеголихина, В. Ф. Федоренко, Н. П. Мишууров, И. Г. Голубев. – Москва : ФГБНУ Росинформагротех, 2019. – 72 с. – ISBN 978-5-7367-1474-2.

9. 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.

10. Соколова, Л. М. Экспресс-оценка устойчивости моркови столовой к грибным болезням рр. *Alternaria* и *Fusarium* на фильтрат культуральной жидкости / Л. М. Соколова, А. А. Егорова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2019. - № 3(173). - С. 36-42.

11. 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.

12. 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.

13. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев [и др.] ; под редакцией В. С. Шевелухи. – Москва : Высшая школа, 1998. – 416 с.

14. Патент № 2478282 Российская Федерация, RU 2120741 C1. Питательная среда для культивирования пыльников льна : № 96112871/13 : заявл. 27.06.1996 : опубл. 27.10.1998 / Поляков А.В., Пролётова Н. В. ; Всероссийский научно-исследовательский институт льна. - 4 с.

INFLUENCE OF MINERAL COMPOSITION OF SELECTIVE MEDIUM ON FLAX MORPHOGENESIS IN IN VITRO CULTURE

Proletova N. V.,

FSBSI “Federal Scientific Center of Bast Crops”

172002, Russian Federation, Tver, Komsomolsky Av., 17/56, tel.: 8 904 007 48 43, science.trk@fncl.ru

Key words: flax, nutrition medium, selective medium, culture filtrate, immature embryos, hypocotyl segments, morphogenic callus

The studies were carried out on the basis of the laboratory of breeding technologies of Federal State Budgetary Scientific Institution “Federal Scientific Center of Bast Crops” (Tver region) in 2016, 2018, 2021. The purpose of the research is to determine appropriate mineral composition of the selective medium for effective *in vitro* selection for resistance to anthracnose. Various mineral composition media were studied. It was found that it is possible to use nutrient media Gamborg, MS, SH-2, which do not contain vitamins, chelate complex and phytohormones, in order to obtain cultural filtrates of fungus strains - the causative agent of flax anthracnose. The culture filtrates obtained on the basis of these media were highly toxic and it was possible to use them for *in vitro* selection. It was noted that the callus formed on the basis of hypocotyl segments had a higher ability for morphogenesis compared to the callus formed on the basis of immature embryos. As for selective medium consisting of mineral salts of Gamborg medium and cultural filtrate, the proportion of formed

morphogenic callus was the smallest in all genotypes taken in the study and amounted to 0.1–6.8%. Mineral composition of the selective medium and the morphogenetic potential of the genotype influenced the formation of morphogenic callus based on primary callus. Depending on the genotype, the proportion of morphogenic calli formed on Gamborg medium + CF was 0.1 - 2.2%, on MS medium + CF - 3.3 - 8.0%, on Sh-2 medium + CF - 3.4 – 8.1%, respectively. Mineral composition of the selective medium had no significant effect on formation of morphogenic cells based on transplanted callus. The proportion of morphogenic callus was 3.0–5.2% for Lenok variety; 3.0 - 5.4% - Rosinka; 0.1 - 4.3% - Zaryanka; 3.1 - 5.5% - for L 2053-5-11 line; 6.1 - 7.4% - L 957-8-7. The breeding lines L 2053-5-11 and L 957-8-7 had a high morphogenetic potential.

Bibliography:

1. Ponazhev, V.P. Influence of plant selection methods and sowing methods on efficiency of creating original fiber flax seeds in primary seed production / V.P. Ponazhev // *Agrarian Vestnik of the Upper Volga Region*. - 2020. - № 2 (31). - P. 51-56.
2. Velikanova, I. V. Regional features of development of flax subcomplex in conditions of growing crisis / I. V. Velikanova, R. A. Popov // *Vestnik of the AIC of the Upper Volga*. - 2020. - № 2(50). - P. 66-71.
3. Karpunin, B.F. Flax anthracnose: selection for resistance: monograph / B.F. Karpunin. -Lap Lambert Academic Publishing, 2016. - 113 p. – ISBN 978-3-659-91625-0.
4. Kudryavtseva, L.P. Group resistance of varieties is an important priority in fiber flax breeding / L.P. Kudryavtseva, O.V. Prasolova // *Agrarian Vestnik of the Upper Volga Region*. - 2018. - № 3(24). - P. 25–30.
5. Biological Control and Biopesticide Suppression of Botrytis-Induced Diseases. Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems. The online version of the updated original chapter can be found at / P. C. Nicot, A. Stewart, M. Bardin, Y. Elad. - Springer International Publishing Switzerland, 2016. - P. 165-187. – URL: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_9
6. Lorenzini, M. Characterization and pathogenicity of *Alternaria* spp. strains associated with grape bunch rot during post-harvest withering / M. Lorenzini, G. Zapparoli // *International journal of food microbiology*. - 2014. - 186. - P. 1-5. - DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.008
7. Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, reveals evidence of horizontal gene transfer / E. Czulowski, S. Fraser-Smith, M. Zander, W. T. O'Neill, R. A. Meldrum, L. T. Tran-Nguyen [et al.] // *Molecular plant pathology*. – 2018. - 19(5). - P. 1155-1171. - doi: 10.1111/mpp.12594. Epub 2017 Nov. ten
8. Analysis of the state and perspective directions of development of selection and seed production of industrial crops: scientific analytical review / I. V. Ushchapovsky, A. S. Vasiliev, T. A. Shchegolikhina, V. F. Fedorenko, N. P. Mishurov, I. G. Golubev.- Moscow: FSBSI Rosinformagrotech, 2019. - 72 p. – ISBN 978-5-7367-1474-2.
9. Proletova, N.V. Usage of biotechnological methods for creation of new flax genotypes resistant to anthracnose / N.V. Proletova // *Achievements of science and technology of the AIC*. - 2019. - V. 33, № 8. - P. 24-28.
10. Sokolova, L. M. Rapid assessment of table carrot resistance to fungal diseases such as pp. *Alternaria* and *Fusarium* on the culture liquid filtrate / L. M. Sokolova, A. A. Egorova // *Vestnik of Altai State Agrarian University*. - 2019. - № 3 (173). - P. 36-42.
11. Proletova, N.V. Methods for creating in vitro regenerant plants of fiber flax resistant to anthracnose (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) and toxic aluminum ions: study guide / N.V. Proletova, E.G. Vinogradova, L. P. Kudryavtseva. - Tver, 2014. - 19 p.
12. Kurchakova, L. N. Method for obtaining cultural filtrates of the fungus *Fusarium oxysporum* and *F. semitectum* and their usage in in vitro culture 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.
13. Agricultural biotechnology: textbook / V. S. Shevelukha, E. A. Kalashnikova, S. V. Degtyarev [and others]; edited by V. S. Shevelukha. - Moscow: Higher School, 1998. - 416 p.
14. Patent № 2478282 Russian Federation, RU 2120741 C1. Nutrient medium for cultivation of flax anthers: № 96112871/13 : Appl. 27.06.1996: publ. 27.10.1998 / Polyakov A.V., Proletova N.V.; All-Russian Research Institute of Flax. - 4 p.