УДК 633.521:631.52:632.4

DOI 10.25230/2412–608X–2018–3–175–128–131

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА К АНТРАКНОЗУ (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) МЕТОДАМИ *IN VITRO*

Н.В. Пролётова,
кандидат биологических наук

ФГБНУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт льна»
Россия, 172002, г. Торжок, Луначарского, 35
E-mail: nataljaprljotva@rambler.ru

Для цитирования: 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. – Вып. 3 (175). – С. 128–131.

Ключевые слова: лён, антракноз, культуральный фильтрат, селекция *in vitro*, устойчивость, инфекционно-провокационный фон.

Для повышения устойчивости генотипов льна-долгунца к антракнозу возможно применять биотехнологические приёмы – селекцию *in vitro* с использованием культуры незрелых зародышей и селективной среды Sh-2. Культуральный фильтрат (КФ) возбудителя антракноза, добавляемый в питательную среду при дифференцировке генотипов льна по устойчивости к болезни, может состоять из смеси КФ сильновирулентных (680, 677*), средневирулентного (674) и слабовирулентного (674*) штаммов, взятых в равных концентрациях – по 9 мл/л каждого штамма. В этом случае количество сформированного морфогенного каллуса и полевая устойчивость генотипа льна к антракнозу близки по значению и можно судить о характере устойчивости. При скрещивании линий льна-долгунца, полученных при селекции *in vitro*, с восприимчивыми сортами, устойчивость в последующих поколениях в основном не наследуется. Исключение составили комбинации НЭ-38 × Ленок и НЭ-38 × Росинка с участием устойчивой формы НЭ-38.

UDC 633.521:631.52:632.4

Rising of flax resistances to anthracnose (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) by *in vitro* methods.

N.V. Prolyotova, PhD in biology
All-Russian research institute of flax

128

35, Lunacharskogo str., Torzhok, 172002, Russia
E-mail: nataljaprljotva@rambler.ru

Key words: flax, anthracnose, culture filtrate, *in vitro* selection, resistance, infectious-provocative background.

To increase resistance of fiber flax genotypes to anthracnose, it is possible to use biotechnological methods: *in vitro* selection combined with the culture of immature embryos and selective medium Sh-2. The culture filtrate of anthracnose added to the nutrient medium for the differentiation of flax genotypes resistance may consist of a mixture of strongly virulent (680, 677*), medium virulent (674) and weakly virulent (674*) strains which are taken at equal concentrations of 9 mL per a liter of each strain. In this case, the amount of formed morphogenic callus and the field resistance of the genotype to anthracnose are similar in their values. And it is possible to determine a nature of resistance. When crossing fiber flax lines, obtained after *in vitro* selection, and susceptible varieties, resistance in future generations is generally not inherited. In our experiment, combinations of NE-38 × Lenok and NE-38 × Rosinka using resistant form NE-38 became exceptions.

Введение. Важная роль в повышении эффективности развития отрасли льноводства принадлежит новым сортам льна-долгунца. В производственных условиях реализация биологического потенциала сортов составляет 30–35 %, что обусловлено не только несоблюдением технологии возделывания культуры, но и влиянием неблагоприятных факторов среды. Большинство сортов характеризуется низкой приспособленностью к неблагоприятным абиотическим (засуха, кислотность почвы, низкая температура) и биотическим (болезни – антракноз, бактериоз) факторам среды [1; 2; 3].

Антракноз – болезнь льна, широко распространенная в его посевах. Встречается ежегодно. Во время всходов льна сильное поражение посевов данным патогеном вызывает изреживание стеблестоя, а иногда и полную гибель растений. Однако степень вредоносности антракноза зависит от почвенно-климатических и агротехнических условий выращивания льна-долгунца. В настоящее время проблема устойчивости льна к антракнозу приобретает все большее значение. Идентификация генофонда культуры по данному признаку не позволила выявить устойчивые к патогену формы. Выявлено

ограниченное количество среднеустойчивых форм, которые, как правило, являются межеумками [2].

Определение уровня устойчивости растений льна к антракнозу, а также возможности биотехнологического и селекционного изменения этого уровня, несомненно, является актуальной проблемой.

Материал и методы. В качестве объекта исследования был использован лен культурный (*Linum usitatissimum* L., 2n = 30): 2 сорта льна долгунца Ленок, Росинка, восприимчивые к антракнозу; 21 линия (НЛ-40-2, НЛ-40-1, НО-76, НЭ-38, НЭ-36, НЭ-15 и др.), полученные в лаборатории биотехнологии ВНИИЛ при отборе *in vitro*, относительно устойчивые к антракнозу.

Для создания культурального фильтра использовали сильновирулентные 680, 677*, средневирулентный 674 и слабовирулентный штамм 674* – быстрорастущие штаммы возбудителя антракноза с обильным спороношением.

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

Родительские формы высевали в сосудах Митчерлиха в вегетационном домике согласно методике Доспехова [4]. Размножение гибридного материала и чистых линий льна осуществляли на светоустановке (осенне-зимний период) и в условиях вегетационного домика (весенне-летний период). Скрещивания проводили по схеме:

♀	♂Ленок	♂Росинка
НЭ-36	+	+
НЭ-17	+	+
НЭ-17-5	+	+
НЭ-17-2	+	+
НО-85	+	+
НЭ-38	+	+
НО-65	+	+

Оценку растений-регенерантов и линий выполняли с использованием «Методических рекомендаций по созданию, поддержанию, хранению и практическому

использованию «Коллекции микроорганизмов возбудителей болезней льна» [5].

Селекцию *in vitro* на устойчивость к антракнозу проводили в соответствии с методическими рекомендациями «Получение регенерантов льна-долгунца, устойчивых к антракнозу, методами *in vitro*» [6].

Интенсивность спороношения возбудителя антракноза определяли в капле дистиллированной воды с помощью камеры Горяева с использованием микроскопа МБИ-6. Количество спор в 1 см³ рассчитывали по формуле: $N / 20 \times 10^6$, где N – количество спор в поле зрения микроскопа в камере Горяева.

Фитотоксические свойства культурального фильтрата (КФ) определяли путём замачивания в нём семян льна в течение 24 ч по методике Курчаковой [7].

Результаты и обсуждение. Для культивирования незрелых зародышей на начальном этапе селекции моделировали селективный фон, приближенный к полевым условиям, и использовали для внесения в питательную среду Sh-2 КФ, состоящий из смеси штаммов (два сильновирулентных и по одному средне- и слабовирулентному штамму), взятых в равных количествах (по 1 мл, по 2, 3, 4, 5, 6...11 мл). После 10–14 суток инкубации незрелых зародышей наблюдалось появление двух типов структур – каллуса и (или) побегов. Стимулирование пролиферации каллуса было отмечено при концентрациях КФ 28, 32 и 36 мл/л, что позволило получить, в зависимости от генотипа, первичный морфогенный каллус (15–58 %). В этих вариантах, кроме морфогенных каллусных очагов, формировались стекловидные, слабохлорофилльные побеги. На средах с более низкой концентрацией КФ (4; 8; 12; 16; 20; 24) наблюдалось стремительное нарастание водянистой клеточной биомассы, при этом морфогенные очаги не формировались либо формировались в единичных количествах. В вариантах, где КФ добавляли в среду в количестве 40 и 44 мл/л, формировался твердый каллус без признаков морфогенеза.

На этапе субкультивирования каллуса использовали три концентрации КФ: 32,

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

Морфогенная каллусная ткань, перенесённая в следующих пассажах на среду Sh-2, не содержащую КФ, продолжала развиваться и формировать морфогенные очаги, в которых формировались побеги льна. В результате такой селекции из восприимчивых к антракнозу генотипов получены растения-регенеранты, устойчивые к культуральному фильтрату *in vitro*.

Растения оценивали по устойчивости к антракнозу в условиях *in vitro* и на искусственном инфекционно-провокационном фоне. Для проведения оценки *in vitro* в питательную среду Sh-2 добавляли КФ в концентрации 36 мл/л. Установлено, что процентное количество сформированного морфогенного каллуса в первом и втором пассажах было близким по значению к полевой устойчивости растений к антракнозу. Так, на селективном фоне *in vitro* у линии НЭ-17 × Ленок сформирован в первом пассаже 31 % морфогенных каллусов, во втором – 40 %. Полевая устойчивость на искусственном инфекционно-провокационном фоне была отмечена на уровне 32,5 % (генотип неустойчив к антракнозу). У линии НЭ-38 × Ленок в первом пассаже сформировано 54 % морфогенных каллусов, во втором – 62 %. Полевая устойчивость 62,5 % (генотип устойчив к антракнозу) (табл. 1).

При оценке гибридов F₁₋₃ и их родительских форм на искусственном инфекционно-провокационном фоне в полевых условиях,

Таблица 1

Формирование морфогенного каллуса в культуре незрелых зародышей после 1–3 пассажей в зависимости от генотипа льна с добавлением в питательную среду культурального фильтрата (КФ) возбудителя антракноза в концентрации 36 мл/л

Генотип	Полевая устойчивость к антракнозу, %	Количество морфогенного каллуса после пассажа, % ± Sp		
		1	2	3
Росинка	29	45 ± 3,3	40 ± 3,2	20 ± 4,4
Ленок	38	54 ± 5,2	40 ± 3,2	18 ± 5,1
НЭ-17 × Ленок	32,5	31 ± 4,4	40 ± 3,3	25 ± 4,6
НЭ-38 × Росинка	62,5	70 ± 3,6	60 ± 4,3	54 ± 3,6
НЭ-38 × Ленок	62,5	54 ± 2,8	62 ± 3,5	55 ± 2,2
НЭ-38	66,7	60 ± 3,5	62 ± 2,6	55 ± 2,8
НЭ-17-2	58,3	60 ± 4,4	60 ± 3,7	53 ± 3,4

выявлено, что степень устойчивости гибридов НЭ-38 × Ленок и НЭ-38 × Росинка составила 62,5 % и находилась практически на одном уровне с таковой у исходной формы НЭ-38 (66,7 %), при устойчивости восприимчивых родительских форм 38 (сорт Ленок) и 29 % (сорт Росинка) (табл. 2).

Таблица 2

Устойчивость к антракнозу гибридов льна первого–третьего поколений на инфекционно-провокационном фоне возбудителя антракноза

Гибрид F ₁ –F ₃	Устойчивость, % ± Sp	Родительская форма	Устойчивость, % ± Sp
НЭ-36 × Ленок	25 ± 2,5	НЭ-36	75 ± 1,7
НЭ-17 × Ленок	0 ± 1,4	НЭ-17	57 ± 2,2
НЭ-17-5 × Ленок	25 ± 3,3	НЭ-17-5	75 ± 2,1
НЭ-17-2 × Ленок	41,7 ± 3,7	НЭ-17-2	57 ± 3,2
НО-85 × Ленок	25 ± 1,9	НО-85	43,7 ± 4,4
НЭ-38 × Ленок	62,5 ± 4,4	НЭ-38	66,7 ± 2,1
НО-65 × Ленок	25 ± 2,6	НО-65	45 ± 2,8
НЭ-36 × Росинка	25 ± 2,8	НЭ-36	75 ± 1,4
НЭ-38 × Росинка	62,5 ± 3,1	НЭ-38	66,7 ± 1,3
НЭ-17 × Росинка	0 ± 1,1	НЭ-17	57 ± 2,2
НЭ-38-8 × Росинка	0 ± 1,8	НЭ-38-8	62,5 ± 4,1
НО-65 × Росинка	25 ± 2,2	НО-65	45 ± 3,4
НО-85 × Росинка	0 ± 0,5	НО-85	43,7 ± 1,5
НЭ-17-5 × Росинка	0 ± 1,1	НЭ-17-5	75 ± 2,4
	29 ± 2,4	Росинка	
	38 ± 2,6	Ленок	

При анализе других гибридных комбинаций от скрещивания контрастных по устойчивости форм наблюдалась преимущественно высокая степень поражения гибридов (устойчивость 0–25 %). Следовательно, при скрещивании устойчивых

линий льна-долгунца, полученных при селекции *in vitro*, с восприимчивыми сортами устойчивость в последующих поколениях в основном не наследуется. Исключение составили комбинации НЭ-38 × Ленок и НЭ-38 × Росинка с участием устойчивой формы НЭ-38.

Выводы. В результате проведённых исследований установлено, что для повышения устойчивости генотипов льна-долгунца к антракнозу возможно применять биотехнологические приёмы – селекцию *in vitro* с использованием культуры незрелых зародышей и селективной среды Sh-2. КФ, добавляемый в питательную среду при дифференцировке генотипов льна по устойчивости к антракнозу, может состоять из смеси КФ сильновирulentных (680, 677*), средне-вирulentного (674) и слабовирulentного (674*) штаммов, взятых в равных концентрациях – по 9 мл/л каждого штамма. В этом случае количество сформированного морфогенного каллуса и полевая устойчивость генотипа к антракнозу близки по значению, и можно делать заключение о характере устойчивости. При скрещивании устойчивых линий льна-долгунца, полученных при селекции *in vitro*, с восприимчивыми сортами, устойчивость в последующих поколениях в основном не наследуется. Исключение составили комбинации НЭ-38 × Ленок и НЭ-38 × Росинка с участием устойчивой формы НЭ-38.

Список литературы

1. Пролётова Н.В., Кудрявцева Л.П. Создание *in vitro* новых, устойчивых к болезням сортов льна – один из способов повышения биоразнообразия культуры // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты): материалы VII междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию отдела биотехнологии растений Никитского ботанического сада. – Ялта-Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2016. – С. 50–51.
2. Кудрявцева Л.П., Пролётова Н.В. Методологическое обеспечение селекции льна на устойчивость к антракнозу // Фундаментальные и прикладные исследования в биоорганическом сельском хозяйстве России, СНГ и ЕС: матер. междунар. науч.-практ. конф. – М., 2016. – Т. 2. – С. 149–158.
3. Павлова Л.Н., Александрова Т.А., Марченков А.Н. [и др.]. Новые сорта льна-долгунца – производству // Научные разработки селекцентра – льноводству: результаты науч. исслед. по льну-долгунцу и

льну масличному науч.-исслед. учрежден. селекцентра за 2001–2012 годы. – Тверь: Изд-во Тверского гос. ун-та, 2013. – С. 7–9.

4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Изд. 5-е; перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

5. Методические рекомендации по созданию, поддержанию, хранению и практическому использованию «Коллекции микроорганизмов возбудителей болезней льна». – Торжок, 2006. – 10 с.

6. Пролётова Н.В., Кудрявцева Л.П. Получение регенерантов льна-долгунца, устойчивых к антракнозу методами *in vitro*: Методические рекомендации. – Торжок, 2014. – 20 с.

7. 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 научных трудов ВНИИЛ. – Торжок, 1994. – Вып. 28–29. – С. 127–128.

References

1. Prolyotova N.V., Kudryavtseva L.P. Sozdaniye *in vitro* novykh, ustoychivyykh k boleznyam sortov l'na – odin iz sposobov povysheniya bioraznoobraziya kul'tury // Biotekhnologiya kak instrument sokhraneniya bioraznoobraziya rastitel'nogo mira (fiziologo-biokhimicheskiye, embriologicheskiye, geneticheskiye i pravovyye aspekty): materialy VII mezhdunar. nauch.-prakt. konf., posvyashch. 30-letiyu otdela biotekhnologii rasteniy Nikitskogo botanicheskogo sada. – YAlta-Simferopol': IT «ARIAL», 2016. – S. 50–51.
2. Kudryavtseva L.P., Prol'tova N.V. Metodologicheskoye obespecheniye selektsii l'na na ustoychivost' k antraknozu // Fundamental'nyye i prikladnyye issledovaniya v bioorganicheskom sel'skom khozyaystve Rossii, SNG i ES: mater. mezhdunar. nauch.-prakt. konf. – M., 2016. – T. 2. – S. 149–158.
3. Pavlova L.N., Aleksandrova T.A., Marchenkov A.N. [i dr.]. Novyye sorta l'na-dolguntsa – proizvodstvu // Nauchnyye razrabotki selektsentra – l'novodstvu: rezul'taty nauch. issled. po l'nu-dolguntsu i l'nu maslichnomu nauch.-issled. uchrezhden. selektsentra za 2001–2012 gody. – Tver': Izd-vo Tverskogo gos. un-ta, 2013. – S. 7–9.
4. Dospekhov B.A. Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy). Izd. 5-e; pererab. i dop. – M.: Agropromizdat, 1985. – 351 s.
5. Metodicheskiye rekomendatsii po sozdaniyu, podderzhaniyu, khraneniyu i prakticheskomu ispol'zovaniyu «Kollektsii mikroorganizmov vzbuditeley bolezney l'na». – Torzhok, 2006. – 10 s.
6. Prol'tova N.V., Kudryavtseva L.P. Polucheniye regenerantov l'na-dolguntsa, ustoychivyykh k antraknozu metodami *in vitro*: Metodicheskiye rekomendatsii. – Torzhok, 2014. – 20 s.
7. Kurchakova L.N. Metodika polucheniya kul'tural'nykh fil'tratov griba *Fusarium oxysporum* i *F. semitectum* i ikh primeneniye v kul'ture *in vitro* dlya polucheniya fuzariozoustoychivyykh form l'na-dolguntsa // Sbornik nauchnykh trudov VNIIL. – Torzhok, 1994. – Vyp. 28–29. – S. 127–128.

Получено: 30.05.2018 Принято: 17.09.2018

Received: 30.05.2018 Accepted: 17.09.2018