УДК 633.521: 631.52: 632.4 DOI:10.31677/2072-6724-2020-56-3-66-75

ЗАВИСИМОСТЬ ФИТОТОКСИЧНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНТРАКНОЗА ЛЬНА *COLLETOTRICHUM LINI* MANNS ET BOLLEY ОТ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА

Н. В. Пролётова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок, Россия

E-mail: nataljaprljotva@rambler.ru

***Ключевые слова*: лен, антракноз, устойчивость, селективный агент, культуральный фильтрат, аминокислоты**

Реферат. ***Цель работы – определение аминокислотного состава культуральных фильтратов штаммов гриба – 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. Установлено, что в культуральных фильтратах штаммов 527 и 608 присутствуют такие аминокислоты, как аланин, глицин, аспарагин, цистеин, треонин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, а также аргинин у сильновирулентного штамма 527 и следы тирозина и лизина у слабовирулентного штамма 608. К 40-м суткам культивирования запас питательных веществ в среде культивирования, по-видимому, был исчерпан, и для жизнеобеспечения гриб начал использовать продукты своей жизнедеятельности. В культуральном фильтрате сильновирулентного штамма 527 концентрация всех определённых аминокислот была значительно выше, чем в культуральном фильтрате слабовирулентного штамма 608. Показано, что наибольшей токсичностью обладал 23-суточный культуральный фильтрат сильновирулентного штамма 527. Прирост корешков и гипокотилей льна при использовании культурального фильтрата сильновирулентного штамма 527 был меньшим у всех генотипов, взятых в исследования. Токсичность культурального фильтрата зависела от вирулентности штамма возбудителя антракноза – культуральный фильтрат сильновирулентного штамма более токсичен, чем слабовирулентного. 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, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, существует возможность индуцирования роста и развития клеток льна в условиях in vitro. По мере роста мицелия гриба в культуральных фильтратах происходило снижение концентраций 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).***

DEPENDENCE OF PHYTOTOXICITY OF CULTURAL FILTRATES OF THE FLAX ANTHRACNOSE PATHOGEN COLLETOTRICHUM LINI MANNS ET BOLLEY STRAINS ON THE AMINO ACID COMPOSITION

N.V. Proletova, Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher

Federal Scientific Center for Bast Crops, Torzhok, Russia

Key words: flax, anthracnose, resistance, selective agent, culture filtrate, amino acids.

Abstract. *The aim of this work is to determine the amino acid composition of the cultural filtrates of the flax anthracnose fungus Colletotrichum lini Manns et Bolley strains to adjust the concentration of the selective agent in the nutrient medium when creating new flax genotypes resistant to anthracnose in vitro. It was found that the cultural filtrates of strains 527 and 608 contain such amino acids as alanine, glycine, asparagine, cysteine, threonine, aspartic acid, glutamic acid, as well as arginine in the highly virulent strain 527. The traces of tyrosine and lysine in the weakly virulent strain 608 were also found. On the day of cultivation, the supply of nutrients in the cultivation medium was apparently depleted, and the fungus began to use the products of its vital activity for life support. In the culture filtrate of the highly virulent strain 527, the concentration of all certain amino acids was significantly higher than in the culture filtrate of the weakly virulent strain 608. It was shown that the 23-day culture filtrate of the highly virulent strain 527 had the highest toxicity which is lower than in all genotypes taken in the study. The toxicity of the culture filtrate depends on the virulence of the anthracnose pathogen strain. The culture filtrate of a highly virulent strain is more toxic than a weakly virulent one. The presence of cysteine in the culture filtrates of the strains increases the possibility of inhibiting the growth and development of flax cells in in vitro culture. When using the culture filtrate of anthracnose pathogen strains containing asparagine, glutamine, serine, glycine, aspartic and glutamic acids, 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 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 during the entire study period (up to 42 days).*

Одним из лимитирующих факторов возделывания льна является поражаемость патогенами. Из комплекса болезней, встречающихся на культуре, к числу наиболее вредоносных относится 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 [1–3].

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. 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 [4–6]. Те токсины, которые продуцирует гриб – возбудитель болезни, влияют на жизнедеятельность клеток и тканей льна и способствуют возникновению угнетений с последующим снижением продуктивности растений льна [17].

Возбудитель антракноза льна *Colletotrichum lini* Manns et Bolley относится к группе несовершенных грибов, порядку спородохиальные, роду *Colletotrichum*. В процессе своего развития гриб формирует под кутикулой спороложа, в которых образуются щетинки и короткие конидиеносцы. По мере роста щетинок и кониединосцев эпидермис прорывается, и конидиеносцы выносят конидии наружу [5]. 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, слабоизогнутые или прямые, с закруглёнными концами. Размер конидий 14,3–21, 4 х 2, 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, 5]. Возбудители антракноза сохраняют свою жизнеспособность 5–6 лет.

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 – сомаклонов, устойчивых к патогену [8]. 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 [9]. 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.

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 культу-

ральных фильтратов штаммов, используемых в исследованиях.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на базе лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института льна (ВНИИЛ) в 2010–2018 гг. 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 – сильновирулентные, быстрорастущие, с обильным спороношением. Штамм 419 – средневирулентный, быстрорастущий, с обильным спороношением. Штамм 608 – слабовирулентный, 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. Они характеризовались высокими показателями хозяйственно-ценных признаков и восприимчивостью к антракнозу.

Схема проведения исследований включала следующие этапы.

1. Культивирование мицелия гриба на жидкой среде Sh-2, не содержащей регуляторы роста, в течение 50 суток (рис. 1). Использовали модифицированную методику М. А. Проценко с соавторами [10]. Интенсивность спороношения биообразцов определяли в капле дистиллированной воды с помощью камеры Горяева под микроскопом МБИ-6. Количество спор в 1 см^3 рассчитывали по формуле: $N / 20 \times 10^6$, где N – количество конидий в поле зрения микроскопа в камере Горяева.

а *б*

Рис. 1. Рост мицелия возбудителя антракноза:
а – на твердой питательной среде; б – на жидкой питательной среде
Growth of the mycelium of the anthracnose pathogen:
a – on a solid nutrient medium; b – on a liquid nutrient medium

2. Определение аминокислотного состава культурального фильтрата (КФ) штаммов 608, 527 на 9, 23, 40-е сутки. Аминокислотный состав КФ определяли методом бумажной хроматографии [11].

3. Определение оптической плотности КФ штаммов 419 и 639 на 7, 14, 23, 30, 40, 50-е сутки. Оптическую плотность КФ штаммов определяли по методу биуретовой реакции, основанному на образовании биуретового комплекса пептидных связей белков с двухвалентными ионами меди [11].

4. Визуальная оценка прироста биомассы гриба–возбудителя антракноза на 7, 14, 23, 33, 40 и 50-е сутки и определение токсичности культурального фильтрата.

Фитотоксические свойства КФ определяли путём проращивания на нём семян по методике Л. Н. Курчаковой [12]. Контроль – проращивание семян льна на воде.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel с использованием метода первичной статистической обработки результатов эксперимента – определения выборочной средней величины.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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, глютаминовая кислота, а также аргинин у сильновирулентного штамма 527 и следы тирозина и лизина у слабовирулентного 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 и как селективный фактор, и как фактор, 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 (сильновирулентного штамма 527 и слабовирулентного штамма 608) повышалась в течение всего периода культивирования. Содержание аспарагина, аспарагиновой и глутаминовой кислот в КФ штамма 608 к 40-м 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-м суткам культивирования запас питательных веществ в среде, по-видимому, был исчерпан, и для жизнеобеспечения гриб начал использовать продукты своей жизнедеятельности.

Таблица 1

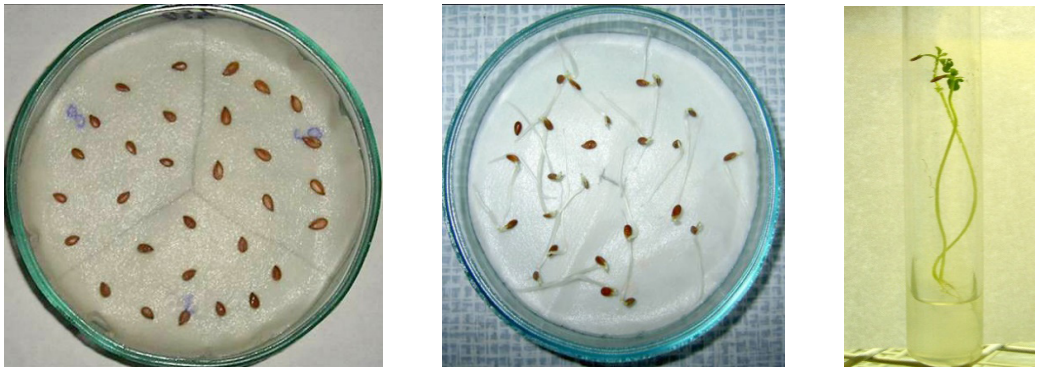
Аминокислотный состав культуральных фильтратов штаммов возбудителя антракноза льна *Colletotrichum lini*

Amino acid composition of culture filtrates of flax anthracnose pathogen strains *Colletotrichum lini*

Аминокислота	Концентрация, мкг/л				
	Штамм 608			Штамм 527	
	9-е сутки	23-и сутки	40-е сутки	9-е сутки	23-и 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		

В результате исследований выявлено, что в КФ сильновирулентного штамма 527 концентрация всех определённых аминокислот была значительно выше, чем в КФ слабовирулентного штамма 608. На 23-и сутки отмечено, что в КФ сильновирулентного штамма 527 содержание цистеина выше в 9,4 раза (26,2 и 2,8 мкг/л соответственно), а глицина – в 5,4 раза (24,3 и 4,5 мкг/л соответственно), чем в КФ слабовирулентного штамма 608, т.е. сильновирулентный штамм к 23-м суткам продуцирует и выделяет в КФ цистеин, который является сильнейшим ингибитором роста растительных клеток, гораздо больше, чем слабовирулентный, что способствует повышению токсичности КФ. В то же время концентрация глицина, способствующего росту клеток льна in vitro, также 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 гипокотилей четырех генотипов льна путем проращивания семян льна на фильтровальной бумаге, смоченной КФ, и на селективной среде, содержащей КФ штаммов возбудителя антракноза (рис. 2).



а *б* *в*

Рис. 2. 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-е сутки; в – гипокотели льна на 8-е сутки
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 – sprouted flax seeds on the 8th day; c – flax hypocotels on the 8th day

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-е 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 22,3 % (7,8 мм) у КФ штамма 608; 19,5 % (7,4 мм) – у КФ штамма 527. При анализе средней длины гипокотиля (проращивание семян льна на селективной среде, содержащей КФ) у всех генотипов, взятых в исследования, 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 и 8,2 % – у линии Л 1506–8–4). В то же время на селективной среде, содержащей КФ сильновирулентного штамма 527, средняя длина гипокотиля была ниже (14,4; 11,7; 17,9; 7,5 % соответственно). Это подтверждает, что КФ сильновирулентного штамма обладал большей токсичностью, чем КФ слабовирулентного штамма.

Таблица 2

Влияние 23-суточного КФ штаммов возбудителя антракноза льна *Colletotrichum lini* на величину проростков
Influence of 23-day CF of flax anthracnose pathogen Colletotrichum lini strains on seedling size

Генотип льна	Средняя длина корешка, мм ± Sp						Средняя длина гипокотеля, мм ±Sp					
	3-и сутки	% к контролю	8-е сутки	% к контролю	15-е сутки	% к контролю	3-е сутки	% к контролю	8-е сутки	% к контролю	15-е сутки	% к контролю
Пенджаб												
КФ штамма 608	1,00± 0,10	12,5	7,10 ± 0,20	23,7	16,30± 0,16	20,9	0	0	1,00± 0,20	12,5	23,00± 0,40	29,1
КФ штамма 527	1,00± 0,08	12,5	4,90± 0,16	16,3	13,30± 0,20	17	0	0	1,00± 0,17	12,5	11,90 ± 0,22	14,4
Алексим												
КФ штамма 608	2,00± 0,10	19,4	8,10± 0,10	20,3	13,00± 0,17	21,5	7,1	10,80± 0,10	34,40± 0,22	39,8	2,00± 0,13	19,4
КФ штамма 527	1,20± 0,15	11,7	6,20± 0,06	15,5	10,80± 0,10	17,9	4,4	6,70± 0,10	18,90± 0,24	21,9	1,20± 0,08	11,7
Л 957–8–4												
КФ штамма 608	0,70± 0,22	25	4,30± 0,20	23,5	7,80± 0,20	22,3	10	25,30± 0,12	12,50± 0.15	24,4	0,70± 0,16	25,0
КФ штамма 527	0,50± 0,03	17,9	3,70± 0,17	20,2	7,40± 0,13	19,5	2,9	7,30± 0,08	12,40± 0,13	20,8	0,50± 0,15	17,9
Л 1506–8–4												
КФ штамма 608	0,80± 0,10	8,2	4,80± 0,12	13	9,50± 0,22	13,8	3,3	6,50± 0,03	11,70± 0,14	15,1	0,80± 0,15	8,2
КФ штамма 527	0,70± 0,05	7,5	3,40± 0,15	9,3	7,00± 0,22	10,4	0	0	8,90± 0,20	11,5	0,70± 0,12	7,5

Из полученных данных следует, что токсичность культурального фильтрата зависела от вирулентности штамма возбудителя антракноза – КФ сильновирулентного штамма более токсичен, чем КФ слабовирулентного, и, возможно, одним из слагающих токсичности является наличие цистеина, отличающегося 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-е 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-х 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 штаммов 419 и 639 установлено на 14-е 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 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 со-

ставе 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-е сутки отмечено в КФ штаммов 419 и 639. Концентрация его в КФ средневирулентного штамма 419 составляла C = $1{,}1 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (глутамина) = $1{,}12 \cdot 10^{-2}$ г, в КФ сильновирулентного штамма 639 – C = $7{,}4 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (глутамина) = $7{,}5 \cdot 10^{-2}$ г. Концентрация глутамина в 6,7 раза выше в КФ штамма 639, чем в КФ штамма 419. Роль глутамина как аминокислоты – группирование азотистого обмена. К тому же он 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-е 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 также 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-е сутки культивирования на питательной среде гриба – возбудителя антракноза. Концентрация аспарагина в КФ штамма 419 составляла C = $1{,}4 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (аспарагина) = $1{,}3 \cdot 10^{-2}$ г; в КФ штамма 639 – C = $2{,}0 \cdot 10^{-1}$ моль/л, m (аспарагина) = $1{,}8 \cdot 10^{-2}$ 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-е 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 амидиновой группы (NH_2-CNH), расположенной у β-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 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).

ВЫВОДЫ

1. В культуральных фильтратах исследуемых штаммов 527 и 608 присутствуют такие аминокислоты, как аланин, глицин, аспарагин, цистеин, треонин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, а также аргинин у сильновирулентного штамма 527 и следы тирозина и лизина у слабовирулентного штамма 608.

2. В КФ сильновирулентного штамма 527 концентрация всех определённых аминокислот была значительно выше, чем в КФ слабовирулентного штамма 608.

3. 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 цистеина, отличающегося 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 in vitro. В то же время при использовании КФ штаммов возбудителя антракноза, содержащего аспарагин, глутамин, серин, глицин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, существует возможность индуцирования роста и развития клеток льна в условиях in vitro.

4. При культивировании гриба – возбудителя антракноза на питательной среде по мере роста мицелия гриба в КФ происходило снижение концентраций 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).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Руцкая В.И.* Антракноз люпина и его биологические особенности // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2018. – № 4 (28). – С. 130–135.
2. *Кудрявцева Л.П., Прасолова О.В.* Групповая устойчивость сортов – важный приоритет селекции льна-долгунца // Аграрный вестник Верхневолжья. – 2018. – № 3 (24). – С. 25–30.
3. *Research* of Genetic Polymorphism Species Linum usitatissimum L. on a Basis a RAPD-Method / T.A. Rozhmina, Y.B. Fu, A. Diederichsen [et al.] // Journal of Natural Fibers. – 2018. – Vol. 15, Is. 2. – P. 155–161.
4. *Полуэктова Е.В., Берестецкий А.О.* Грибы рода *Colletotrichum* как продуценты биологически активных соединений и биогербицидов // Микология и фитопатология. – 2018. – Т. 52, № 6. – С. 367–381.
5. *Карпунин Б.Ф.* Антракноз льна: селекция на устойчивость. – Lap Lambert Academic Publishing, 2016. –113 с.
6. *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. – Т. 51, № 3. – С. 310–317.
7. *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.
8. *Пролётова Н.В.* Использование биотехнологических методов для создания новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – Т. 33, № 8. – С. 24–28.

9. *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). – С. 128–131.
10. *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. – Т. 34, № 1. – С. 45–51.
11. *Рудаков О.Б., Рудакова Л.В., Букша М.С.* Генотипическая изменчивость аминокислотного состава белков животного и растительного происхождения // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2020. – № 20 (1). – С. 8–21.
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 // Сборник научных трудов ВНИИЛ. – Торжок, 1994. – Вып. 28–29. – С. 127–128.
13. *Справочник* биохимика / Р. Досон, У. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 250 с.

REFERENCES

1. Ruckaya V.I. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2018, No. 4 (28), pp. 130–135. (In Russ.)
2. Kudryavceva L.P., Prasolova O.V. *Agrarnyj vestnik Verhnevolzh'ya*, 2018, No. 3 (24), pp. 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, Vol. 15, Is. 2, pp. 155–161.
4. Poluektova E.V., Beresteckij A.O. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2018, T. 52, No. 6, pp. 367–381. (In Russ.)
5. Karpunin B.F. *Antraknoz l'na: selekciya na ustojchivost»* (Anthracnose of flax: breeding for resistance). Lap Lambert Academic Publishing, 2016, 113 p.
6. Rozhmina T.A., Loshakova N.I. *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*, 2016, T. 51, No. 3, pp. 310–317. (In Russ.)
7. Jayawardena R.S., Li X.H., Liu M., et al. Colletotrichum: Biological control, bio-catalyst, secondary metabolites and toxins. *Mycosphere*, 2016, Vol. 7 (8), pp. 1164–1176.
8. Prolyotova N.V. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2019, T. 33, No. 8, pp. 24–28. (In Russ.)
9. Prolyotova N.V. *Maslichnye kul'tury: nauchno-tekhnicheskij byulleten» Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnyh kul'tur* (Oilseeds: scientific and technical Bulletin of the all-Russian research Institute of oilseeds), 2018, No. 3 (175), pp. 128–131. (In Russ.)
10. Procenko M.A., Kostina N.E., Teplyakova T.V. *Biotekhnologiya,* 2018, T. 34, No. 1, pp. 45–51. (In Russ.)
11. Rudakov O.B., Rudakova L.V., Buksha M.S. *Sorbcionnye i hromatograficheskie processy*, 2020, No. 20 (1), pp. 8–21. https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/2375. (In Russ.)
12. Kurchakova L.N. *Sbornik nauch. trudov VNIIL*, Torzhok, 1994, Vol. 28–29, pp. 127–128. (In Russ.)
13. Doson R., Elliot U., Elliot U., Dzhons K. *Spravochnik biohimika* (Biochemist's Handbook), Moscow: Mir, 1991, 250 p.