

УДК 633.521: 631.52: 632.4

DOI 10.18286/1816-4501-2020-4-121-127

## АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТАХ ГРИБА – ВОЗБУДИТЕЛЯ АНТРАКНОЗА *COLLETOTRICHUM LINI*

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@fnck.ru

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

Исследования проводили на базе лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института льна (Тверская обл.) в 2010–2012, 2016 гг. Цель работы состояла в определении аминокислотного и белкового состава культуральных фильтратов гриба – возбудителя антракноза *Colletotrichum lini* Manns et Volley для корректировки концентрации селективного агента в питательной среде при создании *in vitro* новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу. Установлено, что в культуральных фильтрах штаммов 527 и 608 присутствуют такие аминокислоты, как аланин, глицин, аспарагин, цистеин, треонин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, а также аргинин – у штамма 527 и следы тирозина и лизина – у штамма 608. Установлено, что в КФ штамма 527 концентрация аминокислот была значительно выше, чем в культуральном фильтрате 608 штамма. Показано, что токсичность культурального фильтра зависела от степени агрессивности штамма возбудителя антракноза – культуральный фильтр сильно агрессивного штамма более токсичен, чем культуральный фильтр слабо агрессивного штамма. Исследования позволили выявить, что при культивировании гриба – возбудителя антракноза на питательной среде по мере роста мицелия гриба в культуральных фильтрах происходило снижение концентраций аспарагина, аланина, аспарагиновой и глютаминовой кислот, глицина. Установлено, что изменение количества белков происходило в течение всего периода культивирования мицелия гриба на жидкой питательной среде. Показано, что накопление и содержание белков в культуральных фильтрах штаммов различной агрессивности происходит по-разному. Более агрессивный штамм (639), обладающий большей токсичностью, содержит и накапливает в среде культивирования в течение всего периода роста и развития большее количество белков, чем штамм менее агрессивный (419).

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

### Введение

Поражаемость льна патогенами является одним из лимитирующих факторов его возделывания. Из комплекса болезней, встречающихся на культуре, вредоносной является антракноз – заболевание, возбудителем которого является несовершенный гриб *Colletotrichum lini* Manns et Volley. Патоген может поражать различные части льна (всходы, стебли, листья, коробочки, семена) в течение всего вегетационного периода. Антракноз льна распространяется с остатками растений, семена-

ми, насекомыми, дождем, ветром, через почву, а также при контакте больных и здоровых растений [1, 2, 3]. Развитию антракноза льна способствует влажная теплая погода, а также поздние сроки посева и легкие кислые почвы. При заражении антракнозом растения покрываются бурыми пятнами и вылегают. Наибольшую опасность антракноз представляет для всходов льна. Выжившие растения отстают в росте. Это снижает урожайность и затрудняет механизированную уборку. При сильном развитии инфекции недобор льноволокна дости-

гает 30%. Кроме того, всхожесть семян, собранных с инфицированных растений, гораздо ниже, чем у здоровых. Солома пораженных растений легкая и ломкая, волокно низкого качества [1, 2, 4]. Агрессивность возбудителя антракноза объясняется высокой воспроизводимостью патогена. В то же время патогенность и вирулентность антракноза — свойства, более стабильные, чем агрессивность. Агрессивность, в отличие от вирулентности и патогенности, может варьировать в зависимости от условий окружающей среды [5, 6, 7].

Все большее значение в настоящее время приобретает проблема устойчивости льна к антракнозу. Протравливание семян химическими средствами создает дополнительную экологическую нагрузку и приводит к снижению ареала использования льнопродукции [1, 2]. А создание новых, устойчивых к антракнозу сортов льна селекционными методами является одним из путей решения проблемы устойчивости [8, 9]. Актуальным является получение нового селекционного материала льна с использованием селективных систем *in vitro*, имитирующих искусственный инфекционный фон [10]. Создание таких условий обеспечивает проявление генов устойчивости, и при этом создается возможность отбора нужных вариантов клеток. Для создания новых форм — соматклонов, устойчивых к патогену, селективные агенты в питательную среду вносят отдельно и в различных комбинациях на этапах пролиферации и морфогенеза каллусной ткани [11, 12]. Подобные биотехнологические приемы позволяют проводить *in vitro* отбор клеток, устойчивых к селективному агенту, а в последующем и растений-регенерантов, устойчивых к антракнозу. При этом уменьшаются физические объемы экспериментального материала, трудозатраты и значительно сокращаются сроки создания новых высокопродуктивных сортов льна. В качестве селективного агента при селекции *in vitro* на устойчивость к антракнозу используют культуральные фильтраты штаммов возбудителя [13, 14]. Штаммы патогена различаются по культурально-морфологическим признакам, и, соответственно, культуральные фильтраты, полученные на основе этих штаммов, различаются между собой. Характеристика культуральных фильтратов во многом зависит от вирулентности используемого штамма, его агрессивности и концентрации продуктов жизнедеятельности, выделенных в среду культивирования. Поэтому необходимость определения аминокислотного состава культурального фильтрата и содержания в нём белков в динамике возникла в процессе решения вопроса о структуре метаболитов штаммов гриба, продуцируемых его

клетками в среду культивирования, токсичности такой среды для клеток льна.

#### Материалы и методы исследований

Исследования проводили на базе Всероссийского научно-исследовательского института льна в лаборатории биотехнологии в период 2010–2012, 2016 годов. Объектом исследований были штаммы гриба – возбудителя антракноза льна *Colletotrichum lini* Manns et Bolley. Штаммы патогена из коллекции микроорганизмов – возбудителей болезней льна любезно предоставлены ведущим научным сотрудником лаборатории иммунитета Кудрявцевой Л.П. Штаммы возбудителя антракноза 527, 639 характеризовались как агрессивные, сильновирulentные, быстрорастущие, с обильным спороношением. Штамм возбудителя антракноза 419 – умеренно агрессивный, средневирulentный, быстрорастущий, с обильным спороношением. Штамм возбудителя антракноза 608 – слабо агрессивный, слабовирulentный, 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, характеризовались высокими показателями хозяйственно-ценных признаков, восприимчивостью к антракнозу.

Схема исследований:

1. Культивирование мицелия гриба в течение 50 суток на жидкой среде Sh-2, не содержащей регуляторы роста, согласно модифицированной методике Проценко М.А. с соавторами [15].

2. Определение интенсивности спороношения штаммов антракноза в капле дистиллированной воды с помощью камеры Горяева под микроскопом МБИ-6.

3. Расчёт количества спор патогена в  $1 \text{ см}^3$  по формуле:  $N / 20 \times 10^6$ , где N – количество конидий в поле зрения микроскопа в камере Горяева.

4. Определение аминокислотного состава культурального фильтрата (КФ) штаммов 608, 527 на 9, 23, 40 сутки методом распределительной восходящей бумажной хроматографии [16].

5. Расчет содержания белков в культуральных фильтратах штаммов 419 и 639 из уравнения калибровочной кривой, полученной по стандартным растворам кристаллического белка [17].

6. Визуальная оценка прироста биомассы гриба – возбудителя антракноза на 7, 14, 28, 35, 40 и 50 сутки.

7. Определение фитотоксических свойств КФ путём проращивания семян льна на фильтровальной бумаге, смоченной КФ по методике Курчаковой [18]. Контроль – проращивание семян льна на воде.

Таблица 1

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

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

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

#### Результаты исследований

Грибы рода *Colletotrichum* производят разнообразные вещества, которые по-разному взаимодействуют с биологическими объектами. У грибов этого рода состав имеющихся биологически активных соединений не такой широкий, как, например, у фитопатогенных грибов из родов *Alternaria*, *Fusarium* и *Phoma*. К токсиногенным видам не отнесен ни один представитель рода *Colletotrichum* [2, 5, 7]. Те токсины, которые продуцирует гриб – возбудитель антракноза, влияют на жизнедеятельность клеток и тканей льна и способствуют возникновению угнетений с последующим снижением продуктивности растений льна [7].

Культуральный фильтрат штаммов гриба – возбудителя антракноза используют в исследованиях для получения *in vitro* новых форм льна, устойчивых к данной болезни. Токсичность культурального фильтрата определена содержанием в нём веществ, ингибирующих рост и развитие клеток льна. Для определения таковых мы изучили аминокислотный состав культуральных фильтратов штаммов, используемых в исследованиях.

На начальном этапе в культуральных фильтратах штаммов 527 и 608 определяли аминокислоты. В результате анализа полученных данных установлено, что аминокислоты глицин, аланин, аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота, цистеин, треонин присутствуют в культуральных фильтратах штаммов 527 и 608. Аргинин был обнаружен в культуральном фильтрате агрессивного сильновирulentного штамма 527, а следы тирозина и лизина – в

КФ слабо агрессивного слабовирulentного штамма 608 (табл. 1).

Анализ динамики роста мицелия гриба – возбудителя антракноза льна на жидкой питательной среде показал, что в культуральных фильтратах обоих штаммов (агрессивного сильновирulentного штамма 527 и слабо агрессивного слабовирulentного, 608) концентрация аланина, глицина, цистеина, треонина повышалась в течение всего периода культивирования. Содержание аспарагина, аспарагиновой и глутаминовой кислот в КФ штамма 608 к 40 суткам культивирования мицелия гриба снижалось. К 40 суткам культивирования запас питательных веществ в среде культивирования был исчерпан и, по-видимому, для жизнеобеспечения гриб начал использовать продукты своей жизнедеятельности.

В результате исследований выявлено, что в КФ агрессивного сильновирulentного штамма 527 концентрация всех определённых аминокислот была значительно выше, чем в КФ слабо агрессивного слабовирulentного 608 штамма. На 23 сутки отмечено, что в КФ штамма 527 содержание цистеина в 9,4 раза выше (26,2 и 2,8 мкг/л, соответственно), а глицина – в 5,4 раза выше (24,3 и 4,5 мкг/л, соответственно), чем в КФ штамма 608. К 23 суткам агрессивный сильновирulentный штамм в большем количестве, чем слабо агрессивный слабовирulentный штамм, продуцирует и выделяет в КФ цистеин, который является веществом, подавляющим или значительно тормозящим рост растительных клеток. В то же время концентрация глицина, способствующего росту клеток льна *in vitro*, так же выше у агрессивного сильновирulentного штамма 527, чем у слабо агрессивного слабовирulentного 608 штамма.

Токсичность полученных культуральных фильтратов оценивали по длине корешка проростков и гипокотелей четырех генотипов льна путем

проращивания семян льна на фильтровальной бумаге, смоченной КФ, и на селективной среде, содержащей КФ штаммов возбудителя антракноза.

Анализ токсичности культуральных фильтратов в период роста мицелия гриба показал, что наибольшей токсичностью обладал 23-х суточный КФ агрессивного сильновирulentного штамма 527 (табл. 2). Прирост корешков и гипокотелей льна при использовании КФ штамма 527 был меньшим у всех генотипов, взятых в исследования. Так, например, у генотипа Пенджаб при анализе на 15 сутки средней длины корешка (проращивание семян на фильтровальной бумаге, смоченной КФ) установлено, что у КФ штамма 608 (слабо агрессивного слабовирulentного) эта величина составила 20,9 % к контролю (16,3 мм), у КФ штамма 527 (агрессивного сильновирulentного) – 17 % (13,3 мм). У генотипа Л 957-8-4 этот показатель составил, соответственно, 22,3 % (7,8 мм) – у КФ штамма 608, 19,5 % (7,4 мм) – у КФ штамма 527. При анализе средней длины гипокотеля (проращивание семян льна на селективной среде, содержащей КФ) у всех генотипов, взятых в исследования, эта величина была выше у КФ слабо агрессивного штамма (29, % - у сорта Пенджаб, 19,4 % - у сорта Алексим, 25 % - у линии Л 957-8-4, 8,2 % - у линии Л 1506-8-4). В то время, как на селективной среде, содержащей КФ агрессивного штамма 527, средняя длина гипокотеля была ниже (14,4 %; 11,7 %; 17,9 %; 7,5 %, соответственно).

Как показали результаты проведенных исследований, токсичность культурального фильтрата зависела от агрессивности и степени вирулентности штамма возбудителя антракноза – КФ агрессивного сильновирulentного штамма более токсичен, чем КФ слабо агрессивного слабовирulentного штамма. Возможно, что наличие в культуральном фильтрате цистеина, отличающегося высокой реакционной способностью, и тирозина является одним из факторов токсичности КФ.

**Белки** — неперидические полимеры, мономерами которых являются  **$\alpha$ -аминокислоты**. Свойства белков определяют аминокислотный состав и структура белковой молекулы. Белки сочетают в себе основные и кислотные свойства, которые определяются радикалами аминокислот. Чем больше кислых аминокислот в белке, тем ярче выражены его кислотные свойства и, соответственно, чем больше нейтральных аминокислот, тем больше проявляются основные свойства белка. В то же время могут вызывать нарушение структурной организации молекулы белка такие внешние факторы, как нагревание, ультрафиолетовое излучение, тяжелые металлы и их соли, изменения pH, радиация, обезвоживание [19].

Анализ полученных результатов исследований показал, что в течение всего периода культивирования на жидкой питательной среде мицелия гриба – возбудителя антракноза льна в культуральных фильтратах происходило изменение коли-

Таблица 2

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

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

чества белков. Причем, до 28 суток происходило накопление белков в КФ как умеренно агрессивного средневирulentного штамма 419 (оптическая плотность 0,241), так и в КФ агрессивного сильно-вирулентного штамма 639 (оптическая плотность 0,343). В процессе дальнейшего культивирования концентрация белков, а, следовательно, и оптическая плотность белков в культуральных фильтратах уменьшалась и составляла на 50 сутки культивирования в КФ штамма 419 0,049, а в КФ штамма 639 – 0,096. Полученные результаты показывают, что оптическая плотность белков была выше у КФ агрессивного сильновирулентного штамма 639 на 28 сутки культивирования штаммов на питательной среде (период наибольшего накопления (концентрации) белков), так и на 50 сутки культивирования штаммов.

В результате исследований установлено, что более интенсивно накопление белков в культуральном фильтрате происходило при культивировании мицелия агрессивного сильновирулентного штамма 639. Концентрация белков в КФ этого штамма была выше, чем в КФ умеренно агрессивного средневирulentного штамма 419 в течение всего периода культивирования штаммов на питательной среде. Анализ полученных данных показал, что на 7 сутки культивирования штаммов концентрация (С) белка в КФ штамма 419 составила 0,172 мг/10 мл, а в КФ штамма 639 была в 1,9 раза выше – С=0,325 мг/10 мл.

Дальнейшая динамика накопления белков выглядела следующим образом. Концентрация белка в КФ штамма 419 на 14 сутки культивирования составила 0,999 мг/10 мл, в КФ штамма 639 – С=1,45 мг/10 мл (в 1,45 раз выше). Накопление белков в КФ агрессивного сильновирулентного штамма 639 происходило более продуктивно, чем в КФ умеренно агрессивного средневирulentного штамма 419. На 21 сутки концентрация белка в КФ штамма 419 составляла С=1,14 мг/10 мл, а в КФ штамма 639 – С=1,61 мг/10 мл (в 1,41 раза выше). На 28 сутки – С=1,22 мг/10 мл (КФ штамма 419), С=1,69 мг/10 мл (в 1,39 раза выше в КФ штамма 639). При дальнейшем культивировании штаммов на питательной среде было выявлено, что количество белков в КФ снижалось. На 35 сутки концентрация белка в КФ штамма 419 составила 0,824 мг/10 мл, штамма 639 – С=1,17 мг/10 мл (в 1,4 раза выше). На 42 сутки – С=0,312 мг/10 мл (КФ штамма 419), С=0,392 мг/10 мл (в 1,3 раза выше в КФ штамма 639). Следовательно, накопление и содержание белков в КФ штаммов различной вирулентности происходит по-разному. Более вирулентный штамм (639), обладающий большей токсичностью,

содержит и накапливает в среде культивирования в течение всего периода роста и развития большее количество белков, чем штамм менее вирулентный (419). Можно предположить, что и количество аминокислот в связи с этим больше у агрессивного сильновирулентного штамма, чем у агрессивного средневирulentного.

#### **Обсуждение**

Исследования культуральных фильтратов штаммов возбудителя антракноза, проведенные с целью определения аминокислотного и белкового составов культуральных фильтратов гриба – возбудителя антракноза *Colletotrichum lini* Manns et Bolley, позволили выявить аспекты, влияющие на токсичность культуральных фильтратов. Полученные данные будут использованы при создании селективного фона для корректировки концентрации селективного агента в питательной среде с целью получения растений-регенерантов льна, устойчивых *in vitro* к культуральному фильтрату патогена, а в дальнейшем – новых генотипов льна, устойчивых к антракнозу.

#### **Заключение**

Установлено, что аминокислоты глицин, аланин, аспарагиновая кислота, аспарагин, глютаминовая кислота, цистеин, треонин присутствуют в культуральных фильтратах штаммов 527 и 608. Аргинин был обнаружен в культуральном фильтрате агрессивного сильновирулентного штамма 527, а следы тирозина и лизина – в КФ слабо агрессивного слабовирулентного штамма 608.

В КФ штамма 527 концентрация аминокислот значительно выше, чем в культуральном фильтрате 608 штамма.

Токсичность культурального фильтрата зависела от агрессивности и степени вирулентности штамма возбудителя антракноза – КФ агрессивного сильновирулентного штамма более токсичен, чем КФ слабо агрессивного слабовирулентного штамма. Возможно, что наличие в культуральном фильтрате цистеина, отличающегося высокой реакционной способностью, и тирозина является одним из факторов токсичности КФ.

Установлено, что в течение всего периода культивирования на жидкой питательной среде мицелия гриба – возбудителя антракноза льна в культуральных фильтратах происходило изменение количества белков.

Накопление и содержание белков в культуральных фильтратах штаммов различной агрессивности происходит по-разному. Более агрессивный штамм (639), обладающий большей токсичностью, содержит и накапливает в среде культивирования в течение всего периода роста и развития большее

количество белков, чем штамм менее агрессивный (419). Концентрация белков в КФ штамма 639 в течение всего периода культивирования штаммов на питательной среде выше, чем в КФ агрессивного средневирulentного штамма 419.

#### Библиографический список

1. 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.
2. Карпунин, Б. Ф. Антракноз льна: селекция на устойчивость / Б. Ф. Карпунин. Lap Lambert Academic Publishing. - 2016. - 113 с.
3. Руцкая, В. И. Антракноз люпина и его биологические особенности / В. И. Руцкая // Зернобобовые и крупяные культуры. - 2018. - № 4(28). - С. 130-135.
4. Скрининг образцов генофонда льна на устойчивость к неблагоприятным факторам / Т. А. Рожмина, Н. В. Мельникова, М. Г. Головлев, М. И. Смирнова, И. А. Куземин // Достижения науки и техники АПК. - 2018. - Т. 32, № 10. - С. 11-14.
5. 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.
6. 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.
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 / Н. В. Пролётова // Достижения науки и техники АПК. - 2019. - Т. 33, № 8. - С. 24-28.
9. Рожмина, Т. А. Образцы прядильного и масличного льна (*Linum usitatissimum* L.) – источники эффективных генов устойчивости к фузариозному увяданию и ее зависимость от температуры / Т. А. Рожмина, Н. И. Лошакова // Сельскохозяйственная биология. - 2016. - Т. 51, № 3. - С. 310-317.
10. Трабурова, Е. А. Изучение коллекционных образцов коллекции льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) / Е. А. Трабурова, Т. А. Рожмина // Достижения науки и техники АПК. - 2018. - № 11. - С. 40-42.
11. 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.
12. Polymorphism of flax pathogens assessed using deep sequencing / R. O. Novakovskiy, G. S. Krasnov, E. N. Pushkova [et al.] // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019). Abstracts. Eds. A.V. Kochetov, E.A. Salina ; Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. - 2019. - С. 145.
13. Виноградова, Е. Г. К разработке методики клеточной селекции получения устойчивых эксплантов льна к абиотическим факторам среды / Е. Г. Виноградова // Вестник ТвГУ. Серия Биология и экология. - 2019. - № 2 (54). - С. 289-296.
14. 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.
15. Патент на изобретение RU 2478282 С2, 10.04. Способ получения регенерантов льна-долгунца, устойчивых к антракнозу, методами *in vitro* / Пролётова Н. В., Кудрявцева Л. П., Виноградова Е. Г. (указать заявителя и когда опубликован)
16. 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.
17. Шамсизаде, Л. А. Состав и содержание свободных аминокислот в плодах некоторых лекарственных плодово-ягодных растений / Л. А. Шамсизаде, Э. Н. Новрузов, АМЕА-нын Хябярляри. – Москва, 2011. – Т. 66. – С. 112–119.
18. Рудаков, О. Б. Генотипическая изменчивость аминокислотного состава белков животного и растительного происхождения / О. Б. Рудаков, Л. В. Рудакова, М. С. Букша // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2020. - № (1). – С. 8-21. – URL : <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/2375>
19. Якубке, Х.-Д. Аминокислоты. Пептиды. Белки / Х.-Д. Якубке, Х. Ешкайт. – Москва : Мир, 1985. – 82 с.
20. 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.

## AMINO ACIDS AND PROTEINS IN CULTURE FILTRATES OF THE ANTHRACNOSE PATHOGEN FUNGUS COLLETOTRICHUM LINI

Proletova N. V.

FSBEI «Federal research centre of fiber crops»

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

e-mail: science.trk@fncl.ru

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

The research was carried out on the basis of laboratory biotechnologies of All-Russian research institute of flax (Tver region) in 2010–2012, 2016. The aim of the work was to determine the amino acid and protein composition of culture filtrates of the anthracnose pathogen fungus *Colletotrichum lini* Manns et Bolley in order to adjust the concentration of selective agent in the nutrient medium when creating in vitro new flax genotypes resistant to anthracnose. It was established that the culture 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 strain 527 and traces of tyrosine and lysine in strain 608. It was established that the concentration of amino acids in EC of strain 527 was significantly higher than in culture filtrate of strain 608. It was shown that the toxicity of the culture filtrate depended on the degree of aggressiveness of the anthracnose pathogen strain – culture filtrate of a strongly aggressive strain is more toxic than the culture filtrate of a weakly aggressive strain. Studies have revealed that when cultivating the fungus-causative agent of anthracnose on a nutrient medium, as the mycelium of fungus grew, the concentrations of asparagine, alanine, aspartic and glutamic acids, and glycine decreased in the culture filtrates. It was established that the change in amount of proteins happened during the entire period of cultivation of the mycelium of fungus on a liquid nutrient medium. It is shown that accumulation and content of proteins in culture filtrates of strains of different aggressiveness occurs in different ways. The more aggressive strain is (639), which is more toxic, contains and accumulates more proteins in the culture medium during the entire period of growth and development the less aggressive strain is (419).

### Bibliography

1. Kudryavtseva, L. P. Group stability of varieties is an important priority of fiber flax breeding / L. P. Kudryavtseva, O. V. Prasolova // *Agrarian Vestnik of Upper-Volga region*. - 2018. - № 3 (24). - P. 25–30.
2. Karpunin, B. F. Anthracnose of flax: breeding for resistance / B. F. Karpunin. Lap Lambert Academic Publishing. - 2016. - 113 p.
3. Rutsckaya, V. I. Lupine anthracnose and its biological features / V. I. Rutsckaya // *Legumes and cereal crops*. - 2018. - № 4(28). - P. 130-135.
4. Screening of flax gene pool samples for resistance to adverse factors / T. A. Rozhmina, N. V. Melnikova, M. G. Golovlev, M. I. Smirnova, I. A. Kuzemin // *Achievements of science and technology of AIC*. - 2018. - V. 32, № 10. - P. 11-14.
5. Poluektova, E. V. Fungi of the genus *Colletotrichum* as producers of biologically active compounds and biogerbicides / E. V. Poluektova, A. O. Berestetsky // *Mycology and hytopathology*. - 2018. - V. 52, № 6. - P. 367–381.
6. 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.
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. Proletova, N. V. The use of biotechnological methods for the creation of new genotypes of flax resistant to anthracnose / N. V. Proletova // *Achievements of science and technology of AIC*. - 2019. - V. 33, № 8. - P. 24-28.
9. Rozhmina, T. A. OExamples of spinning and oilseed flax (*Linum usitatissimum* L.) - sources of effective genes for resistance to fusarium wilt and its dependence on temperature / T. A. Rozhmina, N. I. Loshakova // *Agricultural biology*. - 2016. - V. 51, № 3. - P. 310-317.
10. Traburova, E. A. Study of collectible samples of the linen flax collection (*Linum usitatissimum* L.) / E. A. Traburova, T. A. Rozhmina // *Achievements of science and technology of AIC*. - 2018. - № 11. - P. 40-42.
11. Proletova, N. V. The use of biotechnological methods for the creation of new genotypes of flax resistant to anthracnose / N. V. Proletova // *Achievements of science and technology of AIC*. - 2019. - V.33, № 8. - P. 24-28.
12. Polymorphism of flax pathogens assessed using deep sequencing / R. O. Novakovskiy, G. S. Krasnov, E. N. Pushkova [et al.] // *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019)*. Abstracts. Eds. A.V. Kochetov, E.A. Salina ; Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. - 2019. - P. 145.
13. Vinogradova, E. G. To the development of a method of cell selection for obtaining resistant flax explants to abiotic environmental factors / E. G. Vinogradova // *Vestnik of TvSU. Series Biology and ecology*. - 2019. - № 2 (54). - P. 289-296.
14. Proletova, N. V. Increasing the resistance of flax to anthracnose (*Colletotrichum lini* Manns et Bolley) by methods in vitro / N. V. Proletova // *Oil cultures. Scientific and technical bulletin of the all-Russian research institute of oilseeds*. - 2018. - № 3 (175). - P. 128-131.
15. Patent of invention RU 2478282 C2, 10.04. Method for obtaining anthracnose-resistant linen flax regenerants by in vitro methods / Proletova N. V., Kudryavtseva L. P., Vinogradova E. G. (indicate the applicant and when published)
16. 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, № 1. - P. 45-51.
17. Shamsizade, L. A. Composition and content of free amino acids in the fruits of some medicinal fruit and berry plants / L. A. Shasizade, E. N. Novruzov, AMEA-nyn Khyabyarlary. – Moscow, 2011. – V. 66. – P. 112–119.
18. Rudakov, O. B. Genotypic variability of amino acid composition of animal and plant proteins / O. B. Rudakov, L. V. Rudakova, M. S. Buksha // *Sorption and chromatographic processes*. – 2020. - № (1). – P. 8-21. – URL : <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/2375>
19. Yakubke, Kh.-D. Amino acids. Peptides. Proteins / Kh.-D. Yakubke, Kh. Eshkait. – Moscow : Mir, 1985. – 82 p.
20. Kurchakova, L. N. Method of obtaining culture filtrates of the fungus *Fusarium oxysporum* and *F. semitectum* and their application in in vitro culture for obtaining fusarium-resistant forms of flax / L. N. Kurchakova // *Collection of scientific papers of ARSIF - Torzhok*, 1994. - Ed. 28-29. - P. 127–128.