

ISSN(Print) 2616-7034
eISSN 2663-130X

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің

ХАБАРШЫСЫ

BULLETIN

of L.N. Gumilyov
Eurasian National University

ВЕСТНИК

Евразийского национального
университета имени Л.Н. Гумилева

БИОЛОГИЯЛЫҚ ҒЫЛЫМДАР сериясы

BIOSCIENCE Series

Серия **БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ**

№ 4(133)/2020

1995 жылдан бастап шығады

Founded in 1995

Издается с 1995 года

Жылына 4 рет шығады

Published 4 times a year

Выходит 4 раза в год

Нұр-Сұлтан, 2020

Nur-Sultan, 2020

Нур-Султан, 2020

Бас редакторы: **Р.І. Берсімбай**

ҚР ҰҒА академигі, б.ғ.д., проф., Л.Н. Гумилев атындағы ЕҰУ, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

Бас редактордың орынбасары: **Р.Т. Омаров,**

PhD, б.ғ.к., профессор Л.Н. Гумилев атындағы ЕҰУ, Нұр-Сұлтан, (Қазақстан)

Редакция алқасы

| | |
|--------------------------|---|
| Абжалелов А.Б. | б.ғ.д., проф., Л.Н. Гумилев атындағы ЕҰУ, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |
| Акильжанова А.Р. | PhD, м.ғ.д., Назарбаев университеті, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |
| Аликулов З.А. | б.ғ.к., проф., Л.Н. Гумилев атындағы ЕҰУ, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |
| Аскарлова Ш.Н. | б.ғ.к., PhD, Назарбаев университеті, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |
| Ау У. | PhD, проф., Техас университеті, Техас (АҚШ) |
| Бисенбаев А.К. | б.ғ.д., проф., ҚР ҰҒА академигі, Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, Алматы (Қазақстан) |
| Едита З. | б.ғ.д., проф., Варшава жаратылыстану ғылымдар университеті, Варшава (Польша) |
| Закиян С.М. | б.ғ.д., проф., Цитология және генетика институты, Новосібір (Ресей) |
| Изотти А. | PhD, проф., Генуя университеті, Генуя (Италия) |
| Ильдербаев О.З. | м.ғ.д., проф., Л.Н. Гумилев атындағы ЕҰУ, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |
| Константинов Ю.М. | б.ғ.д., проф., Иркутск мемлекеттік университеті, Иркутск (Ресей) |
| Масалимов Ж.К. | PhD, б.ғ.к., Л.Н. Гумилев атындағы ЕҰУ, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |
| Моше Саги | PhD, проф., Бен Гурион Негев университеті, Беэр-Шева (Израиль) |
| Михаил Коломиец | б.ғ.д., проф., Техас университеті, Техас (АҚШ) |
| Сарбасов Д.Д. | PhD, проф., Назарбаев университеті, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |
| Стегний В.Н. | б.ғ.д., проф., Томск мемлекеттік университеті, Томск (Ресей) |
| Рубцов Н. | б.ғ.д., проф., Цитология және генетика институты, Новосібір (Ресей) |
| Тагаев Д. | PhD, Л.Н.Гумилев атындағы ЕҰУ, Нұр-Сұлтан (Қазақстан) |

Редакцияның мекенжайы: 010008, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ., Қ. Сәтбаев к-сі, 2,

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, 402 б.

Тел: +7(7172) 709-500 (ішкі 31-428). E-mail: eurjourbio@enu.kz

Жауапты хатшы: *М.Мұқашев*

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің Хабаршысы. БИОЛОГИЯЛЫҚ ҒЫЛЫМДАР сериясы

Меншіктенуші: «Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғам.

Мерзімділігі: жылына 4 рет. Қазақстан Республикасының Ақпарат және коммуникациялар министрлігінде 27.03.2018ж тіркелген. №16998-Ж тіркеу күәлігі.

Басуға қол қойылды: 29.12.2020.

Ашық қолданыстағы электронды нұсқа: <http://bulbio.enu.kz/>. Тиражы: 10 дана

Типографияның мекенжайы: 010008, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ., Қажымұқан к-сі, 12/1, тел.: +7(7172)709-500 (ішкі 31-428)

© Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті

Editor-in-Chief **R.I. Bersimbaev**

*Academician of NAS RK, Doctor of Biological Sciences, Prof.,
L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan*

*Deputy Editor-in-Chief: R.T. Omarov, Prof., Candidate of Biological Sciences,
PhD L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan*

Editorial board

| | |
|---------------------------|--|
| Abzhalelov A.B. | Doctor of Biological Sciences, Prof., L.N. Gumilyov ENU, Nur-Sultan (Kazakhstan) |
| Akilzhanova A.R. | PhD, Doctor of Medical Sciences, Nazarbayev University, Nur-Sultan (Kazakhstan) |
| Alikulov Z.A. | Prof., Can. of Biological Sciences, L.N. Gumilyov ENU, Nur-Sultan (Kazakhstan) |
| Askarova Sh.N. | PhD, Can. of Biological Sciences, Nazarbayev University, Nur-Sultan (Kazakhstan) |
| Au W. | PhD, Prof., University of Texas, Texas (USA) |
| Bisenbayev A.K. | Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of NAS RK, Al-Farabi Kazakh National University, Almaty (Kazakhstan) |
| Edita Z. | Doctor of Biological Sciences, Prof, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw (Poland) |
| Zakiyan S.M. | Doctor of Biological Sciences, Prof., Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk (Russia) |
| Izzotti A. | PhD, Prof., University of Genoa, Genoa (Italy) |
| Ilderbayev O.Z. | Doctor of Medical Sciences, Prof., L.N. Gumilyov ENU, Nur-Sultan (Kazakhstan) |
| Konstantinov Yu.M. | Doctor of Biological Sciences, Prof., Irkutsk State University, Irkutsk (Russia) |
| Massalimov Zh.K. | PhD, Can. of Biological Sciences, L.N. Gumilyov ENU, Nur-Sultan (Kazakhstan) |
| Moshe Sagi | PhD, Prof., Ben Gurion University of the Negev, Beer Sheva (Israel) |
| Mikhail Kolomiets | Doctor of Biological Sciences, Prof., Texas University, Texas (USA) |
| Sarbassov D.D. | PhD, Prof., Nazarbayev University, Nur-Sultan (Kazakhstan) |
| Stegniy V.N. | Doctor of Biological Sciences, Prof., Tomsk State University, Tomsk (Russia) |
| Rubtsov N. | Doctor of Biological Sciences, Prof., Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk (Russia) |
| Tagaev D. | PhD, L.N. Gumilyov ENU, Nur-Sultan (Kazakhstan) |

Editorial address: 2, Satpayev str., of. 402, L.N. Gumilyov Eurasian National University,
Nur-Sultan, Kazakhstan, 010008

Tel.: +7 (7172) 709-500 (ext. 31-428), E-mail: eurjourbio@enu.kz

Responsible secretary: : *M.Mukashev*

Bulletin of the L.N. Gumilyov Eurasian National University. BIOSCIENCE Series

Owner: Non-profit joint-stock company «L.N. Gumilyov Eurasian National University»

Periodicity: 4 times a year. Registered by the Ministry of Information and Communication of the Republic of Kazakhstan.

Registration certificate №16998-Ж from 27.03.2018. Signed for print: 29.12.2020. Available at: <http://bulbio.enu.kz/>. Circulation: 10 copies.

Address of printing house: 12/1 Kazhimukan str., Nur-Sultan, Kazakhstan 010008; tel.: +7(7172) 709-500 (ext.31-428)

Главный редактор: **Р.И. Берсимбай**
профессор, д.б.н., академик НАН РК, ЕНУ имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

Зам. главного редактора: **Р.Т. Омаров**, PhD, к.б.н., профессор ЕНУ имени Л.Н. Гумилева,
Нур-Султан, Казахстан

Редакционная коллегия

| | |
|--------------------------|--|
| Абжалелов А.Б. | д.б.н., проф., ЕНУ имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан (Казахстан) |
| Акильжанова А.Р. | PhD, д.м.н., Назарбаев Университет, Нур-Султан (Казахстан) |
| Аликулов З.А. | к.б.н., проф., ЕНУ имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан (Казахстан) |
| Аскарлова Ш.Н. | к.б.н., PhD, Назарбаев Университет, Нур-Султан (Казахстан) |
| Ау У. | PhD, проф., Техасский университет, Техас (США) |
| Бисенбаев А.К. | д.б.н., проф., академик НАН РК, КазНУ имени аль-Фараби, Алматы (Казахстан) |
| Едита З. | д.б.н., проф., Варшавский университет Естественных наук, Варшава (Польша) |
| Закиян С.М. | д.б.н., проф., Институт Цитологии и генетики, Новосибирск (Россия) |
| Изотти А. | PhD, проф., Университет Генуя, Генуя (Италия) |
| Ильдербаев О.З. | д.м.н., проф., ЕНУ имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан (Казахстан) |
| Константинов Ю.М. | д.б.н., проф., Иркутский государственный университет, Иркутск (Россия) |
| Масалимов Ж.К. | PhD, к.б.н., ЕНУ имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан (Казахстан) |
| Моше Саги | PhD, проф., Университет им. Бен-Гуриона в Негеве, Беэр-Шева (Израиль) |
| Михаил Коломиец | д.б.н., проф., Техасский университет, Техас (США) |
| Сарбасов Д.Д. | PhD, проф., Назарбаев Университет, Нур-Султан (Казахстан) |
| Стегний В.Н. | д.б.н., проф., Томский государственный университет, Томск (Россия) |
| Рубцов Н.Б. | д.б.н., проф., Институт Цитологии и генетики, Новосибирск (Россия) |
| Тагаев Д. | PhD, ЕНУ имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан (Казахстан) |

Адрес редакции: 010008, Казахстан, г. Нур-Султан, ул. Сатпаева, 2, Евразийский
национальный университет имени Л.Н. Гумилева, каб. 402

Тел: +7(7172) 709-500 (вн. 31-428). E-mail: eurjourbio@enu.kz.

Ответственный секретарь: *М. Мукашев*

Вестник Евразийского национального университета имени Л.Н. Гумилева. Серия БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ.

Собственник: НАО «Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева»

Периодичность: 4 раза в год. Зарегистрирован Министерством информации и коммуникаций Республики Казахстан.

Регистрационное свидетельство №16998-Ж от 27.03.2018г. Подписана в печать: 29.12.2020. Электронная версия в открытом

доступе: <http://bulbio.enu.kz/>. Тираж: 10 экземпляров

Адрес типографии: 010008, Казахстан, г. Нур-Султан, ул. Кажимукана, 12/1, тел.: +7(7172)709-500 (вн.31-428)

МАЗМҰНЫ / CONTENTS / СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| <i>Б.Б. Ильясова, С.Б. Жангазин, А.Мадиров, А.Ж. Акбасова, А.Б. Дилдабек, Ж.Б. Тлеукулова, З.Б. Стамгалиева, Р.Т. Омаров</i> Вирустық инфекцияларға қарсы өсімдіктердің иммундық тетіктерін белсенділендіруге вирустық ақуыздар мен «РНК-интерференция» механизмді сөндіретін Р19 протеиннің қасиеттері мен функциялары | |
| <i>B.B. Ilyassova, S.B. Zhangazin, A. Madirov, A.Zh. Akbassova, A.B. Dildabek, Zh.B. Tleukulova, Z.B. Stangaliyeva, R.T. Omarov</i> Properties and functions of viral proteins and P19 protein – suppressor of RNA interference in activating immune mechanisms of plants against viral infection | |
| <i>Б.Б. Ильясова, С.Б. Жангазин, А. Мадиров, А.Ж. Акбасова, А.Б. Дилдабек, Ж.Б. Тлеукулова, З.Б. Стамгалиева, Р.Т. Омаров</i> Свойства и функции вирусных белков и белка-супрессора РНК-интерференции Р19 вируса ТBSV в активации иммунных механизмов растений против вирусной инфекции... | 7 |
| <i>М.Ж. Қанжигитова, А.М. Есимова, М.А. Джакашева</i> Молекулалық диагностикада қолданылатын перспективалы протеаздың продуценттерін іздеу | |
| <i>M.Zh. Kanzhigitova, A.M. Esimova, M.A. Dzhakasheva</i> Search for promising protease producers used for molecular diagnostics | |
| <i>М.Ж. Қанжигитова, А.М. Есимова, М.А. Джакашева</i> Поиск перспективных продуцентов протеаз, применяемых для молекулярной диагностики..... | 16 |
| <i>А.Т. Хусаинов, Б.Х. Есенжолов, Т.Н. Жаркинбеков, А.А. Сарсенова, Г.Р. Данкина</i> «Агробионов» препаратын енгізген кезіндегі кәдімгі қара топырақтың микрофлорасы, қоректену элементтерімен қамтамасыз етілуі және жаздық бидайдың өнімділігі | |
| <i>A. Khusainov, B. Yessenzholov, T. Zharkinbekov, A. Sarsenova, G. Dankina</i> Microflora, supply of elements of nutrition of ordinary chernozem and productivity of spring wheat when applying the preparation «agrobionov» | |
| <i>А.Т. Хусаинов, Б.Х. Есенжолов, Т.Н. Жаркинбеков, А.А. Сарсенова, Г.Р. Данкин</i> Микрофлора, обеспеченность элементами питания чернозема обыкновенного и урожайность яровой пшеницы при внесении препарата «агробионов»..... | 22 |
| <i>А.Т. Жұмабек, Е.М. Раманкулов, Ш.А. Манабаева</i> Тары өсімдігінің Agrobacterium-жанама трансформациясының параметрлерін оңтайландыру | |
| <i>A.T. Zhumabek, Y.M. Ramankulov, S.A. Manabayeva</i> Optimization of the parameters of Agrobacterium-mediated transformation of bar-shaped millet | |
| <i>А.Т. Жұмабек, Е.М. Раманкулов, Ш.А. Манабаева</i> Оптимизация параметров Agrobacterium-опосредованной трансформации проса прутьевидного..... | 32 |
| <i>С.С. Беккужина, А.О. Рахимжанова, А.К. Талканбаева, Ш. А. Манабаева</i> Индукция каллусогенеза в культуре изолированных семян Cistanche Deserticola | |
| <i>S.S. Bekkuzhina, A.O. Rakhimzhanova, A.K. Talkanbayeva, S.A. Manabayeva</i> Induction of callusogenesis in a culture of isolated seeds of Cistanche Deserticola | |
| <i>С.С. Беккужина, А.О. Рахимжанова, А.К. Талканбаева, Ш.А. Манабаева</i> Cistanche Deserticola оқшаланған тұқымдарының мәдениетінде каллусогенез индукциясы..... | 44 |

| | |
|--|----|
| <i>Шек Г.О., Есимсеитова А.К., Жаныбекова Ж.Т., Бабкенов А.Т., Дюсембекова Д.А., Шелаева Т.В., Какимжанова А.А.</i> Жұмсақ жаздық бидайдың құрғақшылыққа төзімді регенерант өсімдіктерін алу | |
| <i>Shek G.O., Yessimseitova A.K., Zhanybekova Zh.T., Babkenov A.T., Dyussebekova D.A., Shelaeva T.V., Kakimzhanova A.A.</i> Production of drought-resistant regenerant plants of spring soft wheat | |
| <i>Шек Г.О., Есимсеитова А.К., Жаныбекова Ж.Т., Бабкенов А.Т., Дюсембекова Д.А., Шелаева Т.В., Какимжанова А.А.</i> Получение засухоустойчивых растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы..... | 53 |
| <i>В.Н. Шмаков, Ю.М. Константинов</i> Pinus sibirica du Tour-да ішкі генетикалық полиморфизмді зерттеудегі in vitro жасуша мәдениеті | |
| <i>V.N. Shmakov, Yu.M. Konstantinov</i> Cell culture in vitro in studying of intraspecies genetic polymorphism in Pinus sibirica Du Tour | |
| <i>В. Н. Шмаков, Ю. М. Константинов</i> Культура клеток in vitro в изучении внутривидового генетического полиморфизма у Pinus sibirica Du Tour..... | 69 |



МРНТИ 34.15

Б.Б. Ильясова, С.Б. Жангазин
А. Мадиров, А.Ж. Акбасова,
А.Б. Дилдабек, Ж.Б. Тлеукулова
З.Б. Стамгалиева, Р.Т. Омаров

Евразийский Национальный Университет имени Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан
(E-mail: bayansulu.ilyasova@gmail.com)

Свойства и функции вирусных белков и белка-супрессора РНК-интерференции Р19 вируса TBSV в активации иммунных механизмов растений против вирусной инфекции

Аннотация. Развитие вирусных инфекции является одной из главных причин потери урожая с/х культур. В настоящее время ведутся биохимические исследования механизмов иммунного ответа растений при вторжении патогенов. Изучение молекулярных взаимодействий между растениями и патогенами имеет огромное значение в создании методологических подходов для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Вирусы могут заражать все типы форм жизни, от животных и растений до микроорганизмов. Они встречаются почти в каждой экосистеме на Земле. В настоящее время известно огромное количество вирусов, поражающих большинство растений. Вирус кустистой карликовости томатов является удобной моделью для исследований взаимосвязи растений и вирусов. Научное направление относится к области молекулярной биологии, биохимии, вирусологии.

Ключевые слова: вирус кустистой карликовости томатов, Р19 белок-супрессор, вирусная инфекция, репликазные белки, РНК-интерференция.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-7-15>

Введение. РНК-интерференция принимает участие в физиологических процессах живых существ, а молекулярные посредники – короткие РНК – по разнообразию и специфичности не уступают антителам крови. У простейших РНК-и обеспечивает иммунитет (защиту от вирусов), а у более развитых организмов этот механизм участвует в борьбе с внешними и внутриклеточными паразитами, также является регулятором активности генов.

Вирус кустистой карликовости томатов (TBSV) используется в работах по изучению молекулярных взаимодействий растений и вирусов [1]. Tomato bushy stunt virus (TBSV) представитель рода Tombusvirus, семейства Tombusviridae. Tombusvirus является одной из 16 групп растительных вирусов, впервые утвержденных в 1971 [2]. Определение полной нуклеотидной последовательности

довательности РНК нескольких видов семейства предоставило информацию об организации генома и экспрессии генов. Белок-супрессор Р19, кодируемый геномом TBSV обеспечивает защиту геномной РНК вируса путем связывания коротких интерферирующих РНК дуплексов, тем самым блокируя РНК-интерференцию на начальном этапе инфекции [3].

Цель. Изучение функций вирусных белков, взаимодействия репликазных белков вируса кустистой карликовости томатов (Tomato bushy stunt virus), характеристик РНК-связывающих доменов в белках репликазы TBSV и Р19 – вирусного белка-супрессора, как инструмента для исследования малых РНК.

Молекулярная структура TBSV вируса. Геном tombusvirus состоит из линейной (+) одноцепочечной РНК-молекулы, длиной около 4700 нуклеотидов, которая содержит по меньшей мере пять открытых рамок считывания (ORF), кодирующих белки с молекулярной массой 33К, 92К, 41К, 22К, и 19К [2]. Открытая рамка считывания 1, которой предшествует нетранслируемая последовательность, кодирует белок с молекулярной массой около 33К. Посредством трансляционного считывания стоп-кодона Р33 синтезируется 92К белок (ORF 2). Р33 и Р92 транслируются непосредственно из геномной РНК. Небольшая область отделяет ORF 2 от открытой рамки считывания 3, которая кодирует 41К белок оболочки вируса из субгеномной РНК1. Другая часть разделяет ORF 3 от ORFs 4 и 5. Открытая рамка считывания 4 кодирует белок размером 22К, а ORF 5, перекрывающая ORF 4, кодирует полипептид около 19К. За 5 открытой рамкой следует 3'-некодирующая область ~ 350 нт. 3' конец не является полиаденилированным.

Молекулярные функции вирусных белков TBSV. Роль белка р22 – в передвижении вирусной РНК между клетками, р19 является супрессором РНК-интерференции и патогенным фактором при развитии системной инфекции [3]. Синтез р92 белка осуществлялся посредством трансляционного считывания стоп-кодона р33 и изучался в исследованиях трансляции *in vitro* Hayes et al. (1988) с использованием геномной мРНК TBSV. Экспрессия белка р33 необходима для репликации РНК, так как сдвиг в ORF 1 с образованием стоп-кодона в положении 650 приводит к синтезу 16К белка, а замена стоп-кодона в положении 1048 метионином не продуцирует инфекцию [4]. РНК-полимеразный мотив Gly-Asp-Asp (GDD) [18] находится в области трансляционного считывания 92К томбусвирусов. Nabil и Symons (1989) определили в одном и том же регионе два мотива хеликазы нуклеиновой кислоты, но их интерпретация несколько противоречива, поскольку другие авторы утверждают, что вирусы с геномами менее 6 кб лишены хеликазной активности [5]. СР (coat protein) – белок оболочки специфически реагировал с антителами против вирусных частиц, аминокислотная последовательность совпадает с химическим анализом СР-субъединиц TBSV-BS3 [6]. Поскольку белок оболочки имеет дополнительные функции помимо защиты вирусного генома от внешней среды, в разных лабораториях разрабатывались мутанты, которые не экспрессируют данный белок, также исследовалось влияние мутации на репликацию и передвижение вируса. В целом, результаты, полученные с использованием СР мутантов томбусвирусов, приводят к следующим выводам: 1. Ген СР необязателен при репликации. 2. В зависимости от хозяина и вируса, при перемещении на дальние расстояния необходимы вирионы. РНК томбусвируса в комплексе с белком 22К проходит через плазмодесматы от инфицированной клетки к следующей до сосудистых тканей для распространения на большие расстояния. Однако движение через сосудистую систему подвергает РНК-белковый комплекс воздействию нуклеазных атак, что объясняет неэффективность системной инвазии *N. benthamiana* мутантом с удаленной частью гена СР [2]. Johnston и Rochon (1990) предоставили доказательства того, что природная и синтетическая формы субгеномной РНК (sg 2) продуцируют два белка, соответствующие по размеру полипептидам, кодируемыми ORF 4, 5 [7]. Репликация мутанта 22К в протопластах и отсутствие инфекции доказывают, что белок вовлечен в межклеточное распространение вируса [4]. Это было подтверждено компьютерным сравнением полипептида 22К томбусвирусов с белками передвижения других (+) ssRNA вирусов [2].

РНК репликация и взаимодействие репликазных белков Tomato bushy stunt virus. Идеальной системой для исследования индивидуальных детерминант процесса репликации (+) РНК-вирусов является бесклеточный экстракт [8]. *In vitro* транслированные белки р33 и р92 образуют вирусную репликазу. Интересным исследованием является, что в данной системе процессы трансляции и репликации РНК функционально не связаны, поскольку образование вирусной репликазы происходит и без одновременного синтеза белка. Вирусные РНК и белки образуют мембранно-связанные репликационные комплексы, которые катализируют транскрипцию (-) РНК-интермедиатов. (-) посредник действует как матрица для синтеза (+) РНК молекул, субгеномных (sg) мРНК, кодирующих дополнительные вирусные белки [9]. Молекулярные механизмы способствуют взаимодействиям между вирусными репликационными белками, вирусной РНК и мембранами. Экспериментальная система - бесклеточный цитоплазматический экстракт, воспроизводящий трансляцию белка и репликацию РНК с добавлением *in vitro* транскрибированной вирусной РНК [8]. Исследования репликации томбусвирусов также включают в себя изучение дефектных интерферирующих (DI) вирусных РНК [10]. DI РНК не кодируют вирусные белки, но содержат элементы РНК (впоследствии «элементы репликации»), которые необходимы для процесса репликации. Эти элементы функционально определены в исследованиях репликации томбусвируса в растениях и протопластах [11] [12] [13] [14], а также *in vitro* данные с предварительно собранной репликазой томбусвируса [15] [16] [17]. Последовательность р33 перекрывается с N-концевым доменом р92, который также содержит мотивы РНК-зависимых РНК-полимераз (RdRps) в неперекрывающейся С-концевой части. Последовательность в 33К белке, участвующая в белковых взаимодействиях, картирована в С-концевой области, содержащая РНК-связывающий сайт. Мутации в р33 / р92 снижали репликацию дефектной интерферирующей РНК TBSV в дрожжах, тем самым демонстрируя значение белковых взаимодействий в репликации томбусвируса. При репликации вирусной РНК требуется сборка репликационного комплекса в инфицированных клетках. Известно, что репликационные комплексы, находящиеся в характерных мембраносодержащих структурах (везикулярные тела), содержат матрицу вирусной РНК и белки [18]. Эти факторы, вероятно, имеют белковые и РНК-белковые взаимодействия в комплексе репликазы. Р33 участвует в репликации РНК, так как связывается с вирусной РНК *in vitro* [19]. РНК-связывающая область в р33 и перекрывающаяся (предварительно считываемая) область в р92 сопоставлена с аргинин-пролин мотивом (мотив RPR, рис. 1).

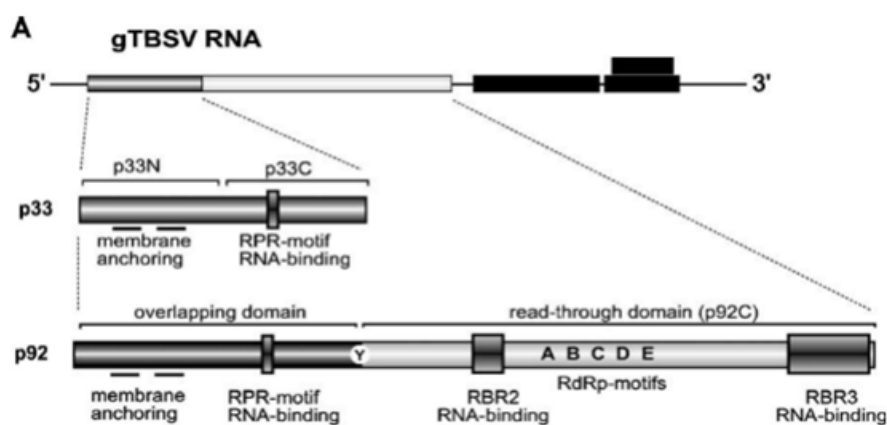


Рисунок 1. Схематическое изображение белков репликазы TBSV [20]

Мутации в RPR-мотиве 33К влияют на синтез гРНК и субгеномной (sg) РНК, рекомбинацию РНК [21], р33 является многофункциональным белком. Мотив RPR является значительным в функции р92 [22]. Кроме того, белки репликазы TBSV, вероятно, связываются с внутриклеточны-

ми мембранами, основываясь на исследованиях близкородственных белков репликаз Carnation Italian ringspot virus, Cymbidium ringspot virus, которые локализуются в везикулярных телах [23] [24]. Прямое взаимодействие р33, р92 белков способствует стабильности комплекса RdRp. Чтобы проверить эту гипотезу, исследовалось взаимодействие р33 и р92, используя анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с очищенными рекомбинантными белками. Р33 взаимодействует с р92 и другими молекулами р33 (межмолекулярное взаимодействие). Были идентифицированы две короткие области в С-концевой части р33, способствующие вышеупомянутым взаимодействиям. Их значимость (р33: р33; р33: р92) подтверждена в модельной системе репликации tombusvirus экспрессией белков 33К и 92К с сайт-специфическими мутациями в области, необходимой для взаимодействия белков. Репликазные белки TBSV взаимодействуют друг с другом и данное взаимодействие имеет значение в их функциях во время инфекции томбусвирусом [20].

Характеристика РНК-связывающих доменов в белках репликазы TBSV. При проведении дополнительных исследований, используя производные делеции рекомбинантных белков, экспрессируемых в *Escherichia coli*, в анализах Northwestern демонстрируется, что р33 и перекрывающийся домен р92 содержат аргинин-пролин-РНК-связывающий мотив (последовательность RPRRRP). Неперекрывающийся С-концевой домен р92 содержит дополнительные РНК-связывающие области [19]. Интересная особенность томбусвирусов заключается в том, что белок репликазы экспрессируется из геномной РНК через рибосомальный механизм терминирующего кодона р33 [25]. Оба белка локализованы на мембранных структурах в инфицированных клетках - предполагаемых сайтах репликации томбусвируса [23]. Вирусная геномная РНК комплектуется в вирусном репликальном комплексе после трансляции [26]. Кроме того, вирусный репликальный комплекс, который, вероятно, содержит как вирусные, так и кодируемые хозяином белки, синтезирует комплементарную (-)РНК на геномной (+)РНК. Это сопровождается устойчивым синтезом (+)РНК с использованием промежуточных (-)продуктов [27]. Томбусвирусы также синтезируют субгеномные РНК для экспрессии 3'-проксимальных генов [2].

Р19 – вирусный белок-супрессор. TBSV и р19 белок – эффективные инструменты в молекулярных исследованиях взаимодействия растений и вирусов [28]. Данный белок является супрессором РНК-интерференции и участвует в системной инфекции [29]. Белок защищает вирусную геномную РНК от механизма РНКи связыванием киРНК дуплексов, блокируя РНК-интерференцию в модельном растении *Nicotiana benthamiana* [3]. Супрессия РНКи – основная функция р19 белка, также является элиситором гиперсенситивного ответа [30]. Аккумуляция 19К определяет тяжесть симптомов инфекции и стабильность вирусной РНК [31]. Две независимые группы провели рентгеноструктурные анализы и выявили комплекс р19-киРНК, конформацию с триптофановыми остатками на субъединицах димеров белка, связывающих 21-нуклеотидные киРНК дуплексы [32]. При TBSV инфекции супрессор связывается с циркулирующими Tombusvirus-киРНК, не включая в RISC-комплекс, таким образом происходит системное распространение вирусной РНК [3]. Функциональность белка определяется биохимическими свойствами: образование димеров, структурное расположение аминокислот для связывания киРНК [33].

Заключение. Таким образом, связывание киРНК – ключевое свойство при системной инфекции TBSV-вируса в растениях. Исследования демонстрируют, что распространение вируса и супрессия РНК-интерференции зависят от относительно высокой экспрессии р19-го [34]. Разработка мутантных белков без экспрессии Р19-го белка представляет научный интерес в области исследований РНК-интерференции.

Материалы подготовлены в рамках проекта №AP05135633 «Влияние детерминант вирусного белка на приобретенную резистентность растений и генерацию семенного материала с пре-программированной устойчивостью к вирусной инфекции», программы NoBR05236574

«Использование адаптивных механизмов растений в разработке современных технологий получения сельскохозяйственных культур устойчивых к стрессовым факторам», NoBR05236574 «Исследования защитных антивирусных механизмов растений при воздействии солевого стресса у *N.benthamiana* и ячменя».

Список литературы

1. Yergaliyev T. M., Nurbekova Z., Mukiyanova G., et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to Tombusvirus infection // *Plant Physiol. Biochem.* – 2016. – Vol. 109. – P. 36-44. doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.001.
2. Russo M., Burgyan J., Martelli G. P. Molecular Biology of Tombusviridae // *Adv. Virus Res.* – 1994. – Vol. 44. – P. 381-428. doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60334-6.
3. Omarov R. T., Scholthof H. B. Biological chemistry of virus-encoded suppressors of RNA silencing: An overview // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 894. – P. 39-56.
4. Dalmay T., Rubino L., Burgyán J., Kollár A., Russo M. Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome // *Virology.* - 1993. – Vol. 194. – P. 697-704.
5. Koonin E. V., Dolja V. V., Morris T. J. Evolution and taxonomy of positive-Strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 28. № 5. – P. 375-430. doi.org/10.3109/10409239309078440.
6. Hopper P., Harrison S. C., Sauer R. T. Structure of tomato bushy stunt virus. V. Coat protein sequence determination and its structural implications // *J. Mol. Biol.* - 1984. – Vol. 177. № 4. – P. 701-713. doi.org/10.1016/0022-2836(84)90045-7.
7. Rochon D. M., Tremaine J. H. Complete nucleotide sequence of the cucumber necrosis virus genome // *Virology.* - 1989. – Vol. 169. № 2. – P. 251-259. doi.org/10.1016/0042-6822(89)90150-5.
8. Gursinsky T., Schulz B., Behrens S. E. Replication of Tomato bushy stunt virus RNA in a plant in vitro system // *Virology.* – 2009. – Vol. 390. № 2. – P. 250-260. doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.009.
9. Ahlquist P., Noueiry A. O., Lee W-M., Kushner D. B., Dye B. T. Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication // *J. Virol.* - 2003. – Vol. 77. № 15. – P. 8181-8186. DOI: 10.1128/JVI.77.15.8181-8186.2003.
10. Knorr D. A., Mullin R. H., Hearne P. Q., Morris T. J. De novo generation of defective interfering RNAs of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage // *Virology.* - 1991. – Vol. 181. № 1. – P. 193-202. doi.org/10.1016/0042-6822(91)90484-5.
11. Fabian M. R., Na H, Ray D., White K. A. 3'-Terminal RNA secondary structures are important for accumulation of tomato bushy stunt virus DI RNAs // *Virology.* - 2003. – Vol. 313. № 2. – P. 567-580. doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00349-0.
12. Monkewich S., Lin H-X, Fabian M. R., et al. The p92 Polymerase Coding Region Contains an Internal RNA Element Required at an Early Step in Tombusvirus Genome Replication // *J. Virol.* - 2005. – Vol. 79. № 8. – P. 4848-4858. doi:10.1128/JVI.79.8.4848-4858.2005.
13. Park J-W, Desvoyes B., Scholthof H. B. Tomato Bushy Stunt Virus Genomic RNA Accumulation Is Regulated by Interdependent cis-Acting Elements within the Movement Protein Open Reading Frames // *J. Virol.* - 2002. – Vol. 76. № 24. – P. 12747-12757. DOI: 10.1128/JVI.76.24.12747-12757.2002.
14. Ray D., White K. A. An Internally Located RNA Hairpin Enhances Replication of Tomato Bushy Stunt Virus RNAs // *J. Virol.* - 2003. – Vol. 77. № 1. – P. 245-257. DOI: 10.1128/JVI.77.1.245-257.2003.
15. Nagy P. D., Pogany J. Partial purification and characterization of Cucumber necrosis virus and Tomato bushy stunt virus RNA-dependent RNA polymerases: Similarities and differences in template usage between tombusvirus and carmovirus RNA-dependent RNA polymerases // *Virology.* - 2000. – Vol. 276. № 2. – P. 279-288. doi.org/10.1006/viro.2000.0577.
16. Panavas T., Nagy P. D. The RNA Replication Enhancer Element of Tombusviruses Contains Two Interchangeable Hairpins That Are Functional during Plus-Strand Synthesis // *J. Virol.* - 2003. – Vol. 77. № 1. – P. 258-269. DOI: 10.1128/JVI.77.1.258-269.2003.
17. Panaviene Z., Panavas T., Serva S., Nagy P. D. Purification of the Cucumber Necrosis Virus Replicase from Yeast Cells: Role of Coexpressed Viral RNA in Stimulation of Replicase Activity // *J. Virol.* - 2004. – Vol. 78. № 15. – P. 8254-8263. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8254-8263.2004.

18. Buck K. W. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals // *Adv. Virus Res.* - 1996. – Vol. 47. – P. 159-251. doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60736-8.
19. Rajendran K. S., Nagy P. D. Characterization of the RNA-Binding Domains in the Replicase Proteins of Tomato Bushy Stunt Virus // *J. Virol.* - 2003. – Vol. 77. № 17. – P. 9244-9258. DOI: 10.1128/JVI.77.17.9244-9258.2003.
20. Rajendran K. S., Nagy P. D. Interaction between the replicase proteins of Tomato Bushy Stunt virus in vitro and in vivo // *Virology.* – 2004. – Vol. 326. № 2. – P. 250-261. doi.org/10.1016/j.virol.2004.06.018.
21. Panaviene Ž., Nagy P. D. Mutations in the RNA-binding domains of tombusvirus replicase proteins affect RNA recombination in vivo // *Virology.* - 2003. – Vol. 317. № 2. – P. 359-372. doi.org/10.1016/j.virol.2003.08.039.
22. Panaviene Ž., Baker J. M., Nagy P. D. The overlapping RNA-binding domains of p33 and p92 replicase proteins are essential for tombusvirus replication // *Virology.* - 2003. – Vol. 308. № 1. – P. 191-205. doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00132-0.
23. Burgyan J., Rubino L., Russo M. The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies // *J. Gen. Virol.* - 1996. – Vol. 77. № 8. – P. 1967-1974. doi.org/10.1099/0022-1317-77-8-1967.
24. Rubino L., Weber-Lofti F., Dietrich A., Stussi-Garaud C., Russo M. The open reading frame 1-encoded ('36K') protein of Carnation Italian ringspot virus localizes to mitochondria // *J. Gen. Virol.* - 2001. – Vol. 82. № 1. – P. 29-34. doi.org/10.1099/0022-1317-82-1-29.
25. Scholthof KBG, Scholthof H. B., Jackson A. O. The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated // *Virology.* - 1995. – Vol. 208. № 1. – P. 365-369. doi.org/10.1006/viro.1995.1162.
26. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing // *Science.* - 2002. – Vol. 296. № 5571. – P. 1270-1273. DOI: 10.1126/science.1069132.
27. Kao C. C., Singh P., Ecker D. J. De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis // *Virology.* - 2001. – Vol. 287. № 2. – P. 251-260. doi.org/10.1006/viro.2001.1039.
28. Yergaliyev T. M., Nurbekova Z., Mukiyanova G., et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to Tombusvirus infection // *Plant Physiol. Biochem.* - 2016. – Vol. 109. – P. 36-44. doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.001.
29. Turina M., Omarov R., Murphy J. F., Bazaldua-Hernandez C., Desvoyes B., Scholthof H. B. A newly identified role for Tomato bushy stunt virus P19 in short distance spread // *Mol. Plant Pathol.* - 2003. – Vol. 4. № 1. – P. 67-72.
30. Omarov R. T., Ciomperlik J. J., Scholthof H. B. RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in Tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex // *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* - 2007. – Vol. 104. № 5. – P. 1714-1719. doi.org/10.1073/pnas.0608117104.
31. Scholthof H. B., Desvoyes B., Kuecker J., Whitehead E. Biological activity of two tombusvirus proteins translated from nested genes is influenced by dosage control via context-dependent leaky scanning // *Mol. Plant. Microbe Interact.* - 1999. – Vol. 12. № 8. – P. 670-679.
32. Ye K., Malinina L., Patel D. J. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing // *Nature.* - 2003. – Vol. 426. – P. 874-878.
33. Vargason J. M., Szittyá G., Burgyán J., Tanaka Hall T. M. Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor // *Cell.* - 2003. – Vol. 115. № 7. – P. 799-811. doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00984-X.
34. Omarov R., Sparks K., Smith L., Zindovic J., Scholthof H. B. Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-Encoded P19 and Short Interfering RNAs // *J. Virol.* - 2006. – Vol. 80. № 6. – P. 3000-3008. doi:10.1128/JVI.80.6.3000-3008.2006.

**Б.Б. Ильясова, С.Б. Жангазин, А. Мадиров, А.Ж. Акбасова, А.Б. Ділдабек,
Ж.Б. Глеукулова, З.Б. Стамгалиева, Р.Т. Омаров**

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

**Вирустық инфекцияларға қарсы өсімдіктердің иммундық тетіктерін
белсенділендіруге вирустық ақуыздар мен «РНК-интерференция»
механизмді сөндіретін Р19 протеиннің қасиеттері мен функциялары**

Аңдатпа. Вирустық инфекциялардың дамуы ауылшаруашылық дақылдарының жоғалуының негізгі себептерінің бірі болып табылады. Қазіргі уақытта өсімдіктердің қоздырғыштардың шабуылына иммун-

дық жауап беру механизмдеріне биохимиялық зерттеулер жүргізілуде. Өсімдіктер мен қоздырғыштардың арасындағы молекулалық өзара әрекеттесуді зерттеу ауылшаруашылық дақылдарының өнімділігін арттырудың әдіснамалық тәсілдерін жасауда үлкен маңызға ие. Вирустар жануарлар мен өсімдіктерден микроорганизмдерге дейінгі барлық тіршілік формаларын жұқтыруы мүмкін. Олар жер бетіндегі барлық дерлік экожүйелерде кездеседі. Қазіргі уақытта көптеген өсімдіктерді жұқтыратын көптеген вирустар белгілі. Қызанақ бұталы ергежейлі вирус өсімдіктер мен вирустар арасындағы қатынасты зерттеу үшін қолайлы модель болып табылады. Ғылыми бағыт молекулалық биология, биохимия, вирусология салаларына қатысты.

Түйін сөздер: TBSV, P19 супрессорлы ақуыз, вирустық инфекция, репликаза ақуыздары, РНК-интерференция.

**B.B. Ilyassova, S.B. Zhangazin, A. Madirov, A.Zh. Akbassova,
A.B. Dildabek, Zh.B. Tleukulova, Z.B. Stamgaliyeva, R.T. Omarov**
L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Properties and functions of viral proteins and P19 protein – suppressor of RNA interference in activating immune mechanisms of plants against viral infection

Abstract. The development of viral infections is one of the main reasons for the loss of agricultural crops. At present, biochemical studies of the plant's immune response mechanisms to the invasion of pathogens are being in progress. The study of molecular interactions between plants and viruses has the significant importance in the development of methodological approaches to increase the productivity of agricultural crops. Viruses can infect all types of life forms, from animals and plants to microorganisms. They are found in almost every ecosystem on Earth. A huge number of viruses are known to affect most plants. Tomato bushy stunt virus is a convenient model for studying the interaction between plants and viruses. The scientific field relates to the molecular biology, biochemistry, virology.

Key words: Tomato bushy stunt virus, P19 suppressor protein, viral infection, replicase proteins, RNA interference.

References

1. Yergaliyev T. M., Nurbekova Z., Mukiyanova G., et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to Tombusvirus infection, *Plant Physiol. Biochem.*, 109, 36-44(2016).
2. Russo M., Burgyan J., Martelli G. P. Molecular Biology of Tombusviridae, *Adv. Virus Res.*, 44, 381-428(1994).
3. Omarov R. T., Scholthof H. B. Biological chemistry of virus-encoded suppressors of RNA silencing: An overview, *Methods Mol. Biol.*, 894, 39-56(2012).
4. Dalmay T., Rubino L., Burgyán J., Kollár A., Russo M. Functional analysis of cymbidium ringspot virus genome, *Virology*, 194, 697-704(1993).
5. Koonin E. V., Dolja V. V., Morris T. J. Evolution and taxonomy of positive-Strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 28, 5, 375-430(1993).
6. Hopper P., Harrison S. C., Sauer R. T. Structure of tomato bushy stunt virus. V. Coat protein sequence determination and its structural implications, *J. Mol. Biol.*, 177, 4, 701-713(1984).
7. Rochon D. M., Tremaine J. H. Complete nucleotide sequence of the cucumber necrosis virus genome, *Virology*, 169, 2, 251-259(1989).
8. Gursinsky T., Schulz B., Behrens S. E. Replication of Tomato bushy stunt virus RNA in a plant in vitro system, *Virology*, 390, 2, 250-260(2009).
9. Ahlquist P., Noueir A. O., Lee W-M., Kushner D. B., Dye B. T. Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication, *J. Virol.*, 77, 15, 8181-8186(2003).
10. Knorr D. A., Mullin R. H., Hearne P. Q., Morris T. J. De novo generation of defective interfering RNAs of tomato bushy stunt virus by high multiplicity passage, *Virology*, 181, 1, 193-202(1991).
11. Fabian M. R., Na H, Ray D., White K. A. 3'-Terminal RNA secondary structures are important for accumulation of tomato bushy stunt virus DI RNAs, *Virology*, 313, 2, 567-580(2003).
12. Monkewich S., Lin H-X, Fabian M. R., et al. The p92 Polymerase Coding Region Contains an Internal RNA Element Required at an Early Step in Tombusvirus Genome Replication, *J. Virol.*, 79, 8, 4848-4858(2005).

13. Park J-W, Desvoyes B., Scholthof H. B. Tomato Bushy Stunt Virus Genomic RNA Accumulation Is Regulated by Interdependent cis-Acting Elements within the Movement Protein Open Reading Frames, *J. Virol.*, 76, 24, 12747-12757(2002).
14. Ray D., White K. A. An Internally Located RNA Hairpin Enhances Replication of Tomato Bushy Stunt Virus RNAs, *J. Virol.*, 77, 1, 245-257(2003).
15. Nagy P. D., Pogany J. Partial purification and characterization of Cucumber necrosis virus and Tomato bushy stunt virus RNA-dependent RNA polymerases: Similarities and differences in template usage between tombusvirus and carmovirus RNA-dependent RNA polymerases, *Virology.*, 276, 2, 279-288(2000).
16. Panavas T., Nagy P. D. The RNA Replication Enhancer Element of Tombusviruses Contains Two Interchangeable Hairpins That Are Functional during Plus-Strand Synthesis, *J. Virol.*, 77, 1, 258-269(2003).
17. Panaviene Z., Panavas T., Serva S., Nagy P. D. Purification of the Cucumber Necrosis Virus Replicase from Yeast Cells: Role of Coexpressed Viral RNA in Stimulation of Replicase Activity, *J. Virol.*, 78, 15, 8254-8263(2004).
18. Buck K. W. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals, *Adv. Virus Res.*, 47, 159-251(1996).
19. Rajendran K. S., Nagy P. D. Characterization of the RNA-Binding Domains in the Replicase Proteins of Tomato Bushy Stunt Virus, *J. Virol.*, 77, 17, 9244-9258(2003).
20. Rajendran K. S., Nagy P. D. Interaction between the replicase proteins of Tomato Bushy Stunt virus in vitro and in vivo, *Virology.*, 326, 2, 250-261(2004).
21. Panaviene Ž., Nagy P. D. Mutations in the RNA-binding domains of tombusvirus replicase proteins affect RNA recombination in vivo, *Virology.*, 317, 2, 359-372(2003).
22. Panaviene Ž., Baker J. M., Nagy P. D. The overlapping RNA-binding domains of p33 and p92 replicase proteins are essential for tombusvirus replication, *Virology.*, 308, 1, 191-205(2003).
23. Burgyan J., Rubino L., Russo M. The 5'-terminal region of a tombusvirus genome determines the origin of multivesicular bodies, *J. Gen. Virol.*, 77, 8, 1967-1974(1996).
24. Rubino L., Weber-Lofti F., Dietrich A., Stussi-Garaud C., Russo M. The open reading frame 1-encoded ('36K') protein of Carnation Italian ringspot virus localizes to mitochondria, *J. Gen. Virol.*, 82, 1, 29-34(2001).
25. Scholthof KBG, Scholthof H. B., Jackson A. O. The tomato bushy stunt virus replicase proteins are coordinately expressed and membrane associated, *Virology.*, 208, 1, 365-369(1995).
26. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing, *Science.*, 296, 5571, 1270-1273(2002).
27. Kao C. C., Singh P., Ecker D. J. De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis, *Virology.*, 287, 2, 251-260(2001).
28. Yergaliyev T. M., Nurbekova Z., Mukiyanova G., et al. The involvement of ROS producing aldehyde oxidase in plant response to Tombusvirus infection, *Plant Physiol. Biochem.*, 109, 36-44(2016).
29. Turina M., Omarov R., Murphy J. F., Bazaldua-Hernandez C., Desvoyes B., Scholthof H. B. A newly identified role for Tomato bushy stunt virus P19 in short distance spread, *Mol. Plant Pathol.*, 4, 1, 67-72(2003).
30. Omarov R. T., Ciomperlik J. J., Scholthof H. B. RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in Tombusvirus P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.*, 104, 5, 1714-1719(2007).
31. Scholthof H. B., Desvoyes B., Kuecker J., Whitehead E. Biological activity of two tombusvirus proteins translated from nested genes is influenced by dosage control via context-dependent leaky scanning, *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 12, 8, 670-679(1999).
32. Ye K., Malinina L., Patel D. J. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing, *Nature.*, 426, 874-878(2003).
33. Vargason J. M., Szittyá G., Burgyán J., Tanaka Hall T. M. Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor, *Cell.*, 115, 7, 799-811(2003).
34. Omarov R., Sparks K., Smith L., Zindovic J., Scholthof H. B. Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-Encoded P19 and Short Interfering RNAs, *J. Virol.*, 80, 6, 3000-3008(2006).

Сведения об авторах:

Ильясова Б.Б. – автор для корреспонденции, магистр технических наук, младший научный сотрудник лаборатории «Биотехнология растений», Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Жангазин С.Б. – PhD, старший преподаватель кафедры биотехнологии и микробиологии, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Мадиров А. – студент кафедры биотехнологии и микробиологии, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Акбасова А.Ж. – PhD, доцент кафедры биотехнологии и микробиологии, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений, Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Дилдабек А.Б. – Магистр технических наук, младший научный сотрудник лаборатории «Биотехнология растений», Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Тлеукулова Ж.Б. – докторант кафедры биологии, научный сотрудник лаборатории «Биотехнология растений», Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Стамгалиева З.Б. – Магистр технических наук, младший научный сотрудник лаборатории «Биотехнология растений», Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Омаров Р.Т. – заведующий кафедрой биотехнологии и микробиологии, профессор, к.б.н., PhD, заведующий лабораторией «Биотехнология растений», Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, ул. Кажымукана 13, Нур-Султан, Казахстан.

Pyassova B.B. – **corresponding author**, Master of Science in Engineering, junior researcher of the «Plant Biotechnology» laboratory, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Zhangazin S.B. – Ph.D., Senior Lecturer of the Biotechnology and Microbiology department, Leading researcher at the Plant Biotechnology Laboratory, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Madirov A. – Student of the Biotechnology and Microbiology department, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Akbassova A.Zh. – Ph.D., Associate Professor of the Biotechnology and Microbiology department, Leading researcher at the Plant Biotechnology Laboratory, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Dildabek A.B. - Master of Science in Engineering, junior researcher of the «Plant Biotechnology» laboratory, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Tleukulova Zh.B. – Ph.D. student in Biology, researcher of the «Plant Biotechnology» laboratory, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Stamgaliyeva Z.B. – Master of Science in Engineering, junior researcher of the «Plant Biotechnology» laboratory, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Omarov R.T. – Head of the Biotechnology and Microbiology Department, Professor, Head of the Plant Biotechnology Laboratory, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazhymukan st. 13, Nur-Sultan, Kazakhstan.

¹M.Zh. Kanzhigitova

²A.M. Esimova

²M.A. Dzhakasheva

¹South Kazakhstan medical Academy, Shymkent, Kazakhstan
²M. Auezov South Kazakhstan University, Shymkent, Kazakhstan
(E-mail:molya_1503@mail.ru)

Search for promising protease producers used for molecular diagnostics

Annotation: *The article considers that the majority of biotechnologies in industry and agriculture are based on catalytic processes carried out by enzymes of microbial origin. Special importance is currently attached to enzyme preparations of proteolytic action, which is due to the significant opportunities for their multi-purpose use in various industries. Particularly relevant in recent years is the use of proteolytic enzymes in basic and applied medical research-the detection of vital proteins in the human body. In this paper, we selected the most promising strain - a producer of proteolytic enzymes. The activity of proteolytic enzymes formed by local strains isolated from natural sources (soil of the Turkestan region) was studied. Active producers of proteases are bacteria, microscopic fungi and actinomycetes. Microscopic fungi of the genus *Aspergillus* have the greatest ability to biosynthesize proteases. As a seed material, an aqueous spore suspension obtained after the growth of fungi was used. The choice of the producer strain is determined by its ability to provide sufficiently high levels of protease activity in the fermentation medium, the rate of formation of enzymes per unit mass of the substrate used, as well as the cost of the substrates themselves.*

Key words: *strains, proteases, cultivating, enzymes, proteins, screening.*

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-16-21>

Proteases are enzymes from the class of hydrolases that cleave the peptide bond between amino acids in proteins. They are one of the most important industrial enzymes [1].

The most promising sources of protease production are microorganisms. Active producers of proteases are bacteria, microscopic fungi and actinomycetes. The choice of the producer strain is determined by its ability to provide sufficiently high levels of protease activity in the fermentation medium, the rate of formation of enzymes per unit mass of the substrate used, as well as the cost of the substrates themselves [2]. We can name hundreds of microorganisms belonging to various taxonomic groups that are used in the industrial production of proteases. They are most often related to childbirth *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rizopus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aeromonas* и некоторые другие [3-6].

Microscopic fungi of the genus have the greatest ability to biosynthesize proteases *Aspergillus*: *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. terreus* [7-9]. Thus, it was found that micromycetes, unlike bacteria, form not only serine and metal-dependent proteinases, but also carboxyl proteinases and a complex of peptidases. Fungi of the genus *Aspergillus* as important industrial microorganisms for the production of various enzymes were included in the list of safe cultures [10].

37 fungal strains isolated from various natural objects (soils, plant residues, etc.) using soil breeding or storage cultures were used as the objects of research [11-12]. Identification of the selected fungi before the genus was performed based on the results obtained by analyzing macro, micro morphological features, morphological features of conidial sporulation of the culture under study, and comparison with those presented in the determinants [10-12]. The selection of producing strains was carried out in two stages. At the first stage, a high-quality (Cup) method was used, which provides for growing crops on *agarized* selective nutrient media. The tested mushrooms were grown in Petri dishes on modified *Chapek* media with sodium *Caseinate* and kept in a thermostat at 30°C for 2 days. Colonies with the largest zones of hydrolysis (enlightenment) of the nutrient medium, protease activity was estimated by the ratio of the diameter of the enlightenment zones (d_{zones}) and the diameter of the colonies (d_{colonies}). Deep cultivation of fungi was carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks with 50 ml of nutrient medium on a rocker (180-200 rpm) at 26-30°C for 4-7 days. The nutrient medium contained (g/l): rye bran-20.0; malt sprouts-5.0; NH_4NO_3 (medium # 1) - 1.0; KH_2PO_4 -1.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5; KCl - 0.5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.01. *The initial pH of the nutrient medium is 4.5.*

As a seed material, an aqueous spore suspension obtained after the growth of fungi on a supporting medium for 14 days at 24-26 °C was used. At the end of cultivation, the biomass was separated by filtration, and the culture liquid filtrate was used for analysis. The total proteolytic activity was determined by a modified Anson method [13] in which a 2% solution of bovine hemoglobin denatured with urea was used as a substrate. As a unit of proteolytic activity, the amount of the enzyme was taken, which in 1 minute under experimental conditions (30-50°C, pH 5.0) catalyzes the transition to the state of such an amount of hemoglobin that contains 1^{mmol} of tyrosine (1^{mmol} of tyrosine is 0.181 mg), which is not precipitated by a 5% solution of trichloroacetic acid. The experimental results presented in this paper represent the average values of 3-5 experiments. For statistical processing of the obtained data, the Microsoft Excel computer program was used.

To increase the effectiveness and reduce the time of detection of biologically active compounds, the selection of the screening method is relevant when searching for producers of any groups of substances of natural origin. The criterion for evaluating the decay of a substance, sample, or material can be the formation of colonies of microorganisms and the appearance of lysis zones. In microbiological practice, the screening method is used to detect the presence of enzymes by seeding on Petri dishes and in test tubes.

The literature presents Express methods of selection of microorganisms-producers of proteases on nutrient media containing various protein substrates: meat-peptone gelatin (MPG) «column» in a test tube, rolled horse or bovine serum, milk, blood agar. To detect proteolytic activity, a modified CAPEC medium with sodium *Caseinate* was used. Microorganisms with proteolytic activity formed lysis zones on the medium with casein, forming a transparent area around the colonies.

Using the above-mentioned Express method, the ability of 37 *micromycetes* isolated from the environment was analyzed. The ability to produce proteases was detected in 11 cultures, of which 7 strains were related to the genus *Aspergillus*, 2 – *Actinomyces*, 2 – *Trichoderma*. The relationship of the diameters of lysis areas and diameters of colonies made up: of 1.02– 2.03. The most active protease-producing strains were selected based on the maximum values of the $d_{\text{zone}} / d_{\text{colony}}$ ratio of the colony (table 1).

Table 1 – Comparative analysis of collection strains-producers of proteases

| № | Strains | Sampling location | $d_{\text{zones}} / d_{\text{colonies}}$ | KOE/ $\text{r} \times 10^{-6}$ |
|---|----------------------|--|--|-----------------------------------|
| 1 | <i>A. flavus</i> | Tolebi district, vill. Tasaryk, serozem | 1,06±0,05 | 16,1 |
| 2 | <i>A. foetidus</i> 1 | Kazygurt district, village. Rabat, serozem | 1,02±0,05 | 15,4 |

| | | | | |
|----|------------------------------------|--|-----------|------|
| 3 | <i>A. orizae 1</i> | Arys, vill. Montaitas, Sierozem | 1,92±0,04 | 17,4 |
| 4 | <i>A. niger 1</i> | Saryagash district, village Tabolina, the Sierozem | 2,03±0,03 | 8,7 |
| 5 | <i>A.orizae2</i> | Tulkibas district, village of Yntymak, Sierozem | 1,55±0,04 | 11,4 |
| 6 | <i>A. niger 2</i> | Tolebi district, Lenger city, the Sierozem | 1,68±0,04 | 9,3 |
| 7 | <i>Tr. viride</i> | Maktaral district, zhetisay city, Sierozem | 2,00±0,04 | 15,3 |
| 8 | <i>Tr. koningii</i> | Shymkent, Enbekshidistrict, Sierozem | 2,02±0,05 | 15,5 |
| 9 | <i>A. foetidus2</i> | Tulkibas district, village of Yntymak, Sierozem | 1,84±0,05 | 11,5 |
| 10 | <i>Actinomyces ther movulgaris</i> | Shymkent, al-Farabidistrict,Sierozem | 1,93±0,05 | 10,4 |
| 11 | <i>Actinomyces fradiae</i> | Saryagash district, Derbesek village, Sierozem | 1,85±0,04 | 10,6 |

This method made it possible to quickly differentiate colonies with proteolytic activity. The largest diameter of clarification around the colonies were the following strains: *A. niger 1*, isolated from the gray-earth soil of Saryagash district, Tabolino village; *Tr. koningii*, isolated from the soil of Enbekshinsky district, Shymkent and *Tr. viride*, isolated from the soil of Maktaralsky district, Zhetysay. However, for quantitative determination of protease activity, it is necessary to screen the most active variant during deep cultivation of microorganisms, which served as the next stage of work

In order to obtain directed biosynthesis of proteolytic enzymes and increase the productivity of protease-producing strains, the influence of natural nutrient medium was studied, taking into account the physiological needs of the producers. When selecting the components of the natural nutrient medium, the fact that starch and proteins are favorable for the active formation of proteases was taken into account, that is, the main components of the medium should be grain raw materials. We conducted a search for grain raw materials that have a low cost. Such a source in the Turkestan region may be rye used for feeding livestock. Rye (*Secale cereale*) is a cereal crop, its advantages are simplicity of processing, low requirements to soils and fertilizers, as well as good frost resistance. This culture most fully corresponds to the natural and climatic potential of the main zones of the country, including Central Asia and southern Kazakhstan. High adaptive capacity of rye, stability of yield and green mass, agrotechnical significance as a good precursor put it at the moment among the most important agricultural crops. Studies have shown that the greatest biosynthesis of proteases is detected in the medium on 3-4 days of cultivation. The level of protease synthesis by the selected cultures in this case was 7.6-18.4 u / ml (table 2). The maximum level of biosynthesis of proteolytic enzymes was characterized by *A. niger 1*-18.4 u/ml.

Table 2 – biosynthesis of proteolytic enzymes by selected strains during deep cultivation

| № | Producerstrain | Biomass, mg / ml | PS, units / ml | The time of growth, t |
|---|---------------------|------------------|----------------|-----------------------|
| 1 | <i>A. niger 1</i> | 4,8 | 18,4 | 48 |
| 2 | <i>Tr. viride</i> | 3,2 | 7,6 | 72 |
| 3 | <i>Tr. koningii</i> | 2,5 | 9,6 | 72 |

Thus, because of a step-by-step two-stage screening of proteolytic enzyme producers, the *A. niger 1* strain was selected among the strains isolated from the soils of the Turkestan region. As the most active and promising protease producer, the selected strain can be used to create a domestic biotechnology for obtaining protease enzyme preparation in fundamental and applied medical research-the detection of vital proteins in the human body.

Список литературы

1. Поляков В.А., Римарева Л.В. Концентрированные ферментные препараты для спиртовой промышленности // Ликероводочное производство и виноделие – 2000. - № 9. - С.6-8.
2. Лукерченко В.Н. Новое в организации биохимических процессов при производстве спирта. // Ферментная и спиртовая промышленность.-2002. № 1. С. 32-33.
3. Котов В.Б., Коновалов С.А. О возможности прямой диссимиляции аминокислот дрожжами // Ферментная и спиртовая промышленность -1965. №2. - С. 9-15.
4. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай [и др.]; под ред. В.И. Билай. – Киев: Наук. думка, 1973. 242 с.
5. Веселов И.Я., Канн А.Г., Грачева И.М. Синтез аминокислот и образование высших спиртов при брожении // Ферментная и спиртовая промышленность.-1964. -№ 8. - С. 7 -9.
6. Маринченко В.А., Смирнов В.А., Устинников Б.А. Технология спирта - М.: Легкая и пищевая технология, -1981. 416 с.
7. Авдеев А.Н., Носовская Л.Т., Лаптева Н.К. Технологическая оценка зерна ржи перспективных сортов как сырья для производства крахмала //Хранение и переработка сельхоз сырья. — 2003. -№3, С.66-67.
8. Яровенко В. Технология спирта. - М.: Колос. -1999. 464 с.
9. Неклюдов А.Д., Федорова Н.В. и др. Влияние аминокислот и полипептидов на процесс автолиза биомассы *Sacch. cerevisiae*// Прикладная биохимия и микробиология – 1994. - Т. 30 - №1. С. 127-131.
10. Полуянова М.Т., Устинников Б.А. Потери углеводов при сбраживании высококонцентрированного суслу // Ферментная и спиртовая промышленность – 1975. - № 5. С.22-24.
11. Яковлева М.Б., Карпенко М.Л. Козельцев В.Л. Метод выделения грибов, обладающих протеолитической активностью. // Выделение, идентификация и хранение микромицетов и других микроорганизмов (сб. статей). Вильнюс. -1990. С. 101-192.
12. Практикум по микробиологии: учеб.пособие для студ. высш. уч. заведений / А.И. Нетрусов [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
13. Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Казакевич И.О., Евтушенков А.Н. Чашечный метод скрининга микроорганизмов – продуцентов ксилоизомеразы // Микробиология. – 2004. - № 1. - С.126-132.

М.Ж. Канжигитова¹, А.М. Есимова², М.А. Джакашева²

¹Южно-Казахстанский медицинский академия, Шымкент, Казахстан

²Южно-Казахстанского университета имени М.Ауэзова, Шымкент, Казахстан

Поиск перспективных продуцентов протеаз, применяемых для молекулярной диагностики

Аннотация. В статье рассматривается что в основе большинства биотехнологий в промышленности и сельском хозяйстве лежат каталитические процессы, осуществляемые ферментами микробного происхождения. Особое значение в настоящее время придается ферментным препаратам протеолитического действия, что обусловлено значительными возможностями их многоцелевого применения в различных отраслях. Особо актуальным в последние годы применение протеолитических ферментов в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях - обнаружения жизненно важных белков в организме человека. В данной работе отобран наиболее перспективный штамм-продуцент протеолитических ферментов. Исследованы активности протеолитических ферментов, образуемых местными штаммами, выделенных из природных источников (почвы Туркестанской области). Активными продуцентами протеаз являются бактерии, микроскопические грибы и актиномицеты. В наибольшей степени способность к биосинтезу протеаз обладают микроскопические грибы рода *Aspergillus*. В качестве посевного материала использовали водную споровую суспензию, полученную после роста грибов. Выбор штамма продуцента определяется его способностью обеспечить достаточно высокие уровни активности протеаз в ферментационной среде, скоростью образования ферментов с единицы массы используемого субстрата, а также стоимостью самих субстратов.

Ключевые слова: штаммы, протеазы, культивирование, ферменты, белки, скрининг.

¹ М.Ж. Қанжігітова, ² А.М. Есимова, ² М.А. Джакашева

¹Оңтүстік Қазақстан медицина академиясы, Шымкент, Қазақстан

²М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан университеті, Шымкент, Қазақстан

Молекулярлық диагностикада қолданылатын перспективалы протеаздың продуценттерін іздеу

Аңдатпа. Мақалада өнеркәсіпте және ауыл шаруашылығында көптеген биотехнологиялық әдістер микробтық тектес ферменттер жүзеге асыратын каталитикалық процестерге негізделуі қарастырылады. Қазіргі уақытта протеолитикалық әсер ететін ферменттік препараттарға ерекше мән беріледі, бұл әртүрлі салаларда оларды көп мақсатты қолданудың нақты шамадағы мүмкіндіктеріне байланысты. Соңғы жылдары протеолитикалық ферменттерді іргелі және қолданбалы медициналық зерттеулерде қолдану адам ағзасындағы өмірлік маңызды ақуыздарды анықтау аса өзекті болып табылады. Бұл жұмыста ең келешегі бар штамм-протеолитикалық ферменттердің продуценті іріктеледі. Табиғи көздерден (Түркістан облысының топырағынан) бөлінген жергілікті штаммдармен түзілетін протеолитикалық ферменттердің белсенділігін зерттеу қарастырылады. Протеиназдың белсенді продуценттері бактериялар, микроскопиялық саңырауқұлақтар және актиномицеттер болып табылады. Протеаз биосинтезге қабілеттілігі жоғары дәрежеде *Aspergillus* текті микроскопиялық саңырауқұлақтар бар. Егістік материал ретінде саңырауқұлақтардың өсуінен кейін алынған сулы споралардан құралған суспензия қолданылады. Продуцент штаммын таңдау оның ферментациялық ортада протеаз белсенділігінің жеткілікті жоғары деңгейін қамтамасыз ету қабілетімен, пайдаланылатын субстрат массасының бірлігінен ферменттердің пайда болу жылдамдығымен, сонымен қатар, субстраттардың өз құнымен анықталады.

Түйін сөздер: штаммдар, протеаздар, культивирлеу, ферменттер, ақуыздар, скрининг.

References

1. Polyakov V.A. Rimareva L.B. Kонтсентриrovannyye fermentnyye preparaty dlya spirtovoy promyshlennosti [Concentrated enzyme preparations for the alcohol industry] *Liquor production and wine-making*, 9, 6-8. (2000).
2. Lukerchenko V.N. Novoye v organizatsii biokhimitseskiy protsessov pri proizvodstve spirta [New in the organization of biochemical processes in the production of alcohol], *Fermentnaya i spirtovaya promyshlennost*, Moscow, 1, 32-33, (2002).
3. Kotov V.B., Konovalov S.A. O vozmozhnosti pryamoy dissimilyatsii aminokislot drozhzhami [About the possibility of direct dissimilation of amino acids by yeast], *Fermentnaya i spirtovaya promyshlennost*, Moscow, 2, 9-15. (1965).
4. V.I. Bilay et al. Metody eksperimentalnoy mikologii [Methods of experimental mycology], Kiev: Nauk. Dumka, 1973, 237- 242 pp.
5. Veselov I.Ya., Cannes A.G., Gracheva I.M. Sintez aminokislot i obrazovaniye vysshikh spirtov pri brozhenii [The synthesis of amino acids and the formation of higher alcohols during fermentation], *Fermentnaya i spirtovaya promyshlennost*, Moscow, 8, 7 -9, (1964).
6. Marinchenko V.A., Smirnov V.A., Ustinnikov B.A. Tekhnologiya spirta [Alcohol technology], M: Legkaya i pishhevaya promyshlennost', 1981, -416 p.
7. Avdeev A.N., Nosovskaya L.T., Lapteva N.K. Tekhnologicheskaya otsenka zerna rzhii perspektivnykh sortov kak syr'ya dlya proizvodstva krakhmala [Technological evaluation of rye grain of promising varieties as raw materials for starch production], *Storage and processing of agricultural raw materials*, 3, 66 - 67. (2003).
8. Yarovenko B. Tekhnologiya spirta [Technology of alcohol], M.: Kolos, 1999, 464 p.
9. Neklyudov A.D., Fedorova N.V. et al. Vliyaniye aminokislot i polipeptidov na protsess avtoliza biomassy Sacch. cerevisiae [Effect of amino acids and polypeptides on the autolysis of Sacch biomass. *Cerevisiae*], *Applied Biochemistry and Microbiology*, 30(1), 127-131, (1994).
10. Poluyanova M.T., Ustinnikov B.A. Poteri uglevodov pri sbrazhivanii vysokokontsentrirrovannogo susla [Loss of carbohydrates during the fermentation of highly concentrated wort] *Fermentnaya i spirtovaya promyshlennost*, Moscow, 5, 22-24. (1975).
11. Yakovleva M.B. Karpenko M.L. Kozeltsev V.L. Metod vydeleniya gribov, obladayushchikh proteoliticheskoy aktivnost'yu [Method for isolating fungi with proteolytic activity], *Isolation, identification and storage of micromycetes and other microorganisms (collection of articles)*. Vilnius. 5,101–192. (1990).

12. A.I. Netrusova Praktikum po mikrobiologii [Workshop on Microbiology], textbook for students. Higher student institutions / M.: Publishing Center «Academy», 2005, 608 p.
13. Sapunova L.I., Lobanok A.G., Kazakevich I.O., Evtushenkov A.N. Chashechnyy metod skringa mikroorganizmov – produtsentov ksiloizomerazy [The Cup Method for Screening Microorganisms Producing Xylisomerase], Microbiology, 1, 126-132. (2004).

Сведения об авторах:

Қанжігітова М.Ж. – корреспонденция үшін автор, «Биотехнология» мамандығының 2 курс докторанты, М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан.

Есимова А.М. – химия ғылымының кандидаты, доцент, М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан.

Джакашева М.Ә. – PhD, М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан.

Kanzhigitova M.Zh. – **corresponding author**, «Biotechnology» PhD 2-year doctoral student. M. Auezov South Kazakhstan state University named after, 5 Tauke-Khan street, Shymkent, Kazakhstan.

Esimova A.M. – Ph.D. Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor, M. Auezov South Kazakhstan state University, G. Ilyeva 8, Shymkent, Kazakhstan.

Dzhakasheva M.A. – Ph.D., M. Auezov South Kazakhstan State University, G. Ilyev St.8, Shymkent, Kazakhstan.

А.Т. Хусаинов¹, Б.Х. Есенжолов¹
Т.Н. Жаркинбеков¹, А.А. Сарсенова², Г.Р. Данкина¹

¹Ш. Уәлиханов атындағы Көкшетау университеті, Көкшетау, Қазақстан
²«ҒӨБ «АгроБиоТехновации» ААҚ, Омбы, Ресей Федерациясы
(E-mail: e_baur_1985@mail.ru)

«Агробионов» препаратын енгізген кезіндегі кәдімгі қара топырақтың микрофлорасы, қоректену элементтерімен қамтамасыз етілуі және жаздық бидайдың өнімділігі

Аңдатпа. Мақалада «Агробионов» препаратын енгізген кезде кәдімгі қара топырақтың микрофлорасы, микробиологиялық белсенділігі және қоректену элементтерімен қамтамасыз етілуі жайлы зерттеу нәтижелері келтіріледі. Зерттеудің мақсаты кәдімгі қара топырақтың биологиялық қасиеттері, қоректену элементтерімен қамтамасыз етілуі және жаздық бидайдың өнімділігі бойынша препаратты енгізу мөлшеріне агроэкологиялық баға беру болып табылады. Топырақтың микробиологиялық белсенділігі зығыр матасынан жасалған төсемшелерді аппликациялау әдісімен анықталды. Микроорганизмдердің келесі тобы зерттелді: азоттың органикалық қосылыстарын утилизациялайтын бактериялар; минералдық азотты тұтынатын микроорганизмдер; олигонитрофилдер; минералды фосфаттарды тасымалдаушы бактериялар; целлюлоза бұзғыш микроорганизмдер; нитрификаторлар; саңырауқұлақтар. Зерттелетін препарат микробиологиялық белсенділікті, микроорганизмдердің жалпы санын, оның ішінде, агрономиялық құнды микроорганизмдерді, топырақтың жеңіл гидролизденетін азотпен қамтамасыз етілуін және жаздық бидайдың өнімділігін арттыратындығы анықталды. **Түйін сөздер:** кәдімгі қара топырақ, жаздық бидай, «Агробионов» препараты, микрофлора, гумус, микроэлементтер, өнімділік.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-22-31>

Кіріспе. Ауыл шаруашылығы мақсаттағы жерлерді жаппай пайдалану жағдайында топырақтың беткі қарашірік қабатын үздіксіз жырту салдарынан, оның құрылымы өзгеріске ұшырап, ай-мақтардағы топырақтардың агрогендік деградацияға ұшырауына алып келді, сондықтан дегу-мификация себептерін зерттеу қажеттілігі туындап отыр [1].

Нарықтық экономиканың қарқынды дамуы және елдегі азық-түлік қауіпсіздігін қамтамасыз ету қажеттілігі жағдайында жер қорын, әсіресе, ауыл шаруашылығы маңызы бар жерлерді оңтайлы және тиімді пайдалану маңызды рөл атқарады [2].

А.С. Сапаровтың және т.б. (2016) мәліметтері бойынша соңғы жылдары Қазақстан Республикасы аумағының 75%-ға жуығы шөл басу қаупі жоғары аймаққа жатады, ал жайылымдардың деградациялануы 14% деңгейіне жеткен және топырақ құнарлылығының төмендеуі байқалады. Бүгінгі күні гумус құрамының төмендеу көрсеткіші оның бастапқы құрамының үштен бірін құрайды. Сондықтан негізгі міндеттердің бірі топырақтың құнарлылығын сақтау, арттыру және қалпына келтіру болып табылады [3].

Осы мәселелердің туындауының себептерінің бірі қайтарым заңының сақталмауы, яғни топырақтан алынған қоректік заттар минералдық тыңайтқыш түрінде оған қайта енгізілуі қажет. Минералды тыңайтқыштардың құны қымбат болғандықтан, оның орнына балама ретінде арзан өнеркәсіп қалдықтарын пайдалануға болады.

Мақаланың мақсаты – кәдімгі қара топырақтың биологиялық қасиеттері, қоректену элементтерімен қамтамасыз етілуі және жаздық бидайдың өнімділігі бойынша «Агробинонов» препараттын енгізу мөлшеріне агроэкологиялық баға беру.

Міндеттері:

- «Агробинонов» препараттын енгізу мөлшерінің кәдімгі қара топырақтыңмикробиологиялық белсенділігіне, қоректену элементтерімен қамтамасыз етілуіне әсерін анықтау;
- препаратты енгізу мөлшерінің жаздық бидайдың өнімділігіне әсерін зерттеу.

Жұмыстың ғылыми жаңалығы Солтүстік Қазақстан жағдайында «Агробинонов» препараттын енгізу мөлшерінің кәдімгі қара топырақтың микробиологиялық белсенділігіне, гумус құрамы мен қоректік элементтерге әсерін анықтау болып табылады.

«Агробинонов» препаратын пайдалану микробиологиялық процестердің активизациясы және ондағы жеңіл гидролизденетін азоттың құрамын арттыру есебінен қарапайым қара топырақтың құнарлылығын, сондай-ақ жаздық бидайдың өнімділігін арттыруға мүмкіндік береді.

Зерттеу нысаны, жағдайы мен әдістері. Зерттеу нысандары: кәдімгі қара топырақ, жаздық бидай.Зерттеу пәні ұнтақ түріндегі Агробинонов препараты, оның құрамына Екібастұз тас көмірінен шыққан төменкальцийлі күл, техникалық көміртегі кіреді. Екібастұз кен орны көмірінің күлінің химиялық құрамы: SiO₂ 62,9%, Fe₂O₃ 6,35%, Al₂O₃ 26,35%, CaO 1,9% MgO 0,9%, SO₃ 1,2%, Na₂O 0,23%. Күлдің макро - және микроэлементті құрамы кему бойынша келесі элементтерден тұрады: K > Fe > Al > Mg > Ca > Mn > Sr > Pb > Co > Zn > Cu > Sn > As > Ni > Cd > Hg. Техникалық көміртек 99 %астам көміртектен тұрады[4].

Тәжірибе Ш. Уәлиханов атындағы Көкшетау мемлекеттік университетінің «Элит» оқу ғылыми-өндірістік орталығы негізінде қойылды.

Тәжірибелік учаскенің топырақ жамылғысы-кәдімгі қара топырақ, карбонатты, орташа қуатты, азгумусты, ауыр саздауытты. Егістіктің топырақтың қабатында 3,96% гумус бар, топырақ ерітіндісінің реакциясы әлсіз (рН – 7,9). Жеңіл гидролизденетін азоттың құрамы 46 мг/кг және жылжымалы фосфор 17 мг/кг құрады.Жеңіл гидролизденетін азоттың қамтамасыз етілу дәрежесі Тюрин және Кононов бойынша орташа, ал жылжымалы фосфор Мачигин бойынша төмен болып саналады[5].

2018 жылы вегетациялық кезеңдегі орташа тәуліктік температура (мамыр-қазан) 15,1°С құрады, көпжылдық орташа тәуліктік температурамен (16,22°С) салыстырғанда 1,12°С төмен, 2019 жылы – 16,3°С құрады, көпжылдық орташа тәуліктік температура деңгейінде қалды. Атмосфералық жауын-шашын мөлшеріне келетін болсақ, 2018 жылы 242 мм түсті, бұл орташа көпжылдық көрсеткішпен(211 мм) салыстырғанда 31 мм артық, ал 2019 жылы-188мм, яғни көпжылдық орташа мөлшерден 23 мм-ге төмен.

Тәжірибе 4 реттік қайталанымда келесі схема бойынша жүргізілді: бақылау-тыңайтқышсыз; P16 (есептік мөлшердің 1/10), фон; минералды фонға Агробинонов препаратын 100, 200, 300, 400, 500 кг/га мөлшерде себу алдында топыраққа енгізілді. Мөлдектердің ауданы: 125 м², (5 x 25 м); есепке алу алаңы: 100 м², (4x25 м).

Тәжірибелерде келесі талдаулар іске асырылды: 0-40 см топырақ қабатынан топырақ үлгілерін алу МемСТ 28168-89 сәйкес көктемде егіс алдында, жазда жұмсақ жаздық бидайдың түптену кезеңінде және күзде егін жинағаннан кейін жүргізілді.

Зерттеу барысында келесі есептеулер мен бақылау жүргізілді: топырақтың органикалық заты (гумус) Тюрин әдісімен, МемСТ 26231-91; топырақтың микробиологиялық белсенділігі аппликация әдісімен Мишустин бойынша; өнімділікті есептеу Доспеховтың Б.А., (1985) дала-

лық тәжірибе әдістемесі бойынша; мәліметтерді статистикалық өңдеу Фишер бойынша Доспевхоттың Б.А. мазмұндауында (1985 ж.) [6].

Топырақтағы микроорганизмдердің саны топырақ суспензиясын қатты қоректік ортаға себу жолымен есептелді: азоттың органикалық қосылыстарын утилизациялайтын бактериялар үшін ет-пептонды агар (ЕПА), минералды азотты тұтынатын микроорганизмдер үшін крахмалды-аммиакты агар (КАА), олигонитрофилдер үшін Мишустина ортасы, минералды фосфаттарды тасымалдаушы бактериялар үшін Муромцева-Герретсенортасы, целлюлоза бұзғыш микроорганизмдер үшін Гетчинсон ортасы, нитрификаторлар үшін су агарға фосфор қышқылының қос аммоний – магний тұзын қосу арқылы, саңырауқұлақтар үшін сүт қышқылымен қышқылданған – Чапек ортасы [7].

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау. Жүргізілген зерттеу жұмысының нәтижесінде «Агробионов» препараты мөлшерлерінің топырақтың целлюлозолитикалық қабілетіне қолайлы әсері анықталды. Зығыр төсемшелерінің шіруі үш фазада - түптену, масақтану және дәннің қалыптауы кезінде егжей – тегжейлі қарастырылды (кесте1).

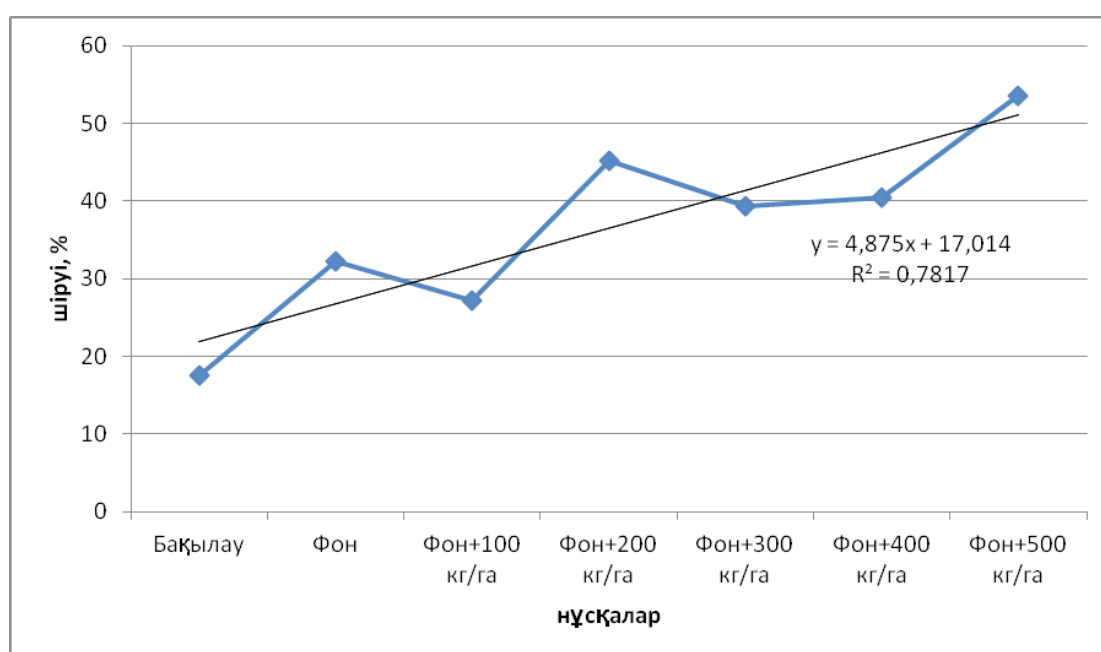
Кесте 1 – «Агробионов» препаратын енгізу мөлшерінің топырақтың целлюлозолитикалық белсенділігіне әсері

| № | нұсқалар | жылдар | мамыр | шілде | қыркүйек | орташа жылдық |
|---|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| 1 | Бақылау | 2018 | 17,1 | 30,9 | 9,9 | 19,3 |
| | | 2019 | 14 | 25,7 | 8,1 | 15,9 |
| | | <i>орташа</i> | <i>15,55</i> | <i>28,3</i> | <i>9</i> | <i>17,6</i> |
| 2 | 1/10P158 -фон | 2018 | 38,4 | 52,6 | 46,6 | 45,9 |
| | | 2019 | 19,2 | 30 | 6,2 | 18,5 |
| | | <i>орташа</i> | <i>28,8</i> | <i>41,3</i> | <i>26,4</i> | <i>32,2</i> |
| 3 | Фон+100 кг/га | 2018 | 26,6 | 38,4 | 20,8 | 28,6 |
| | | 2019 | 23,3 | 46,9 | 7 | 25,7 |
| | | <i>орташа</i> | <i>24,95</i> | <i>42,65</i> | <i>13,9</i> | <i>27,15</i> |
| 4 | Фон+200 кг/га | 2018 | 42,1 | 75 | 42,9 | 53,4 |
| | | 2019 | 35,3 | 40,1 | 36 | 37,1 |
| | | <i>орташа</i> | <i>38,7</i> | <i>57,55</i> | <i>39,45</i> | <i>45,25</i> |
| 5 | Фон+300 кг/га | 2018 | 36,2 | 68,4 | 23,5 | 42,7 |
| | | 2019 | 54,2 | 43,4 | 10,9 | 36,2 |
| | | <i>орташа</i> | <i>45,2</i> | <i>55,9</i> | <i>17,2</i> | <i>39,45</i> |
| 6 | Фон+400 кг/га | 2018 | 46,1 | 70,6 | 35,6 | 50,7 |
| | | 2019 | 38,9 | 39 | 13,2 | 30,4 |
| | | <i>орташа</i> | <i>42,5</i> | <i>54,8</i> | <i>24,4</i> | <i>40,55</i> |
| 7 | Фон+500 кг/га | 2018 | 59,5 | 92,1 | 83,9 | 78,5 |
| | | 2019 | 32,7 | 41 | 12,2 | 28,6 |
| | | <i>орташа</i> | <i>46,1</i> | <i>66,55</i> | <i>48,05</i> | <i>53,55</i> |

1-кестеден байқағанмыз, 2019 жылы топырақтағы целлюлозолитикалық белсенділік 2018 жылға қарағанда төмен болды. Себебі 2019 жылы вегетациялық кезеңде 2018 жылмен салыстырғанда жауын-шашын 53 мм аз түскен, ал температура 1°С ыстығырақ болған. Топырақтың биологиялық белсенділігінде ауа райы жағдайлары үлкен рөл атқаратыны белгілі: құрғақшылық жылдары биологиялық процестер өте төмен деңгейде болса, ылғалды жылдары едәуір белсендірек жүреді [8].

Зығыр матасы төсемшелерініңшіруі 2018 жылы бақылауда 19,3% – ды, 2019 жылы-15,9%-ды құрады, ал препаратты енгізу мөлшерінің 100-500 кг/га нұсқаларында 2018 жылы 28,6-78,5% - ды, 2019 жылы 25,7-37,1% - ды құрады. Айта кету керек, «Агробинонов» препараты ауа райы жағдайына қарамастан микроорганизмдердің белсенділігіне оң әсер етеді. Салыстырмалы талдау көрсеткендей, 2019 жылы целлюлозолитикалық белсенділік тыңайтылған нұсқаларда бақылауға қарағанда орта есеппен 49,3% көп болды.

Звягинцев,Д.Г. (1980) топырақтың биологиялық белсенділігін бағалау үшін клетчатканың бұзылу қарқындылығы(вегетациялық кезеңде ыдыраған кенептің үлесі %) бойынша мынадай шкала ұсынды: < 10өте әлсіз, 10-30әлсіз, 30-50орташа, 50-80күшті, >80өте күшті [9]. Топырақтың целлюлозолитикалық белсенділігінің орташа екі жылдық көрсеткіштері бақылауда 17,6%-ды құрады, яғни оны әлсіз деп бағалаймыз, ал тыңайтылған нұсқаларда 27,7% - дан (фон+100 кг/га) 53,5% - ға дейін (фон+500кг/га) жетіп, әлсізден күштіге дейін бағаланды. Алынған мәліметтерді математикалық өңдеу препараттың мөлшері мен топырақтың биологиялық белсенділігі арасында өте тығыз $R=0,88$ корреляциялық байланыс бар екенін көрсетті (сурет 1).



Сурет1 – Жаздық бидайдың вегетациясы кезеңінде топырақтың микробиологиялық белсенділігіне «Агробинонов» препаратын енгізу мөлшерінің әсері, %

Біздің нәтижелер басқа да авторлардың зерттеулерімен расталып отыр. Щур А.В. және т. б. (2015) анықтауынша, көң мен минералды тыңайтқыштарды енгізу микробтық биомассаның жалпы құрамын арттырады, ал әктеу микроорганизмдер мен саңырауқұлақ мицелиясының жалпы құрамын төмендетеді [10]. Демек, тыңайтқыш ретінде пайдаланылған өнеркәсіп қалдықтары да, минералды және ортганикалық тыңайтқыштар сияқты топырақтың микробиологиялық белсенділігін арттырады.

Енгізілген тыңайтқыштардың топырақ микробиотасына әсер ету дәрежесін бағалау кезінде әртүрлі экологиялық-трофикалық топтардың микроорганизмдерінің санын анықтауды және олардың өзгеру сипатын (ұлғаю немесе азаю) әрдайым біржақты оң немесе теріс құбылыс ретінде қарауға болмайды. Топырақтағы микробиологиялық процестердің ауқымы микроорганизмдердің санымен ғана емес, негізінен олардың белсенділігімен анықталады. Осыған байланысты енгізілген минералды тыңайтқыштардың топырақта өтіп жатқан микробиологиялық процестердің жүру қарқындылығына әсерін зерттеу маңызды болып табылады.

Кәдімгі қара топырақтағы микроорганизмдердің жалпы саны 2018 жылы 515,3-тен 580,1 млн-ға дейін, ал 2019 жылы 124,9-дан 146,4 млн-ға дейін өзгерген. Салыстырмалы талдау көрсеткендей, 2018 жылы микроорганизмдердің жалпы саны бақылауда тыңайтылған нұсқаларда орта есеппен 11,8% - ға аз болса, ал 2019 жылы керісінше тыңайтылған нұсқада 17,2% - ға артық. Экологиялық-трофикалық топтардың арақатынасы мынадай: микроорганизмдердің жалпы санындағы үлесі 2018 жылы ЕПА бактерияларбақылауда 9,69%, фон+100кг/га - 14,29%, 2019 жылы - 16,65% және 13,93%, КАА микроорганизмдердің үлесі 2018 жылы бақылауда 10,99% және 12,27%, 2019 жылы фон+100кг/га нұсқасында 13,45% және 17,62%, олигонитрофилдер тиісінше 2018 жылы -39,71% және 35,03%, 2019 жылы-46,67% және 42%, фосфор тасымалдаушылар 2018 жылы - 39,59% және 38,39%, 2019 жылы - 23,13% және 26,36%, целлюлоза-бұзушылар тиісінше 2018 жылы 0,02% - дан, 2019 жылы - 0,06% және 0.05% (кесте 2).

Кесте 2 – «Агробионов» препаратының микрофлораға әсері

| Нұсқа | Жылдар | Сапрофит бактериялары, млн.КОЕ/г | Аммонификаторлар, млн. КОЕ/г | Олигонитрофилдер, млн. КОЕ/г | Фосфоромо-бильді, млн. КОЕ/г | Целлюлоза-разрушающие, тыс. КОЕ/г | Нитрификаторы, тыс. КОЕ/г | Саңырауқұлақтар, тыс.КОЕ/г | Микроорганизмдердің жалпы саны, млн. КОЕ/г | Ылғал, % |
|---------|--------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|--|----------|
| Бақылау | 2018 | 56,2 | 63,7 | 230,3 | 229,7 | 162,5 | 0,5 | 67,7 | 580,1 | 15,1 |
| | 2019 | 20,8 | 16,8 | 58,3 | 28,9 | 80,4 | 0,037 | 20 | 124,9 | 15,1 |
| Фон+100 | 2018 | 73,6 | 63,2 | 180,5 | 197,8 | 100,7 | 2,2 | 66,5 | 515,3 | 16,6 |
| | 2019 | 20,4 | 25,8 | 61,5 | 38,6 | 75 | 0,038 | 30,4 | 146,4 | 14,6 |

Микробиологиялық процестердің белсенділігін бағалау үшін белгілі бір топтың басым әсерін көрсететін коэффициенттер есептелді. Азоттың минералдық формасын пайдаланатын (КАА-да өсетін) микроорганизмдердің дамуы минералдану коэффициентін (КАА/ЕПА қатынасы) көрсетеді.

Аммонификаторларды бөлу топырақ суспензиясын ЕПА-ға себумен біртіндеп өсіру нәтижесінде жүзеге асырылады. ЕПА/КАА бактериялары санының арақатынасы құрамында азот бар органикалық қосылыстардың микроорганизмдермен ыдырауы кезінде пайда болатын минералдық азотты (NH₃) иммобилизациялау процесінің қарқындылығын сипаттайды.

Органикалық заттың трансформация коэффициенті (Пм) ЕПА/КАА*(ЕПА+КАА) арақатынасының туындысы ретінде есептеледі.

МуханыңВ.Д. (1980) пікірінше, Пм шамасы өсімдік қалдықтарының микробиологиялық өзгеру процесінің гумустық заттардың синтезі жағына немесе органикалық минералдану жағына бағытталғанын көрсетеді, сондықтан топырақта гумустық заттардың жиналуының әлеуетті қарқындылығын көрсетеді [11].

Зерттеу нәтижелеріне жүргізілген талдау жұмыстары 2018 жылы фон+100кг/га нұсқасында минералдану коэффициенті бақылаудан 23,9% - ға төмен, ал 2019 жылы 55,5% - ға артық екенін көрсетті. Иммобилизация коэффициенті 2018 жылы фон+100 кг/га нұсқасында бақылаудан 31,8% - ға артық болса, 2019 жылы 36,2% - ға төмен.2019 жылы фон+100 кг/га нұсқасында топырақтың органикалық затында органикалық қалдықтардың өзгеру жылдамдығының төмендеуі аммонификаторлардың тежелуіне және азотты иммобилизациялау процесіне байланысты болуы мүмкін (кесте 3).

Кесте 3 – «Агробиионов» препаратының топырақ-микробиологиялық процестердің бағыттылығына әсері

| Нұсқа | Жылдар | Орташа саны | | Минерализация коэффициенті | ЕПА+КАА | Иммобилизация коэффициенті | ПМ |
|---------|--------|----------------|----------------|----------------------------|---------|----------------------------|-------|
| | | ЕПА млн. КОЕ/г | КАА млн. КОЕ/г | | | | |
| Бақылау | 2018 | 56,2 | 63,7 | 1,13 | 119,9 | 0,88 | 105,5 |
| | 2019 | 20,8 | 16,8 | 0,81 | 37,6 | 1,24 | 46,6 |
| Фон+100 | 2018 | 73,6 | 63,2 | 0,86 | 136,8 | 1,16 | 158,7 |
| | 2019 | 20,4 | 25,8 | 1,26 | 46,2 | 0,79 | 36,5 |

Өнеркәсіп қалдықтарының микробиологиялық белсенділікке әсері туралы жүргізілген көптеген шетелдік зерттеулерде біздің тәжірибемізді растап отыр. Сервелли т.б. (1986), Вонг т.б. (1986) және Питчелдің (1990) келтірілген мәліметтері бойынша күл шлактытопыраққа енгізу оның аэрациясы мен ферменттердің белсенділігін ғана емес, сонымен қатар нитрификация және минералдану сияқты топырақтағы азот циклінің процестерін де айтарлықтай жақсартатындығын көрсетіп отыр [12-14]. Алайда, Артур және т.б (1984) анықтауынша, күл шлакты шамадан тыс қолдану (400-700т/га) топырақтың микробиологиялық белсенділігіне кері әсер етеді [15].

«Агробиионов» препаратын қолдану құнарлылық көрсеткіштерінің және қоректік элементтердің құрамының артуына оң әсер етті. Орта есеппен екі жылда тыңайтылған нұсқаларда «Агробиионов» препаратын енгізу мөлшерініңартуына қарай, гумус құрамының өсу үрдісі байқалады. Препараттың құрамында гумус түзілу процесіне қатысатын көміртегі бар болғандықтан, оны қолдану кем дегенде гумустың құрамын сақтап қалуға мүмкіндік береді (кесте 4). Препарат құрамында фосфор және азот сияқты элементтер жоқ десе де болады, бірақ топырақтағы микроорганизмдерді белсендіру есебінен нитритті азот жинақталады, ол жаздық бидайдың мол өнімін қалыптастыру үшін қолданылады.

Кесте 4 – «Агробиионов» препаратының гумус құрамына және қоректену элементтеріне әсері

| Нұсқалар | Гумус % | Фосфор, мг/кг | | | | Азот, мг/кг | | | |
|-----------------------------|---------|---------------|------|-------|------|-------------|------|-------|------|
| | | жазғы | | күзгі | | жазғы | | күзгі | |
| | | орташа | 2018 | 2019 | 2018 | 2019 | 2018 | 2019 | 2018 |
| Препаратты енгізгенге дейін | 3,96 | 17,0 | | - | | 46,0 | | - | |
| Бақылау | 4,42 | 10,0 | 16 | 11,0 | 26 | 13,0 | 106 | 25,0 | 54 |
| 1/10P158 -фон | 4,37 | 9,0 | 14 | 13,0 | 20 | 22,0 | 87 | 30,0 | 46 |
| Фон +100кг/га | 4,28 | 10,0 | 12 | 15,0 | 19 | 33,0 | 100 | 3,0 | 49 |
| Фон +200кг/га | 4,60 | 18,0 | 12 | 15,0 | 21 | 35,0 | 110 | 24,0 | 52 |
| Фон +300кг/га | 4,66 | 8 | 12 | 23,0 | 26 | 21,0 | 118 | 21,0 | 55 |
| Фон +400кг/га | 4,95 | 13,0 | 12 | 18,0 | 26 | 20,0 | 117 | 35,0 | 56 |
| Фон +500кг/га | 5,08 | 11,0 | 12 | 28,0 | 28 | 38,0 | 115 | 24,0 | 57 |

«Агробиионов» перапаратын гектарына 100-500 кг аралығында топыраққа енгізу барысында жаздық бидайдың өнімділігіне келесідей әсер етті. Орташа екі жылдық көрсеткіш бойынша жаздық бидайдың өнімділігі бақылауда 10,65 ц/га құрады, ал тыңайтылған нұсқаларда бақылаумен салыстырғанда 21,8-50,2% - ға немесе 4,35 және 5,35 ц/га-ға артық болды (кесте 5).

Кесте 5 – «Агробионов» препаратын енгізу мөлшерінің жаздық бидайдың өнімділігіне әсері

| № | Нұсқалар | 2018 ж. | 2019 ж. | Орташа | Бақылаумен салыстырғанда | |
|---|-------------------------|---------|---------|--------|--------------------------|------|
| | | | | | центнер | % |
| 1 | Бақылау | 11,9 | 9,4 | 10,65 | - | - |
| 2 | 1/10 P158 – фон | 14,3 | 14,5 | 14,4 | 3,75 | 35,2 |
| 3 | фон + препарат 100кг/га | 14,5 | 15,5 | 15 | 4,35 | 40,8 |
| 4 | фон + препарат 200кг/га | 15,7 | 14,9 | 15,3 | 4,65 | 43,7 |
| 5 | фон + препарат 300кг/га | 15,9 | 15,3 | 15,6 | 4,95 | 46,5 |
| 6 | фон + препарат 400кг/га | 16,5 | 15,5 | 16 | 5,35 | 50,2 |
| 7 | фон + препарат 500кг/га | 16,4 | 14,4 | 15,4 | 4,75 | 44,6 |

Қорытынды. «Агробионов» препаратын қолдану топырақтың микробиологиялық белсенділігін, микроорганизмдердің санын, оның ішінде аммонификациялаушы бактериялар мен нитрификаторлардың санын, кәдімгі қара топырақтың жеңіл гидролизденетін азотпен қамтамасыз етілуін және жаздық бидайдың өнімділігін бақылаумен салыстырғанда 21,8-50,2% - ға арттырады.

Әдебиеттер тізімі

1. Пашков С.В., Байбусинова С.Б. Солтүстік Қазақстан топырағының құнарлылығының табиғи-агрогендік шарттылығы // Забайкал мемлекеттік университетінің хабаршысы. - 2017.- Т. 23. №2 .- 16-27 б.
2. Аханов Ж. У. Топырақ ғылымының даму тенденциялары туралы аналитикалық жазба // Почвоведение и агрохимия. -2008. №1. - 6-13б.
3. Сапаров А.С., Елешев Р.Е., Сулейменов Б.У.Қазақстан топырақ-агрохимия ғылымының қазіргі мәселелері және оларды шешу жолдары //Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясының хабарлары. Аграрлық ғылымдар сериясы. -2016. №1. -91-101 б.
4. Сарсенова А.А. Өнертабысқа патент-топырақтың құнарлылығын арттыруға арналған мелиоративтік препарат.RU 2494137 С2. -2013 №27
5. Евтефеев Ю.В., Казанцев Г.М. Агрономия негіздері: оқу құралы /. — М.: ФОРУМ, 2013. — 368 б.
6. Доспехов Б.А. Далалық тәжірибе әдістемесі. М.: Агротехиздат, 1985. 351 б.
7. Аристовская Т.В. Владимирская, М.М. Голлербах Т.В. және т.б.Микробиология бойынша үлкен практикум. Москва: Жоғарғы мектеп, 1962. – 490 б.
8. Максуюков Н.А., Зенкова Н.А. Ауа райы, бұрынғы егілген егіс, қоректік фон жағдайына байланысты оңтүстік қара топырақты биологиялық және микробиологиялық белсенділігі// Орынбор мемлекеттік аграрлық университетінің хабарлары. -2017 ж. № 4(66). -206-09 б.
9. Звягинцев,Д.Г. Топырақтың биологиялық белсенділігі және оның кейбір көрсеткіштерін бағалауға арналған шкалалар // Топырақтану.Мәскеу -1978. № 6. - 48-54 б.
10. ШурА. В., Вальков. П., Виноградов,Д. В.Топырақ өңдеу және тыңайтқыш енгізу тәсілдерінің микроорганизмдердің саны мен құрамына әсері // Курск мемлекеттік ауылшаруашылық академиясының хабаршысы. -2015. №3.128–133б.
11. Муха В.Д. Топырақ процестерінің қарқындылығы мен бағытын көрсететін көрсеткіштер туралы // Шығар. жинағы. Харьков. инс-ты Харьков. – 1980. – Т. 273. 13–16 б.
12. Серевалли С., Петруззелли Г., Перна А., Меникали Р.Топырақтағы азот пенкүлшлақты қолдану: зертханалық зерттеу», Агротехимия, - 1986. №30, 27-33б.
13. Вонг М.Х., Вонг, Дж.В.С. Күлшлақтың топырақтың микробиологиялық белсенділігіне әсері, Қоршаған орта.Ластану,-1986. А(40), 127–144 б.

14. Питчел Дж.Р. Құлде микробтардық тыныс алуы/ағынды сулардың шөгуі, топырақ түзетулерімен, Қоршаған орта.Ластану, -1990. № 63, 225-237 б.

15. Артур М.Ф., Цвик Т.К., Толле Д.А., Ванворис П. Құлдің ауылшаруашылық жерлерінің топырағынан СО₂ микробтық секрецияларына әсері. Су, ауа және топырақтың ластануы.- 1984. № 22, 209-216 б.

А.Т. Хусаинов¹, Б.Х. Есенжолов¹, Т.Н. Жаркинбеков¹, А.А. Сарсенова², Г.Р. Данкина¹

¹Кокшетауский государственный университет им. Ш. Уалиханова, город Кокшетау

²ООО «НПО «АгроБиоТехновации», Омск, Российская Федерация

Микрофлора, обеспеченность элементами питания чернозема обыкновенного и урожайность яровой пшеницы при внесении препарата «агробиионов»

Аннотация: В статье приводятся результаты исследования микрофлоры, микробиологической активности и обеспеченности элементами питания чернозема обыкновенного при внесении препарата «Агробиионов». Целью исследования является дать агроэкологическую оценку доз внесения препарата по биологическим свойствам и обеспеченности элементами питания и урожайности яровой пшеницы. Микробиологическую активность почвы определяли методом аппликации льнополотна. Изучали следующую группу микроорганизмов: бактерии, утилизирующих органические соединения азота; микроорганизмы, потребляющие минеральный азот; олигонитрофилы; бактерии, мобилизующие минеральные фосфаты; целлюлозоразрушающие микроорганизмы; нитрификаторы; грибы. Установлено, что исследуемый препарат повышают микробиологическую активность, общую численность микроорганизмов, в том числе агрономических ценных микроорганизмов, обеспеченности почвы легкогидролизуемым азотом и урожайность яровой пшеницы.

Ключевые слова: чернозем обыкновенный, яровая пшеница, препарат «Агробиионов», микрофлора, гумус, макроэлементы, урожайность.

A. Khusainov¹, B. Yessenzholov¹, T. Zharkinbekov¹, A. Sarsenova², G. Dankina¹

¹Sh. UalikhanovKoksetau State University, Kokshetau, Kazakhstan

²LLC Scientific-Production Association "AgroBioTechnovatsii", Russia

Microflora, supply of elements of nutrition of ordinary chernozem and productivity of spring wheat when applying the preparation «agrobionov»

Abstract: The article presents the results of research of the microflora, microbiological activity and nutritional content of ordinary chernozem when applying the preparation «Agrobionov». The aim of the preparation is to give agri-environmental assessment of doses of any preparation in biological properties and availability of nutrients and yield of spring wheat. The microbiological activity of the soil has been determined by the method of flax seed application. The following group of microorganisms has been studied: bacteria that utilize organic nitrogen compounds; microorganisms that consume mineral nitrogen; oligonitrophilic; bacteria, mobilizing mineral phosphates; calculatorcredit microorganisms; the nitrifying microorganisms; fungi. The authors have found that studied preparation increases the microbiological activity, the total number of microorganisms, including agronomic valuable microorganisms, the availability of easily hydrolyzed nitrogen in the soil, and the yield of spring wheat.

Keywords: ordinary chernozem, spring wheat, the preparation «Agrobionov», flora, humus, macroelements, productivity.

References

1. Pashkov S. V., Baibusinova S. B. Prirodno-agrogennaya obuslovlennost plodorodiya pochv Severnogo Kazakhstana [Natural and agrogenic conditionality of soil fertility in Northern Kazakhstan], Vestnik Zabaykalskogo gosudarstvennogo universiteta [Bulletin of the TRANS-Baikal state University]. -2017. - Volume. 23. №2, pp. 16-27].
2. Akhanov Zh. U. Analiticheskaya zapiska o tendentsii razvitiya pochvennoy nauki [Analytical note on trends in the development of soil science], Pochvovedenie i agrokimiya [Soil science and Agrochemistry]. -2008. - № 1. - pp. 6-13.
3. Saparov A. S., Eleshev R. E., Suleimenov B. U. Sovremennye problemy pochvenno-agronimicheskoy nauki Kazakhstana i puti ih resheniya [Modern problems of soil and agrochemical science of Kazakhstan and ways to solve them], Izvestiya Natsionalnoy Akademii nauk Respubliki Kazakhstan. Seriya agrarnykh nauk [Proceedings of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of agricultural Sciences]. 2016. № 1. - pp. 91-101.
4. Sarsenova A. A. Patent na izobreteniya – meliorativnyi preparat dlya povysheniya plodorodiya pochv [Patents for inventions reclamation, the drug to increase soil fertility]. RU 2494137 C2. -2013 №27.
5. Evtfeev Yu. V., Kazantsev G. M. Osnovy agronomii: uchebnoe posobie [Fundamentals of agronomy: textbook]. (Moscow: FORUM), 2013. – p.368. [in Russian].
6. Dospikhov B. A. Metodika polevogo opyta [Methodology of field experience]. / Moskva: Agrokhimizdat (Moscow: Agrokhimizdat), 1985.351. [in Russian].
7. Aristovskaya T. V. Vladimirskaia, M. M. Gollerbach T. V. et al. Bolshoy praktikum po mikrobiologii [Large workshop on Microbiology]. (Moscow: High school), 1962, 490. [in Russian].
8. Maksyukov N. A., Zenkova N. A. Biologicheskaya i mikrobiologicheskaya aktivnost chernozema yuzhnogo v zavisimosti ot pogodnykh usloviy, predshetvennikov i fona pitaniya [Biological and microbiological activity of southern Chernozem depending on weather conditions, precursors and nutrition background], Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta [News of the Orenburg state agrarian University]. 2017 №4(66). pp.206-209.
9. Zvyagintsev, D. G. Biologicheskaya aktivnost pochv i shkaly dlya otsenki nekotorykh ee pokazateley [Biological activity of soils and scales for evaluating some of its indicators], Pochvovedenie [Pedology]. Moscow-1978. № 6. - pp. 48-54.
10. Shchur A.V., Valko V. P., Vinogradov D. V. Vliyanie sposobov obrabotki pochvy i vneseniya udobreniy na chislennost i sostav mikroorganizmov [Influence of methods of tillage and fertilization on the number and composition of microorganisms], Vestnik Kurskoy gosudarstvennoy selskokhozyaystvennoy akademii [Bulletin of the Kursk state agricultural Academy]. -2015. №3. pp. 128–133.
11. Mukha V.D. O pokazatelyakh, otrazhayushikh intensivnost i napravlennost pochvennykh protsessov [Indicators that reflect the intensity and orientation of soil processes] in Sb. tr. Kharkovskogo s.-kh. instituta [Collection of works of the Kharkov Agricultural institute] Kharkov, 1980. V.273. pp.13–16.
12. Cerevelli, S., Petruzzelli, G., Perna, A., and Menicagli, R, "Soil Nitrogen and Fly Ash Utilization: a Laboratory Investigation," Agrochemica, - 1986. №30, pp. 27–33.
13. Wong, M.H., Wong, J.W.C. "Effects of Fly Ash on Soil Microbial Activity," Environ. Pollut., -1986. A(40), pp.127–144.
14. Pitchel, J.R. "Microbial Respiration in Fly Ash/Sewage Sludge Amended Soils," Environ. Pollut. -1990. № 63, pp. 225–237.
15. Arthur, M.F., Zwick, T.C, Tolle, D. A. and Vanvoris, P. "Effect of Fly Ash on Microbial CO2 Evolution from an Agricultural Soil," Water, Air & Soil Pollution. - 1984. № 22, pp. 209-216.

Авторлар туралы мәлімет:

Хусаинов А.Т. – биология ғылымдарының докторы, профессор, Ш.Уәлиханов атындағы Көкшетау университеті, Абай көш., 76, Көкшетау, Қазақстан.

Есенжолов Б.Х. – корреспонденция үшін автор, PhD докторант, Ш. Уәлиханов атындағы Көкшетау университетінің, Абай көш., 76, Көкшетау, Қазақстан.

Жаркинбеков Т.Н. – геология және минерология ғылымдарының кандидаты, Ш. Уәлиханов атындағы Көкшетау университеті, Абай көш., 76, Көкшетау, Қазақстан.

Сарсенова А.А. – ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, «ФӨБ «АгроБиоТехновации» ААҚ, Омбы, Ресей.

Данкина Г.Р. – аға оқытушы, Ш. Уәлиханов атындағы Көкшетау университеті, Абай көш., 76, Көкшетау, Қазақстан.

Khusainov A.T. – Doctor of Biology, professor, , Sh. Ualikhanov Kokshetau University, Str. Abay, 76, Kokshetau, Kazakhstan.

Yessenzholov B.Kh. – corresponding author, PhD doctoral student, Sh. Ualikhanov Kokshetau University, Str. Abay, 76, Kokshetau, Kazakhstan.

Zharkinbekov T.N. – Candidate of Geological and Mineralogical Sciences, Sh.Ualikhanov Kokshetau University, Str. Abay, 76, Kokshetau, Kazakhstan.

Sarsenova A.A. – Candidate of Agricultural Sciences, LLC Scientific-Production Association “AgroBioTechnovatsii”, Omsk, Russia.

Dankina G.R. – senior lecturer, Sh. Ualikhanov Kokshetau University, Str. Abay, 76, Kokshetau, Kazakhstan.

А.Т. Жұмабек^{1,2}
Е.М. Раманкулов^{1,2}
Ш.А. Манабаева^{1,2}

¹ ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы», Нұр-Сұлтан, Қазақстан
² Д.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан
(e-mail: ^{1,2} zh.aiganym91@gmail.com, ^{1,2} ramankulov@biocenter.kz, ^{1,2} manabayeva@biocenter.kz)

Тары өсімдігінің *Agrobacterium*-жанама трансформациясының параметрлерін оңтайландыру

Аңдатпа. Тары өсімдіктерін (*Panicum virgatum* L.) агробактерия көмегімен трансформациялаудың қарапайым және тиімді әдісі жасалып оңтайландырылды. Зерттеудің мақсаты Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee және Trailblazer сұрыптарындағы тары өсімдігінің *Agrobacterium* – жанама трансформация жағдайларын оңтайландыру болды. Генетикалық трансформация үшін тары өсімдігінің эмбриогендік каллустары қолданылды. Вируленттілік генінің индукторының, сурфактанттың әсерін зерттеу нәтижесінде, бактериялар суспензиясының оптикалық тығыздығы және ко-культивация уақыты анықталды, нәтижесінде қоректік ортада силвет-L77 бар ацетосирингон, бактериялық суспензияның оптикалық тығыздығы 0.6 және 8 күндік ко-культивациялау тарының эмбриогенді каллустарының *Agrobacterium* – жанама трансформациясы үшін оңтайлы екендігі анықталды. Алынған нәтижелер тары өсімдігінің трансгенді өсімдіктерін құрудың негізін қалайды.

Түйін сөздер: *Agrobacterium* – жанама трансформациясы, жасуша культурасы, тары өсімдігі, тікелей емес регенерация, эмбриогенді каллус.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-32-43>

Кіріспе. Дүние жүзі халқының өсу динамикасы, сонымен қатар, өндіріс қарқынының өсуіне әкелген экономикадағы процестердің индустриялануы энергия ресурстарын тұтынудың өсуіне әкелді. Қазіргі уақытта біздің планетамыздағы табиғи отынның қоры негізінен сарқылуда және оларды пайдалану экономикалық тұрғыдан да, экологиялық тұрғыдан да тиімсіз болып келеді. Сондықтан адамзат үшін, ең алдымен, өсімдіктерде жинақталатын қалпына келетін қуат көздерін, яғни биоэнергияны игеру қажет және мүмкін болады. Көптеген елдердегі экологиялық және экономикалық қауіпсіздіктің маңызды мәселелерінің бірі - қазба қалдықтарын тиімді пайдалану ғана емес, сонымен қатар, жаңа баламалы энергия көздерін іздеу. Соңғылардың ішінде органикалық шикізаттан және көпжылдық дәнді дақылдардың арнайы өсірілген биомассасынан алынатын жаңартылатын энергия көздеріне көп көңіл бөлінеді. Осыған байланысты биоотын өндірумен айналысатын ғалымдардың назары кез келген жерде өсетін, минималды суару мен тыңайтқышты қажет ететін, сыртқы әсерлерге төзімді және жақсы өнімділікпен сипатталатын дақылдарға аударылады.

Ғалымдар тары өсімдігіне көп көңіл бөледі. Бұл Солтүстік Америкадан шыққан С4 көпжылдық шөпті өсімдік. Тары биомассаның жоғары өнімділігі целлюлозалық биоотынды өндіруге арналған биоэнергетикалық дақыл ретінде қант қамысы мен жүгеріні алмастыра алды [1-5].

Тары өсімдігі екі таксономиялық әртүрлі экотиптерді қамтиды: ойпатты және таулы сұрыптар [1, 3]. Тары өсімдігі хромосомалары негізгі санға ие екендігі белгілі ($x = 9$). Төменгі сұрыптар тетраплоидты ($2n = 4x = 36$ хромосома) ретінде анықталады және сирек жағдайларда, октоплоидты ($2n = 8x = 72$ хромосома) түрінде кездеседі [6]. Тары өсімдігінің СЗ өсімдіктерінен және басқа шөптерден көптеген агротехникалық артықшылықтары бар, оның ішінде: зиянкестер мен ауруларға, топырақ пен ауа құрғақшылығына төзімділік [7]. Алайда биоотынға шикізат алу үшін тарының жоғарыда көрсетілген сипаттамалары жеткіліксіз.

Тары өсімдігінің зиянкестер мен ауруларға табиғи төзімділігі құрамында лигниннің жоғары болуына байланысты, бұл биомассаны биоотынға айналдырудағы энергия шығынын көбейтеді, экономикалық жағынан тиімсіз болып келеді. Гендік инженерияның заманауи әдістерін пайдалану арқылы ғана құрамында лигнин мөлшері аз трансгенді өсімдіктер алуға болады, осылайша бұл мәселе де шешіледі. Мысалы, өсімдіктердегі лигниннің сахарификациясын жақсарту үшін лигнин биосинтезінің жолын өзгерту қолданылады. Мысал ретінде гималай тегіндегі (*Populus ciliata* Wall.) лигнин мөлшерін төмендету агробактериалдық трансформация арқылы даршын спиртінің дегидрогеназа генін (CAD) посттранскрипция жолымен бәсеңдету арқылы жүргізіледі [8]. Manal M. Abdel-Rhman биобаллистикалық трансформация әдісін қолдана отырып, Caffeoyl-CoA реттеуді басу арқылы лигнин деңгейі төмен трансгенді жүгері өсімдіктерін алды [2]. Алайда, трансгенді өсімдіктерді алу үшін *Agrobacterium* – жанама трансформацияны қолдану генетикалық инженерияның таңдаулы әдісіне айналды, өйткені бұл әдіс реципиент геномына трансгеннің аз көшірмесін енгізуге бейім.

Бүгінгі күні трансгенді тары өсімдіктерінде лигнин құрамын төмендету үшін гендік инженерия әдістері қолданылады [9]. Мысал ретінде өсімдіктердің лигнификациясына жауап беретін PvKN1 генінің мақсатты түрдегі жоғары экспрессиясы [10]. Басқа зерттеулер көрсеткендей, эндогенді кофеин қышқылы О-метилтрансферазаның белсенділігін тежеу арқылы лигнин құрамының төмендеуіне және трансгенді тарыдан этанол шығымының жоғарылауына қол жеткізуге болады [11]. Yanrong Liu және оның командасы miR319 жоғары экспрессиясына қол жеткізді, бұл PvPCF5 генін басу арқылы тары биомассасының шығымы мен шикізат сапасын жақсартты. miR319 жоғары экспрессиясы трансгенді тары өсімдіктерінде лигнин құрамын төмендетіп, жабайы типтегі өсімдіктерге қарағанда ферментативті гидролиздің жоғары тиімділігін көрсетті [12].

Биоотын шикізаты ретінде тары өсімдіктерін жақсарту үшін модельдік өсімдік ретінде негізінен Alamo сұрыптары қолданылады. Бұрын *Agrobacterium* – жанама трансформацияны қолдана отырып, PvMYB4 генінің жоғары экспрессиясында құрамында лигнин мөлшері аз Alamo сұрыпының трансгенді тары өсімдіктері алынған. PvMYB4 монолигнолды гендері AC-I, AC-II және AC-III элементтерімен байланысады және бұл гендерді *in vivo*-да бәсеңдетеді. Авторлар лигниннің құрамын төмендетіп, жасуша қабырғасының қалдықтарынан қант шығару тиімділігін үш есе арттыруға қол жеткізді [13].

Біздің зерттеуіміздің мақсаты Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee және Trailblazer сұрыптарындағы тары өсімдіктерінің *Agrobacterium* – жанама трансформациясын оңтайландыру болды.

Биоэнергетикалық қуат көзі ретінде Қазақстанда лигнин мөлшері төмен тары өсімдігін өсіру мүмкіндігі туралы зерттеулердің маңызы зор. Орындалған жұмыс құрамында лигнині аз тарының трансгенді өсімдіктерін алуға арналған платформа құруға және целлюлоза-қағаз өнеркәсібінің технологиясын жасауға мүмкіндік береді.

Материалдар мен әдістер. *Өсімдік материалы.* Эмбриогендік каллус алу үшін бастапқы өсімдік материалы ретінде USDA, ARS, Plant Genetic Resources Conservation Unit (Гриффин, Джорджия) ұсынған тарының шетелдік сұрыптарының (*Panicum virgatum* L.) – Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee және Trailblazer тұқымдары пайдаланылды. *In vitro* жағдайына енгізу және каллус ұлпасын алу біз бұрын жасаған хаттамаға сәйкес жүзеге асырылды [14].

PvMYB4 трансформациялауға арналған ген және векторлық құрылым. 777 н.ж. тұратын *PvMYB4* генінің нуклеотидтер тізбегі NCBI мәліметтер базасынан алынды (GenBank: JF299187.1). *PvMYB4* генінің *de novo* нуклеотидтік тізбегін алу үшін олигонуклеотидті праймерлерді жобалау Vector NTI 10.3.0 компьютерлік бағдарламасының көмегімен жүзеге асырылды және оны Eurofins Genomics (Финляндия) синтездеді.

pSRB-UbiP бинарлы векторы *PvMYB4* генінің жоғары экспрессиясы үшін агробактерия көмегімен трансформациялауға пайдаланылды. pSRB-UbiP-ті доктор Огава Т. ұсынды (Institute of Agrobiological Sciences, NARO, Жапония). Вектор құрамында конституциялық NOS промоторының бақылауымен фосфонитрицинге төзімділік (*bar*) үшін таңдалатын маркер гені, сондай-ақ, жүгері полиубиквитин промоторы басқаратын Gateway-кассета және мақсатты гендердің жоғары экспрессиясы үшін интрон бар. *PvMYB4* генінің кодтау тізбегі Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix ферменттік қоспасын (Invitrogen, 11791020, Carlsbad, CA, USA) қолдана отырып, pSRB-UbiP экспрессивті бинарлы векторына рекомбинация мен pENTR™ / D-TOPO®, аралық векторына клондалды. Гендік-инженерлік құрылымдардың дұрыс құрастырылуын растау ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, USA) автоматты секвенаторында Big Dye 3.1 жиынтықтарын қолдану арқылы клондалған фрагменттердің ДНҚ-ның нуклеотидтік тізбегін анықтау арқылы жүзеге асырылды. Өсімдіктің трансформациясы үшін мақсатты генді кодтайтын бинарлы вектор LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* штаммының жасушаларына электропорация арқылы трансформацияланды.

Тары өсімдігінің трансформациясы бойынша эксперименттер агробактерия суспензиясымен каллусты инокуляциялау және ко-культивациялау әдісімен жүргізілді. Агробактериялардың түнгі культурасы pSRB-UbiP бинарлы векторы үшін 25 мг/л және 40 мг/л концентрациясында тиісті селективті антибиотиктермен толықтырылған 30 мл LB сұйық ортасында 28 °C температурада, тербеліс жиілігі 70 айн/мин инкубаторлық шейкерде, 12 сағат ішінде қажетті оптикалық тығыздыққа дейін өсті (O.T.=0.6-1). Бактерия жасушалары центрифугалау арқылы тұндырылды (4000 айн/мин, 10 мин), бактериялық жасушалардың тұнбасы 5 мл, 10 mM MgSO₄ ерітіндісінде шайылып, центрифугаланды (4000 айн/мин, 10 мин). Тұнба құрамында АВ ортасының тұздары бар (NH₄Cl-20 г/л, MgSO₄×7H₂O - 6 г/л, KCl - 3 г/л, CaCl₂×2H₂O - 0,264 г/л, FeSO₄×7H₂O - 50мг/л), 2 mM натрий фосфат буфері, 1% глюкоза және ацетосирингон 100 μM концентрациясында ресуспензияланды.

Трансформация үшін шетелдік тары сұрыптарының каллустары қолданылды. *In vitro* жағдайының барлық кезеңдерінде негізгі қоректік орта ретінде Мурасиг пен Скута (МС) және МСБ (МС тұзы және В5 дәрумендері бар) құрамы бойынша минералды негіздер пайдаланылды. Әр түрлі концентрациялардағы және комбинациялардағы ауксиндер мен цитокининдер қоректік ортаға культураға енгізу сатысында өсу мен дамуды реттегіш ретінде қосылды. Мальтоза 30 г/л көміртегі көзі ретінде пайдаланылды. *Agrobacterium* – жанама трансформация параметрлерін оңтайландыру үшін тары каллустары 10 мл агробактерия жасушалары суспензиясына, үш нұсқада ацетосирингон, сильвет-Л77 және ацетосирингон+сильвет-Л77 100 μM ацетосирингон және 0,01% сильвет-Л77 концентрациясында, қалыпты тербеліспен 28 °C температурада инкубаторлық шейкерде 10 минутқа қойылды. Содан кейін каллустарды ко-культивирлеу үшін ацетосирингон және қоректік ортаға сәйкес келетін гормондар мен дәрумендер бар МС қатты қоректік ортасына сүзгі қағазымен, 19±2 °C температурада 4-тен 8 күнге дейін инкубацияланды. Ко-культивация кезеңінен кейін каллустарды дистилденген суда 3 рет және антибиотик қосып 1 рет шайып, 3 қабатты сүзгі қағазда кептіріп, эксплант-трансформанттарды іріктеу, сатылы және қатаң селекция (РРТ) үшін 3 мг/л, 5 мг/л және 10 мг/л фосфинотрицин бар селективті ортаға ауыстырылды, агробактерияларды жою үшін антибиотик және 100 μM концентрациясында ацетосирингон қосылды.

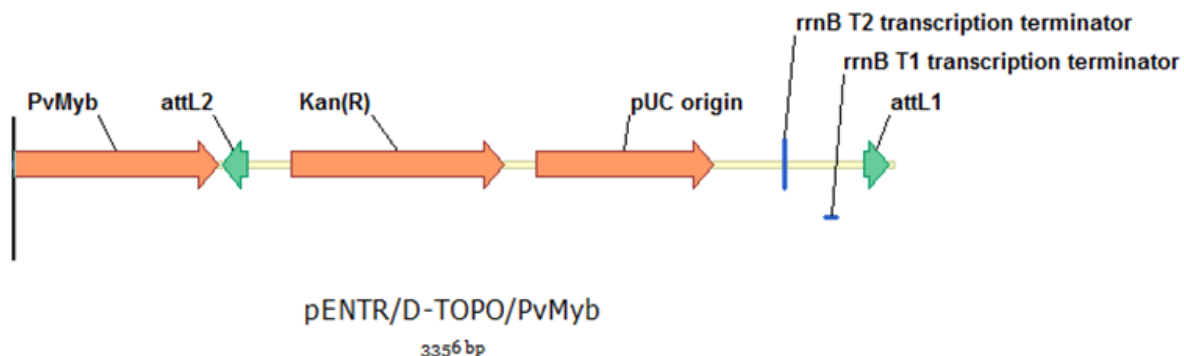
Агробактериалды трансформациядағы маңызды сәт - тиісті антибиотиктермен бактериялардың көбеюін тежеу. Бұл жұмыста *A.tumefaciens* жасушаларын жою үшін 250 мг/л және 500

мг/л концентрациясындағы цефотаксим, сондай-ақ 50 мг/л концентрациядағы меропенем қолданылды.

Трансформанттарды селективті іріктеу фосфинотрицин гербицидінің көмегімен *in vitro* жағдайында жүргізілді (фосфинотрицин ацетилтрансфераза, Fluka, 45520, St. Louis Mo, USA). 3 мг/л, 5 мг/л және 10 мг/л тиісті концентрациялар каллусты агробактериямен ко-культивациялағаннан кейін қоректік ортаға қосылды. Заттың әр концентрациясы үшін кем дегенде 20 эксплант (каллус ұлпалары) қолданылды, эксперименттер үш қайталауда жүргізілді. Селективті агенттің жасушалардың өміршеңдігіне әсер ету нәтижелері 4-8 аптадан кейін бағаланды.

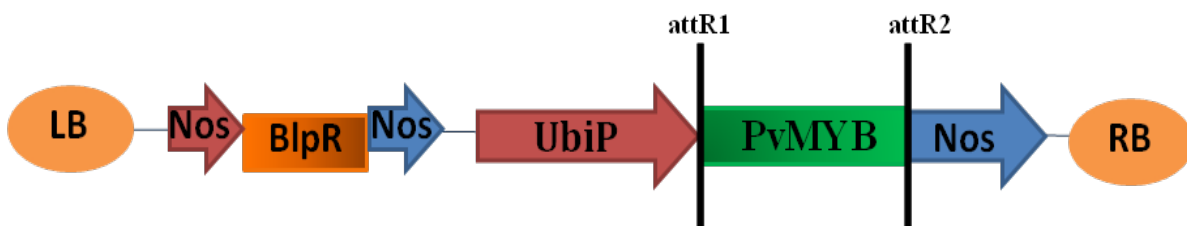
Нәтижелер мен талқылаулар. *Өсімдік материалы.* Тары өсімдігінен эмбриогендік каллус және одан регенерант өсімдіктерді алудың тиімді жүйесін жасалды, сондықтан трансформация жасау үшін эмбриогендік каллустар эксплант ретінде қолданылды [15].

Мақсатты ген, клондау және экспрессия векторын құру. Жұмыстың бірінші кезеңінде химиялық синтезделген гендерді клондау үшін ТОРО технологиясын қолданатын лигазсыз клондау әдісі қолданылды. Бұл әдіс рестрикциялық фермент пен ДНҚ-лигаза функцияларын орындайтын топоизомераза I ферментін қолдануға негізделген [16]. ТОРО сериясының векторлық плазмидасына кірістіруді клондау топоизомераза I таныған нақты сайттар арқылы жүзеге асырылады, праймерлердің көмегімен *pentr* / D-ТОРО векторын тану сайттары бар мақсатты фрагменттер жасалды. Клондау өндірушінің хаттамасы бойынша жүргізілді (сурет 1), мақсатты гендері бар плазмидтік ДНҚ секвенирлеу әдісімен нуклеотидтік реттілікті талдау және экспрессиялық векторға одан әрі клондау үшін XL-Blue *Escherichia coli* штаммын қолдана отырып жасалды.



Сурет 1 - attL1 және attL2 аймақтары арасында орналастырылған мақсатты PvMYB гені бар рекомбинантты pENTR / D-ТОРО + PvMYB құрылымы

pENTR / D-ТОРО векторынан мақсатты генді pSRB-UbiP экспрессия векторына клондау Gateway LR CLONASE II Enzyme Mix көмегімен жүргізілді (сурет 2).



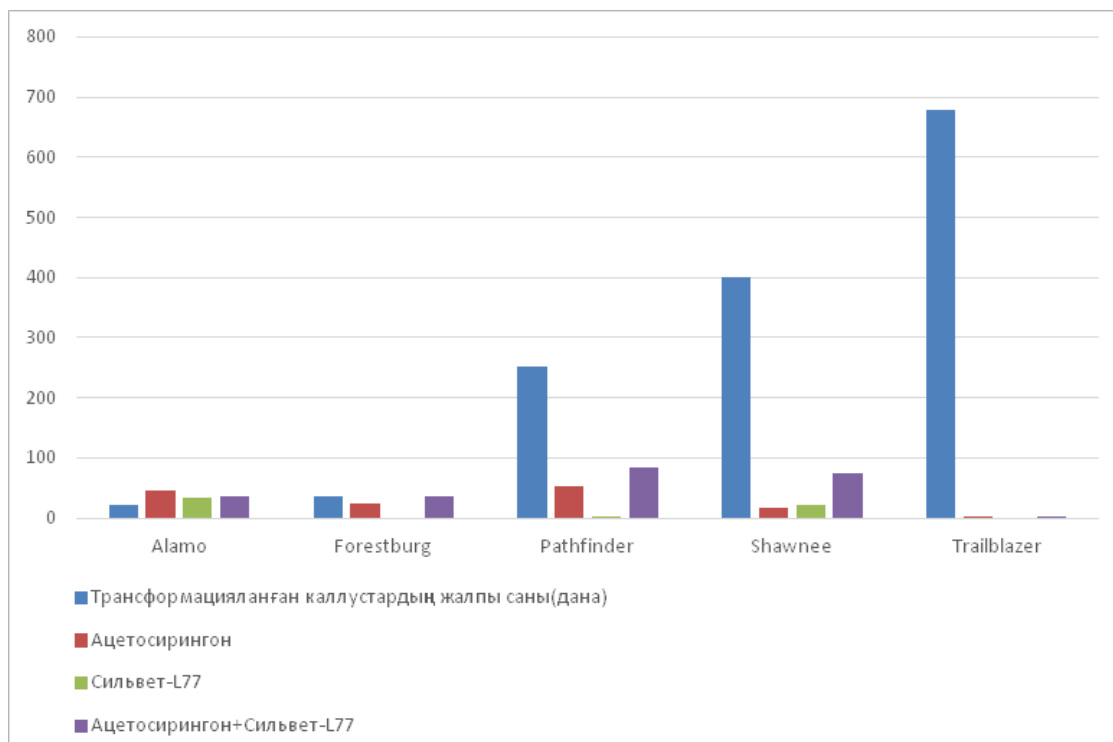
Сурет 2 - өсімдіктерде мақсатты геннің экспрессиясын қамтамасыз ететін конституциялық промотор убиквитин (UbiP) бақылауына қойылған, PvMYB кодтайтын мақсатты генді қамтитын рекомбинантты pSRB-PvMYB құрылымы

Agrobacterium – жанама трансформация. Генетикалық трансформацияның тиімділігі көптеген факторларға байланысты екені белгілі. *Agrobacterium*-жанама трансформация әдісін қолданған кезде трансформация жүргізілген температура, инокуляция ортасының құрамы, бактерия жасушаларының концентрациясы, вируленттілік генінің индукторларын қолдану, агробактерия штаммы, векторлық құрылым түрі және өсімдік генотипі үлкен маңызға ие [17]. Тары өсімдіктерінің шетелдік сұрыптарын *Agrobacterium*-жанама трансформациясы бойынша эксперименттер каллуска трансгенді өсімдіктердің гербицидке тұрақтылығын қамтамасыз ететін, убиквитин промоторы және фосфинотрицин ацетилтрансфераза генінің құрамында МҮВ4 гені бар рSRB бинарлы векторын тасымалдайтын *A.tumefaciens* LBA4404 штаммын жұқтыру арқылы жүргізілді.

Каллустың агробактериалды трансформациясы *A.tumefaciens* жасушалары әртүрлі оптикалық тығыздықпен, ко-культивация кезеңімен, вируленттілік гендерінің индукторы ретінде ацетосирингон және инфекцияның тиімділігін арттыру үшін ортаға сурфактант ретінде сивет-L77 қосу арқылы жүргізілді.

Ко-культивация кезеңінен кейін бактерияларды жою трансформацияның маңызды мәселесі болып табылады. Біздің жұмысымызда *A.tumefaciens* жасушаларына 250 мг/л және 500 мг/л концентрациясында цефотаксим, сондай-ақ, 50 мг/л концентрациясында меропенем қолданылды, соңғысы агробактерияға қатысты ең тиімді болды, сонымен қатар, каллус өміршеңдігін және морфогенетикалық потенциалын сақтап қалды, бұл аталған антибиотиктің тары өсімдігінің каллусогенезі мен регенерациясына ингибиторлық әсерінің жоқтығын көрсетеді. Алайда, цефотаксим бактерияларды жою үшін сәтті қолданылған жұмыстар да бар [18], [19].

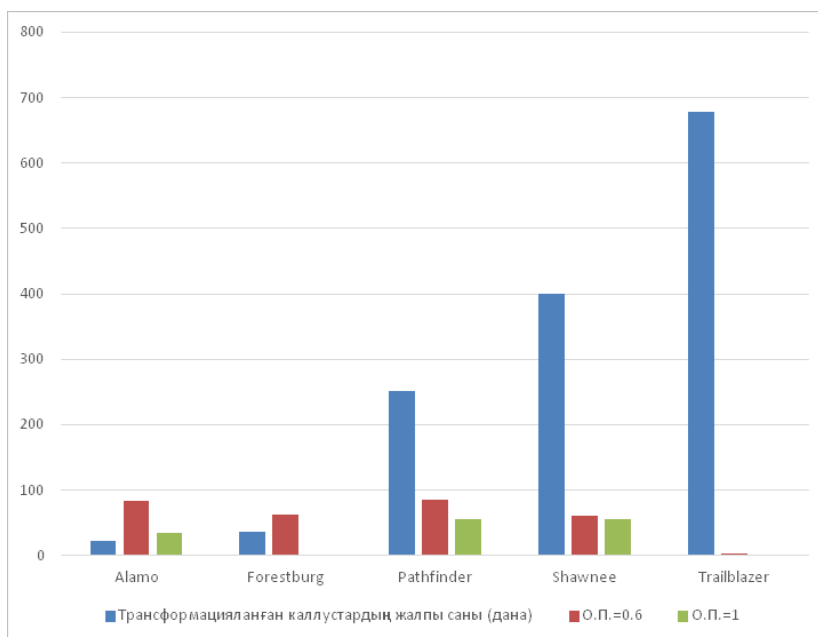
Сонымен қатар, трансформацияланған тары өсімдігінің каллус жасушаларының массасын селективті ортада өлшеу арқылы талданды. Өлшеу нәтижесінде 3 өлшемді өсу индексі Alamo – 2.502 мг, Forestburg – 2.204 мг, Pathfinder – 2.801 мг, Shawnee – 3.291 мг, Trailblazer – 5.2035 мг құрады.



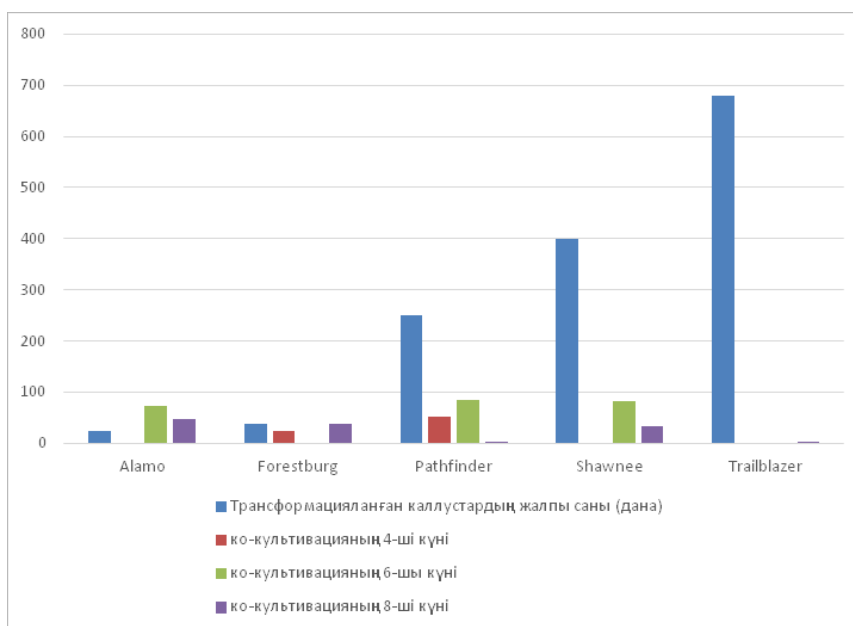
Сурет 3 - Вируленттілік гендерінің индукторының, сурфактанттың трансформацияланған каллустардың регенерация потенциалына әсері

Селективті іріктеу нәтижесінде морфогенез аймақтары болып табылатын, регенерант өсімдіктерін құрайтын құрылымдалған, күңгірт, хлорофилл жасыл аймақтары бар эмбрио-гендік каллустар алынды. Alamo сұрыпында 23 каллус орта есеппен бір каллуста 20 жасыл аймақ болды, Forestburg – 37 каллус, Pathfinder – 251 каллус, Trailblazer – 679 каллус, Shawnee – 400 каллус.

A.tumefaciens оптикалық тығыздығының әсері, ко-культивация уақыты, ацетосирингон мен сильвет-L77 меристематикалық жасыл аймақтары бар тарының каллус жасушаларын индукциялауға арналған эксперименттердің нәтижелері төмендегі суреттерде келтірілген (сурет 3,4,5).



Сурет 4 - Бактерия суспензиясының оптикалық тығыздығының трансформацияланған каллустардың регенерация потенциалына әсері



Сурет 5 - Ко-культивация уақытының трансформацияланған каллустардың регенерация потенциалына әсері

Жалпы, *Agrobacterium* – жанама трансформациясы шетелдік селекцияның тары сұрыптарының 1367 каллусын қолдану арқылы жүзеге асырылды. Вируленттілік генінің индукторының, сурфактанттың, бактериялар суспензиясының оптикалық тығыздығының және ко-культивация уақытының әсерін зерттеу ко-культивацияның 8-ші күні және бактерия суспензиясының $O.D. = 0.6$ болатын, сильвет-L77 + ацетосирингон қоспасы бар қоректік орта тары каллусының *Agrobacterium* – жанама трансформациясына оңтайлы екенін көрсетті.

Трансформация параметрлерін оңтайландыру үшін T-ДНҚ-ны жеткізу үшін *A.tumefaciens*-тің әртүрлі штамдары салыстырылады. Мысалы, Аламо сұрыпының соматикалық эмбриогендік каллусының *Agrobacterium*-жанама трансформация хаттамалары AGL1, C58, EHA105 және GV3101 штамдарын қолдана отырып оңтайландырылды, онда AGL1 гендерді жеткізу үшін ең жоғары тиімділігі көрсетілді [20, 21]. Басқа зерттеулерде EHA105 штаммы LBA4404 немесе GV3101s қарағанда ең тиімді екендігі айтылады [19]. Зерттеулеріміздің нәтижелері біз зерттеген сұрыптарды LBA4404 штаммымен трансформациялау кезінде жақсы нәтиже көрсетеді.

Тары сұрыптарының регенеративті потенциалы зерттелді (кесте 1).

Кесте 1.

Тарының шетелдік сұрыптарының регенерация потенциалын талдау

| Сұрып | Трансформацияланған каллустардың жалпы саны, % | Меристематикалық жасыл аймақтар, % | Некротизация, % |
|-------------|--|------------------------------------|-----------------|
| Alamo | 23 | 119 | 34 |
| Forestburg | 37 | 105 | 25 |
| Pathfinder | 251 | 867 | 44 |
| Shawnee | 400 | 106 | 41 |
| Trailblazer | 679 | 6 | 2 |

Атқарылған жұмыстардың қорытындысы бойынша Alamo сұрыпының трансгенді регенерантты өсімдіктері алынды (сурет 4), Pathfinder – 53 %, Shawnee – 23% сұрыптарында жақсы регенерациялық потенциал байқалды.



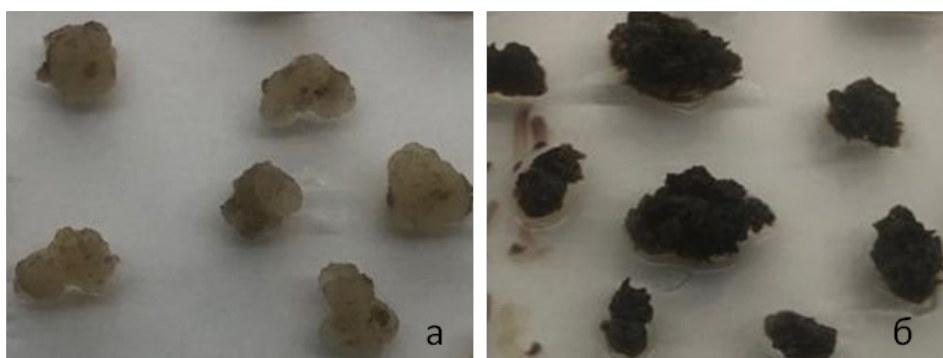
Сурет 6 - Аламо сұрыпының трансгенді регенерант өсімдіктері

Фосфинитрициннің әртүрлі концентрациясы бар селективті ортада трансформанттарды іріктеу. Трансформанттарды селективті іріктеу *in vitro* жағдайында фосфинотрицин гербицидінің

көмегімен жүргізілді (фосфинитрицин ацетилтрансфераза, Fluka, 45520, St. Louis Mo, USA). 3 мг/л, 5 мг/л және 10 мг/л тиісті концентрациялары каллусты агробактериямен ко-культивациялағаннан кейін қоректік ортаға қосылды.

Содан соң трансформацияланған тары каллус жасушаларының тіршілік қабілеті селективті агенті бар қоректік ортада талданды. Нәтижесінде, трансформация процесі және 10 мг/л PPT қатаң іріктеу кезінде селективті жағдайда трансгенді тары жасушаларын одан әрі ұзақ өсіру барлық дерлік сұрыптардағы жасушалардың морфогендік қабілетін едәуір төмендететіні анықталды, 5 мг/л концентрациядағы PPT трансформацияланған каллустардың өсуін тежеуге қабілетті.

Сондықтан трансгенді өсімдіктерді алу үшін селективті агенттің бастапқы концентрациясы 3 мг/л болатын сатылы таңдау оңтайлы болып саналады, бұл трансгенді жасушалардың тиімді іріктелуін қамтамасыз етеді және сонымен бірге, морфогенезге және одан әрі өсімдіктердің регенерациясына кедергі болмайды (сурет 5).



Сурет 7 - Селективті агенттің әртүрлі концентрациясындағы трансформацияланған тары каллустары: а) PPT селективті агенті қосылған тары каллустары - 3 мг/л; б) PPT селективті агенті қосылған тары каллустары - 10 мг/л

Біздің зерттеулерімізде селективті агент болған кезде ең үлкен некротизация Pathfinder және Shawnee сұрыптарының трансформацияланған жасушаларында байқалды, бұл көрсеткіштер сәйкесінше 44% және 41% құрады. Сонымен қатар, сұрыпталған жасушалардан жасыл нүктелердің ең көп популяциясын тудырған Pathfinder трансформацияланған жасушаларының морфогенетикалық потенциалын атап өткен жөн. Селекцияланған жасушалардың ең аз некротизациясы Trailblazer сұрыпынан алынды, ол 2% көрсетті.

Қаржыландыру. Бұл жұмыс Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің қаржылық қолдауымен 2018-2020 жылдарға арналған № AP05130387 ғылыми жобасы шеңберінде орындалды.

Әдебиеттер тізімі

1. Hoang N.V., Furtado A., Botha F.C., Simmons B.A. and Henry R.J. (2015) Potential for Genetic Improvement of Sugarcane as a Source of Biomass for Biofuels, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 3. P. 1-15.
2. Abdel-Rhman M.M. (2015) Genetic Modification of Lignin to Improve Biofuel Production from Maize Zea Mays L. Using Particle Bombardment, *International Conference on Biological, Civil and Environmental Engineering (BCEE-2015)*, P. 1-6.
3. Vogel K.P., Sarath G., Saathoff A.J. and Mitchell R.B. (2011) Switchgrass, *Royal Society of Chemistry Energy and Environment Series*. No. 3, Energy Crops Chap 17. P. 341-380.

4. Samson R.A. and Omielan J.A. (1992) Switchgrass: a potential biomass energy crop for ethanol production, The Thirteenth North American Prairie conference. P. 253-258.
5. Lemežienė N., Norkevičienė E., Liutikas Ž., Dabkevičienė G., Cecevičienė J. and Butkutė B. (2015) Switchgrass from North Dakota - an adaptable and promising energy crop for northern regions of Europe, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*. Vol. 2. P. 118-124.
6. Casler M.D. (2015) Switchgrass breeding, genetics, and genomics, A. Monti (ed.), *Switchgrass, Green Energy and Technology* Chap 2. P. 29-53.
7. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1993, Proceedings: First Biomass Conference of the Americas - Energy, Environment, Agriculture, and Industry, NREL/CP-200-5768.
8. Thakur A. K., Aggarwal G. and Srivastava G.K. (2012) Genetic Modification of Lignin Biosynthetic Pathway in *Populus ciliata* Wall. via *Agrobacterium*-Mediated Antisense CAD Gene Transfer for Quality Paper Production, *National Academy Science Letters*. Vol. 2. P. 79-84.
9. Chen F. and Dixon R.A. (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production, *National Biotechnology*. Vol. 7. P. 759-761.
10. Wuddineh W., Mazarei M., Zhang J., Turner G., Sykes R., Decker S.R., Davis M., Udvardi M. and Stewart N. (2016) Identification and overexpression of a Knotted1-like transcription factor in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for lignocellulosic feedstock improvement. *Frontiers in plant science*. Vol. 7. P. 1-15.
11. Fu C., Mielenz J.R., Xiao X., Ge Y., Hamilton C.Y., Rodriguez M. Jr., Chen F., Foston M., Ragauskas A., Bouton J., Dixon R.A., and Wang Z.Y. (2010) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 9. P. 3803-3808.
12. Liu Y., Yan J., Wang K., Li D., Han Y. and Zhang W. (2020) Heteroexpression of Osa-miR319b improved switchgrass biomass yield and feedstock quality by repression of PvPCF5, *Biotechnology for Biofuels*. Vol. 13. P. 1-13.
13. Shen H., He X., Poovaiah C. R., Wuddineh, W. A., Ma J., Mann D. G., Wang H., Jackson L., Tang Y., Stewart C. N., Jr, Chen F., and Dixon R. A. (2012) Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks, *The New phytologist*. Vol. 193. P. 121-136.
14. Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Zhumabek A.T., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2018) In vitro culture of foreign and local *Panicum virgatum* and *Panicum miliaceum* cultivars, *Eurasian journal of applied biotechnology*. Vol. 3. P. 28-34.
15. Zhumabek A.T., Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2020) Somatic embryogenesis and plant regeneration from upland switchgrass cultivars, *Research on Crops*. Vol. 21. P. 1-6.
16. pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into an entry vector for the Gateway® System, 2012, Catalog number K2400-20, Publication part number 25-0434, MAN0000245.
17. Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue culture, *Plant Physiology*. Vol. 15. P. 473-497.
18. Chen Q. and Song G. Q. (2019) Protocol for *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Transgenic Plant Production of Switchgrass, *Methods in molecular biology*. P. 105-115.
19. Song G., Hancock J.F., and Walworth A., 2012, Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass cultivars, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 108. P. 445-453.
20. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T. M., Ye X. and Armstrong C.L. (2004) Invited review: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Vol. 40. P. 31-45.
21. Chen X., Equi R., Baxter H., Berk K., Han J., Agarwal S. and Zale J. (2010) A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings, *Biotechnology Biofuels*. Vol. 3. P. 1-10.

А.Т. Жұмабек^{1,2}, Е.М. Раманкулов^{1,2}, Ш.А. Манабаева^{1,2}

¹ РГП "Национальный центр биотехнологии" КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

² Евразийский Национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

Оптимизация параметров *Agrobacterium*-опосредованной трансформации проса прутьевидного

Аннотация. Разработан и оптимизирован простой и эффективный метод агробактериальной трансформации растений проса прутьевидного (*Panicum virgatum* L.). Целью исследования являлось оптимизация условий *Agrobacterium*-опосредованной трансформации проса прутьевидного у сортов Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee и Trailblazer. Для генетической трансформации использованы эмбриогенные каллусы проса прутьевидного. В результате изучения эффекта индуктора гена вирулентности, сурфактанта, оптической плотности суспензии бактерий и времени ко-культивации выявлено, что наличие ацетосирингона с силвет-L77 в среде, суспензии бактерий при оптической плотности 0.6 и 8 дневной ко-культивации с бактерией является оптимальными для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации эмбриогенных каллусов проса. Полученные результаты могут служить основой для создания трансгенных растений проса прутьевидного.

Ключевые слова: *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, культура клеток и тканей, непрямая регенерация, просо прутьевидное, эмбриогенный каллус

А.Т. Zhumabek^{1,2}, Y.M. Ramankulov^{1,2}, S.A. Manabayeva^{1,2}

¹ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan

² L.N.Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Optimization of the parameters of *Agrobacterium*-mediated transformation of bar-shaped millet

Abstract. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method has been developed and optimized for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). The aim of this study is to optimize the conditions for agrobacterial transformation of upland switchgrass cultivars Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee, and Trailblazer. For genetic transformation, the authors have used embryogenic calli of switchgrass cultivars. As a result of the study the effect of the virulence gene inducer, surfactant, optical density of bacterial suspension and co-cultivation time, it has been revealed that the presence of acetosyringone with silwet-L77 in the medium, bacterial suspension at an optical density of 0.6 and 8 days of co-cultivation with bacteria is optimal for *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli of switchgrass. The results obtained can serve as a basis for the creation of transgenic plants of switchgrass.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, tissue culture, *Panicum virgatum*, indirect regeneration, embryogenic calli

References

1. Hoang N.V., Furtado A., Botha F.C., Simmons B.A. and Henry R.J. (2015) Potential for Genetic Improvement of Sugarcane as a Source of Biomass for Biofuels, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 3. P. 1-15.
2. Abdel-Rhman M.M. (2015) Genetic Modification of Lignin to Improve Biofuel Production from Maize Zea Mays L. Using Particle Bombardment, *International Conference on Biological, Civil and Environmental Engineering (BCEE-2015)*, P. 1-6.
3. Vogel K.P., Sarath G., Saathoff A.J. and Mitchell R.B. (2011) Switchgrass, *Royal Society of Chemistry Energy and Environment Series*. No. 3, Energy Crops Chap 17. P. 341-380.

4. Samson R.A. and Omielan J.A. (1992) Switchgrass: a potential biomass energy crop for ethanol production, The Thirteenth North American Prairie conference. P. 253-258.
5. Lemežienė N., Norkevičienė E., Liatukas Ž., Dabkevičienė G., Cecevičienė J. and Butkutė B. (2015) Switchgrass from North Dakota - an adaptable and promising energy crop for northern regions of Europe, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*. Vol. 2. P. 118-124.
6. Casler M.D. (2015) Switchgrass breeding, genetics, and genomics, A. Monti (ed.), *Switchgrass, Green Energy and Technology* Chap 2. P. 29-53.
7. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1993, *Proceedings: First Biomass Conference of the Americas - Energy, Environment, Agriculture, and Industry*, NREL/CP-200-5768.
8. Thakur A. K., Aggarwal G. and Srivastava G.K. (2012) Genetic Modification of Lignin Biosynthetic Pathway in *Populus ciliata* Wall. via *Agrobacterium*-Mediated Antisense CAD Gene Transfer for Quality Paper Production, *National Academy Science Letters*. Vol. 2. P. 79-84.
9. Chen F. and Dixon R.A. (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production, *National Biotechnology*. Vol. 7. P. 759-761.
10. Wuddineh W., Mazarei M., Zhang J., Turner G., Sykes R., Decker S.R., Davis M., Udvardi M. and Stewart N. (2016) Identification and overexpression of a Knotted1-like transcription factor in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for lignocellulosic feedstock improvement. *Frontiers in plant science*. Vol. 7. P. 1-15.
11. Fu C., Mielenz J.R., Xiao X., Ge Y., Hamilton C.Y., Rodriguez M. Jr., Chen F., Foston M., Ragauskas A., Bouton J., Dixon R.A., and Wang Z.Y. (2010) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 9. P. 3803-3808.
12. Liu Y., Yan J., Wang K., Li D., Han Y. and Zhang W. (2020) Heteroexpression of Osa-miR319b improved switchgrass biomass yield and feedstock quality by repression of PvPCF5, *Biotechnology for Biofuels*. Vol. 13. P. 1-13.
13. Shen H., He X., Poovaiah C. R., Wuddineh, W. A., Ma J., Mann D. G., Wang H., Jackson L., Tang Y., Stewart C. N., Jr, Chen F., and Dixon R. A. (2012) Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks, *The New Phytologist*. Vol. 193. P. 121-136.
14. Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Zhumabek A.T., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2018) In vitro culture of foreign and local *Panicum virgatum* and *Panicum miliaceum* cultivars, *Eurasian journal of applied biotechnology*. Vol. 3. P. 28-34.
15. Zhumabek A.T., Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2020) Somatic embryogenesis and plant regeneration from upland switchgrass cultivars, *Research on Crops*. Vol. 21. P. 1-6.
16. pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into an entry vector for the Gateway® System, 2012, Catalog number K2400-20, Publication part number 25-0434, MAN0000245.
17. Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue culture, *Plant Physiology*. Vol. 15. P. 473-497.
18. Chen Q. and Song G. Q. (2019) Protocol for *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Transgenic Plant Production of Switchgrass, *Methods in molecular biology*. P. 105-115.
19. Song G., Hancock J.F., and Walworth A., 2012, Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass cultivars, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 108. P. 445-453.
20. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T. M., Ye X. and Armstrong C.L. (2004) Invited review: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. Vol. 40. P. 31-45.
21. Chen X., Equi R., Baxter H., Berk K., Han J., Agarwal S. and Zale J. (2010) A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings, *Biotechnology Biofuels*. Vol. 3. P. 1-10.

Авторлар туралы мәліметтер:

Жұмабек А.Т. – корреспондентия үшін автор, ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» Өсімдіктердің генетикалық инженерия зертханасының ғылыми қызметкері, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті жалпы биология және геномика кафедрасы «6D060700 Биология» мамандығының 3 курс докторанты, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Раманкулов Е.М. – PhD, ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» Бас директоры, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті жалпы биология және геномика кафедрасының профессоры, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Манабаева Ш.А. – биология ғылымдарының кандидаты, ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» Өсімдіктердің генетикалық инженерия зертханасының меңгерушісі, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті жалпы биология және геномика кафедрасының доценті. Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Zhumabek A.T. – *corresponding author*, Researcher of Plants Genetic Engineering Laboratory, National Center for Biotechnology, The 3rd Ph.D. student in Biology at L.N.Gumilyov Eurasian National University.

Ramankulov E.M. – Ph.D, Professor, General Director of the National Center for Biotechnology, Professor of General Biology and Genomics Department at L.N.Gumilyov Eurasian National University.

Manabayeva S.A. – Candidate of Biological Sciences, Head of the Plants Genetic Engineering Laboratory, National Center for Biotechnology, Associate Professor of General Biology and Genomics Department at L.N.Gumilyov Eurasian National University.

С.С. Беккужина, А.О. Рахимжанова
А.К. Талканбаева, Ш. А. Манабаева

Национальный центр биотехнологии КН МОН РК, Казахстан, г. Нур-Султан,
(E-mail: manabayeva@biocenter.kz)

Индукция каллусогенеза в культуре изолированных семян *Cistanche Deserticola*

Аннотация. Цистанхе (*C. deserticola*)-относится к числу ценных технических растений флоры Казахстана. Ценность цистанхе обусловлена высоким содержанием в столонах различных полисахаридов, иридоидов, и других биологически активных веществ, которые в восточных странах широко используется, как исходное сырье для производства множества фармакологически активных соединений широкого спектра действия: повышения тонуса, потенции, антиоксидантной активности. Однако, к настоящему времени природные запасы цистанхе существенно истощены, что делает актуальным как проблему сохранения этого вида, так и поиск источников для получения биологически активных веществ. Известно, что культура клеток высших растений является альтернативным способом получения биомассы редких растений. В данной работе приведены результаты работ по оптимизации методов получения каллусных культур клеток из семян *C. deserticola*. Изучены ростовые характеристики, отобранных линий каллусных культур клеток цистанхе. Отмечены их отличительные особенности по гетерогенности и цвету, что служит доказательством синтеза различных вторичных метаболитов. Установлено, что предлагаемая методика получения каллусных культур клеток цистанхе достаточно эффективна.

Ключевые слова: цистанхе, *Cistanche deserticola*, гетерогенность культуры каллусов, культура клеток, фитогормоны.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-44-52>

*Работа выполнена при финансовой поддержке МОН РК (BR05236334 - Создание суспензионной культуры цистанхе пустынной (*Cistanche deserticola*) с целью получения веществ с биологической активностью»)*

Введение. Флора Казахстана является ценным и уникальным источником биологически активных веществ (БАВ), из 6000 видов растений 667 эндемики. Цистанхе солончаковая *Cistanche salsa*, произрастающая в пустыне содержит в 5 раз больше БАВ, чем женьшень [1, 2], и заслуженно называется казахстанским женьшенем или женьшень пустыни (Yong Jiang, Peng-Fei Tu, 2009) [3]. Ценность цистанхе обусловлена высоким содержанием в столонах различных полисахаридов, иридоидов, и других биологически активных веществ, которые в развитых странах широко используется как исходное сырье для производства множества фармакологически активных соединений широкого спектра действия т.д. [4].

В 2000 году цистанхе включили в Красную книгу Китая, с 2005 года заготовка цистанхе без контроля запрещена в России. Однако, без систематизации заготовок и научного подхода запасы растения со временем могут быть исчерпаны, как это произошло в Китае.

В Казахстане, ботаническая характеристика, а также ценные биохимические свойства цистанхе описаны в работах Каржаубековой Ж.Ж. с соавторами [5], лекарственное описание детально изучается в работах Сарсембаева К.Н., Г.Т. Барамысовой [6, 7] начались работы по разработке технологий получения гранул из экстракта цистанхе [1]. Фармакологические исследования детализируют, как фармацевтические ценные свойства, так и биохимические *Cistanche Deserticola* [8, 9].

В связи с ростом спроса мирового рынка на биологически активные вещества, получение ценных веществ вторичного синтеза методами культуры клеток и тканей является одним из альтернативных способов. Преимущества использования культуры клеток и тканей растений хорошо описаны еще в 1990-х годах [10, 11].

В настоящее время акцентируется внимание на возможности коммерческого успеха, и на должном уровне ведутся работы в мировой практике. В обзоре А.М. Носова [12] детально обсуждается, как преимущества, так и возможности коммерциализации получения веществ вторичного синтеза в культуре *in vitro*. Например, гарантированное получение растительной биомассы любого вида растений с заданными характеристиками независимо от сезона, климатических и погодных условий; высокие скорости получения биомассы, отсутствие в биомассе пестицидов, гербицидов, радиоактивных соединений и других поллютантов.

Однако рост и прирост клеток к культуре *in vitro* имеет и недостатки, например, недостаточный объем целевого продукта для эффективного производства, чувствительность клеток к механическим воздействиям и т.д., но есть успешные работы по получению фенольных соединений, алкалоидов, изопреноидов. Достигнуты успехи по конечному выходу биомассы в культуре *in vitro*, например, из стеблевых эксплантов цистанхе 9,29 г сухого веса на литр суспензионной культуры, где содержание эхинацеиды 12,14%, и астеозиды 2,17%. При добавлении метилового жасмоната 200 мкм отмечено, что выход продукта в 2 раза выше, чем у дикого растения. Показано, что на повышение эффективности выхода PhGs положительно влияет и гидролизат казеина [13].

Синтез вторичных метаболитов в культуральных условиях происходит в гетерогенной клеточной системе. В одних случаях синтез веществ вторичного обмена больше чем в интактных растениях, но бывает и так, когда необходимые метаболиты не синтезируются, а также могут синтезироваться и *de novo* вещества. Информации и ответы на подобные и многие другие вопросы на сегодня являются скудными. Несмотря на известные факты о преимуществах суспензионной культуры для получения активных соединений, есть и трудности методологического характера. Необходимы и теоретические разработки для отдельно взятых специфических сорных растений с богатым синтезом вторичных соединений, как цистанхе.

Таким образом, индукция каллусных тканей и определение особенностей их роста и развития, а также отбор по консистенции и цвету гетерогенной клеточной массы имеет первостепенное значение. Необходимо проводить подбор оптимальных условий для наработки клеточной массы, отобранных линий, в достаточном объеме для дальнейшей наработки клеточной суспензии.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использовали вид *C. deserticola*, собранный с долины «Бетпак дала» Южно-Казахстанской области. На рисунке 1 представлены стебель-столоны, коробочки с семенами и коробочки с семенами в разрезе.

Для инициации каллусных культур в качестве экспланта использовали семена *C. deserticola*. Стерилизацию семян провели с применением стерилизующих агентов: 70% этанол, 10% раствор гипохлорита натрия и твина-20.

Для индукции каллусообразования использовали питательные среды отличающихся по составу минеральной основы и концентрации регуляторов роста (таблица 1)[8].

Культивирование каллусов проводили в темноте при 25-27°C и 70% относительной влажности воздуха.

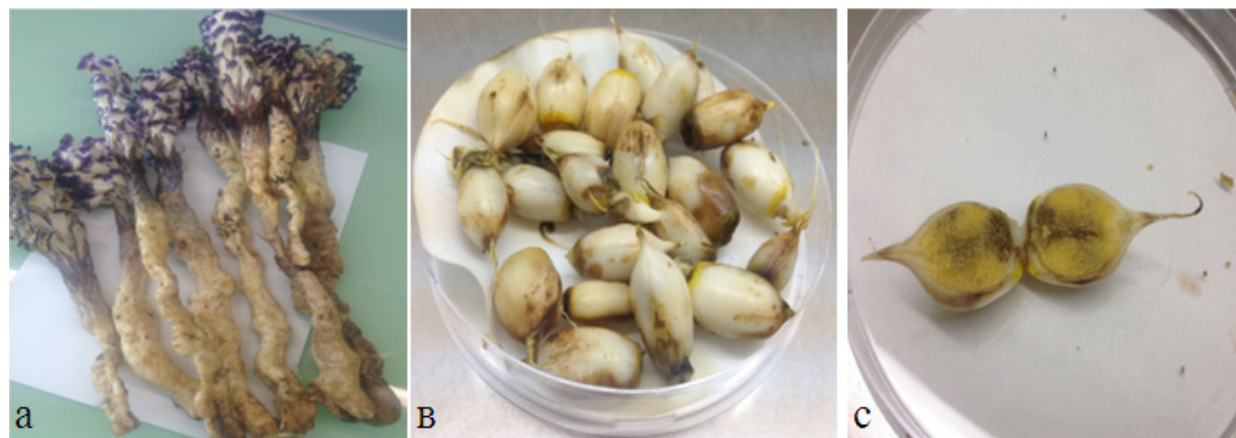


Рис. 1 *C. deserticola*: а - стебель -столоны; в -коробочки с семенами; г-коробочка с семенами в разрезе.

Таблица 1. Состав питательных сред для инициации каллусообразования

| Вещество | Количество на 1 л среды | |
|----------------------|-------------------------|-------------|
| | Среда 1 | Среда 2 |
| Минеральная основа | МС | Гамборга В5 |
| Сахароза | 20 г | 20 г |
| Гидролизат казеина | 0,8 мг | 0,8 мг |
| Витамины Гамборга В5 | 1,0 мг | 1,0 мг |
| 2,4-Д | 1,0 мг | 1,0 мг |
| БАП | 2,0 мг | 0,1 мг |
| ГКЗ | 10,0 мг | 10,0 мг |
| Аскорбиновая кислота | 1,0 мг | 1,0 мг |

Результаты исследований. Культуральные условия являются важными и, возможно, решающим моментом успешного проведения экспериментов для индуцирования каллусных тканей, продуцирующих ценные метаболиты

На первых этапах исследований проводили оптимизацию условий культивирования, модифицируя питательные среды.

При индуцировании каллусных тканей наблюдали сильный выброс фенольных соединений, который подавляет пролиферацию клеток. Для ингибирования выброса фенольных соединений в питательные среды добавляли антиоксиданты - поливинилпирролидон, нитрат серебра, активированный уголь, аскорбиновая кислота. Полное ингибирование фенольных выбросов наблюдали на питательной среде 2 с нитратом серебра в концентрации 5 мг/л и аскорбиновой кислотой в концентрации 1 мг/л, где так же отмечена активная пролиферация каллусов цистанхе пустынной.

На данном этапе исследований каллусы условно разделили на 3 линии: I линия - светлые каллусы, II линия - темно-серые (промежуточные) и III линия - черные каллусные ткани. Проллиферирующие каллусные ткани к концу каждого пассажа характеризовались изменением цвета, например, каллусы белого цвета темнели или наоборот из темно-коричневых и черных каллусов наблюдали индукцию светлых каллусов. Причем пролиферацию темных каллусов из светлых наблюдали на двух вариантах сред от 40% до 57%, чем индукция светлых тканей из темных каллусов (таблица 2).

Таблица 2 – Каллусообразующая способность, отобранных линий цистанхе

| Среды | Коли-во каллусов, всего (шт) | I линия | | II линия | | III линия | |
|---------|------------------------------|---------|-------------------|-------------|--------------------|------------|--------------------|
| | | Светлые | % индукция темных | Темно-серые | % индукция светлых | черные | % индукция светлых |
| Среда 1 | 182 | 58 | 40 | 54 | 8 | 70 | 29 |
| Среда 2 | 461 | 106 | 57 | 156 | 12 | 199 | 14 |
| CV | | 82±0,29 | 48,5±0,18 | 105±0,49 | 10±0,20 | 134,5±0,48 | 21,5±0,35 |

Отбор каллусных тканей цистанхе по цвету является важным моментом при синтезе вторичных метаболитов, так как разные популяции клеток могут метаболизировать различные вещества. Дубильные вещества, синтезируемые цистанхе, могут быть ингибиторами целевого продукта метаболизма культуры цистанхе. Поэтому, в последующих экспериментах провели отбор каллусных линий по цвету от черного до светлых каллусных тканей, как показано на рисунке 2.

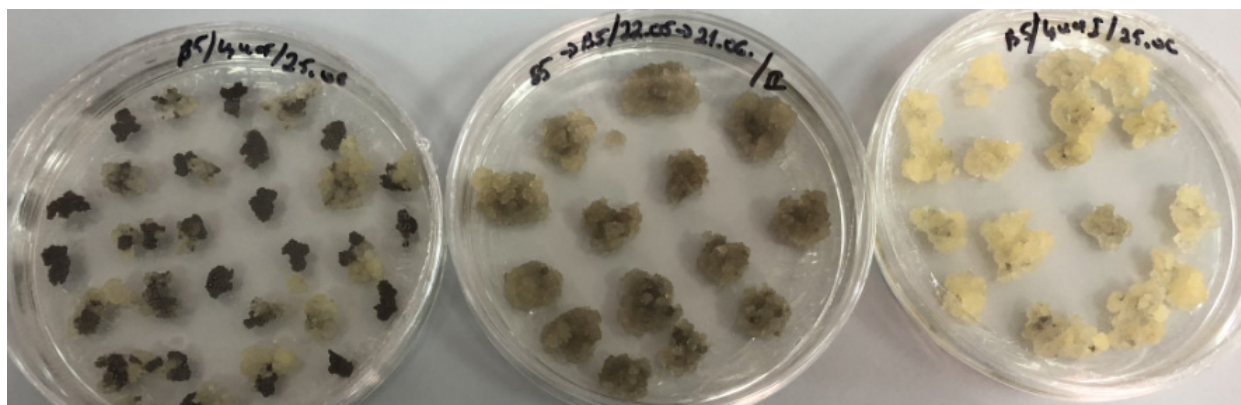


Рис. 2. Видоизменения цвета каллусной ткани цистанхе на питательной среде B5

Традиционно для большинства растений каллусы имеют желтые, белые, светло-коричневые цвета. В культуре цистанхе темные каллусные линии составляют наибольшее количество каллусной массы, например, 29% на среде 1 и 14% на среде 2, а промежуточные каллусные линии образуются в малом количестве на обоих вариантах сред. Большинство темных каллусных линий также, как и светлые были жизнеспособными, т.е. доля жизнеспособных клеток составила 70% и более.

При пассировании каллусной ткани из среды 2 на питательную среду 1, содержащей: ГКЗ -10,0 мг/л, 2,4Д-1,0 мг/л, БАП-2,0 мг/л, образовались темно-серые каллусные ткани, а затем вновь получена популяция, с преобладанием светло-желтых клеток. На рисунке 3 можно наблюдать интенсивное изменение и образование светло-желтых клеток.

Светло-желтая популяция клеток на среде MS более плотная, чем клеточные массы, полученные на среде B5. Все результаты данного эксперимента по цвету и структуре клеточных популяций являются важными для определения, в каких клетках происходит интенсивный синтез продуктов вторичного обмена.

Значительный прирост каллусной ткани отмечен для I-ой линии, клеточные популяции III-ей линии не делились активно, но при этом клетки не теряли жизнеспособность в длительной беспересадочной культуре. Разработка технологий длительного культивирования является важным моментом при культивировании лекарственных растений, так как дает возможность

депонирования каллусных тканей с последующей пролиферацией клеток, синтезирующих ценные метаболиты.

Кроме того, данные клеточные массы индуцируют светлые каллусные ткани, которые при пассировании на новую питательную среду с 9 на 10 пассаж на среде с добавлением 2,4-Д дали прирост в 4-5 раз больше, чем на ранних пассажах (рисунок 4).

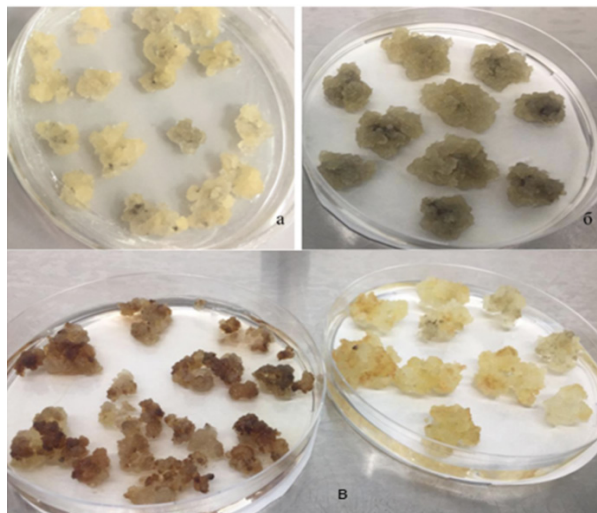


Рис. 3 Изменение по структуре и по цвету каллусной массы цистанхе: а и б- на среде 1; в - на среде.

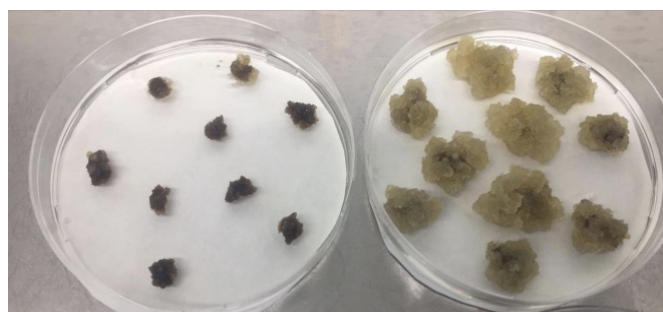


Рис. 4 Нарработка биомассы на среде 2 с 2,4-D в концентрации 1,0 мг/л +ГКЗ 10,0 мг/л+БАП 0,5 мг/л.

Измерения прироста массы каллусов проводили в течении 30 дней культивирования на питательных средах 1 и 2. При визуальном анализе каллусных тканей в течение цикла выращивания отмечается, что каллус цистанхе на питательной среде 1 плотно структурированные, твердые, клетки округлые, овальные, обособленные друг от друга, а каллусная ткань, выращиваемая, на питательной среде 2 отличалась своей рыхлостью. Окраска каллусных тканей варьировалась от светлого до темно-коричневого. Измерения проводились взвешиванием массы сырого каллуса в первый день пассажа, на 14 день и на 30 день пассирования (рисунок 5,6).

Таким образом, результаты, полученные в данной серии экспериментов свидетельствуют о том, что в связи с неординарностью синтеза различных метаболитов в интактных растениях цистанхе, так и в культуре *in vitro* индуцируются гетерогенные клеточные массы при визуальной оценке. Окончательные результаты, какие популяции клеток будут отличаться по содержанию ценных веществ вторичного синтеза будут определены в процессе дальнейших биохимических анализов.

Для дальнейшей успешной работы в лаборатории разрабатывается технологический процесс получения суспензионной культуры для цистанхе пустынной и определение спектра био-

логически активных веществ, например, фенилпропаноидов, обладающих иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами.

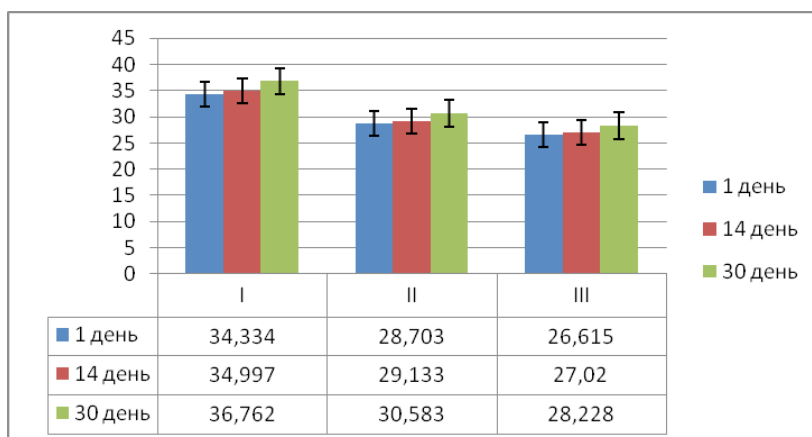


Рис. 5 Измерение прироста каллусов на среде 1.

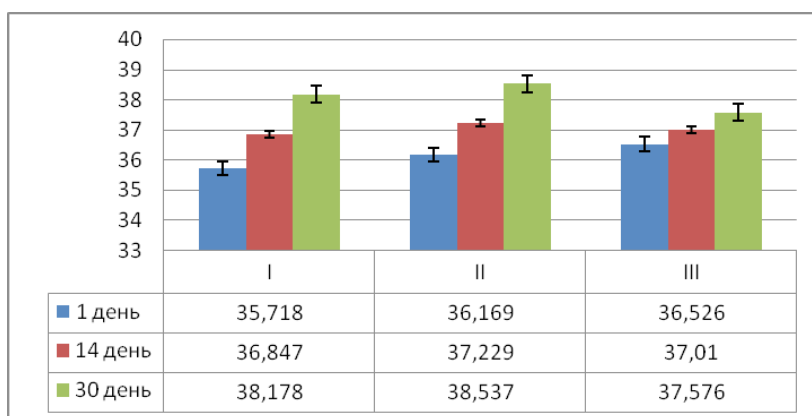


Рис. 6 Измерение прироста каллусов на среде 2.

Список литературы

- 1 Датхаев У.М., Капсалямова Э.Н., Буханбаева М.Д. Цистанхе солончаковый как перспективный источник при получении гранул // Вестник КазНМУ. – 2014. – №5. – С.52-53.
- 2 Каржаубекова Ж.Ж., Гемеджиева Н.Г. Фитохимическое исследование растений рода цистанхе (*Cistanche hoffmngg. Etlink*) // Вестник КазНУ. – 2013. – №3. – С.388-390.
- 3 Jiang Y., Tu P.F. Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species // Journal of Chromatography A. – 2009. – С.1970-197.
- 4 Kobayashi H., Karasawa H., Miyase T., Fukushima S. Studies on the constituents of *Cistanche* Herba. II: Isolation and structures of new iridoids, cistanin and cistachlorin // Chemical and pharmaceutical bulletin. – 1984, – Vol.32, №5. – P.1729-1734.
- 5 Каржаубекова Ж.Ж., Гемеджиева Н.Г., Набиева Ж.С. К фитохимическим исследованиям *Cistanche salsa* (OROBANCHACEAE) // Химия растительного сырья. – 2016. – №4. – С.123-130.
- 6 Сарсембаев К.Н., Барамысова Г.Т., Джиембаева Б.Ж., Кожамжарова Л.С., Исабаев С.О., Колосова Н.Г., Иманбаева А.А. Морфологические биохимические особенности казахстанских популяций цистанхе сомнительной // Химический журнал Казахстана. – 2009. – №1. – С.5-10.

7 Барамысова Г.Т., Джиембаева Б.Ж., Кожамжарова Л.С., Исабаев С.О., Колосова Н.Г., Сарсембаев К.Н. Констируирование наночистиц на основе столонов цистанхе сомнительной // Вестник Алматинского института энергетики и связи. – Алматы, – 2010, №1. – С.87-90.

8 Wang T, Xie X.V., Ma Y.C. *Cistanche deserticola* «Desert Ginseng» // A Review the American Journal of Chinese Medicine. – 2012. – Vol.406, №6. – P.1123-1141.

9 Zhang A., Li Q., Yang X., Yang Y. Immunostimulatory activity of water-extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* as a plant adjuvant in vitro and in vivo // PLoS ONE – 2018. – Vol.13. – P.1086-1105.

10 Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе // Учебное пособие. – М.: – 1999. – 158 с.

11 Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / Биология культивируемых клеток и биотехнология растений // Ред. Р.Г. Бутенко. – М.: Наука. – 1991. – С.5-20.

12 Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. – 2010. – №5. – С.7-24.

13 Liu X., Yan Y., Liu Y., Mo T., Song X., Wang Y., Chen Q., Zhao Y., Shi S, Tu P. Cell culture establishment and regulation of two phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension culture of desert plant *Cistanche tubulosa* // Plant cell, tissue and organ culture. – 2018. – Vol.134. – P.107-118.

С.С. Беккужина, А.О. Рахимжанова, А.К. Талканбаева, Ш.А. Манабаева

ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» ШЖҚ РМК, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

***Cistanche Deserticola* оқшауланған тұқымдарының мәдениетінде каллусогенез индукциясы**

Аңдатпа: Цистанхе (*C. deserticola*) - Қазақстан флорасының құнды техникалық өсімдіктерінің қатарына жатады. Цистанхенің құндылығы әр түрлі полисахаридтердің, иридоидтардың және басқа да биологиялық белсенді заттардың столондарында жоғары болуына байланысты, олар Шығыс елдерінде кең спектрлі фармакологиялық белсенді қосылыстардың көптеген өндірісі үшін бастапқы шикізат ретінде кеңінен қолданылады: тонус, потенциал, антиоксиданттық белсенділіктің жоғарылауы. Алайда, қазіргі уақытта цистанхенің табиғи қорлары айтарлықтай азайған, бұл осы түрді сақтау мәселесі, оның биологиялық белсенді заттарын алудың балама көздерін іздестіруді өзекті етеді. Жоғары өсімдіктер жасушаларының өсіндісі сирек өсімдіктердің биомассасын алудың балама тәсілі болып табылатыны белгілі. Бұл жұмыста *C. deserticola* тұқымынан жасушалардың каллус өсінділерін алу әдістерін оңтайландыру бойынша жұмыс нәтижелері келтірілген. Цистанхе жасушаларының каллусты өсінділерінің бірнеше линиясы алынды, өсу динамикалары зерттелді. Алынған линиялардың өсу динамикасы талданды және түсі бойынша әртектілігі қарастырылды, түстерінің әртүрлілігі екінші реттік метаболиттердің синтезінің дәлелі болып табылады. Цистанхе жасушаларының каллус өсінділерін алудың ұсынылған әдістемесі өте тиімді екені белгіленді.

Түйінді сөздер: цистанхе, *Cistanche deserticola*, каллус ұлпаларының әртектілігі, жасуша өсіндісі, фитогормондар.

S.S. Bekkuzhina, A.O. Rakhimzhanova, A.K. Talkanbayeva, S.A. Manabayeva

National Center for biotechnology, Kazakhstan, Nur-Sultan

Induction of callusogenesis in a culture of isolated seeds of *Cistanche Deserticola*

Abstract: *Cistanche* (*C. deserticola*) - is one of the valuable technical plants of the Kazakhstan flora. The value of *cistanche* is due to the high content of various polysaccharides, iridoids, and other biologically active substances in the stolons, which are widely used in the eastern countries as feedstock for the production of many

pharmacologically active compounds with a wide spectrum of action: increasing tone, potency, antioxidant activity. However, to date, the natural reserves of cistanche are substantially depleted, which makes both the problem of preserving this species and the search for alternative sources of its biologically active substances urgent. It is known that the cell culture of higher plants is an alternative way to obtain rare plant biomass. This paper presents the results of work on optimizing methods for obtaining callus cell cultures from *C. deserticola* seeds. Several lines of callus cultures of cistanche cells were obtained, growth characteristics were studied. It was established that the proposed method for obtaining callus cultures of cistanche cells is quite effective, the obtained lines have good growth characteristics and differ in color, which is evidence of the synthesis of various secondary metabolites.

Keywords: cistanche, *Cistanche deserticola*, heterogeneity of callus tissues, callus cell culture, phytohormones

References

- 1 Dathayev U. M., Kapsalyamova E.N., Buhanbayeva M.D. *Cistanche solonchakovii* kak perspektivnii istochnik pri polushenii granul [Cistanche saline as a promising source for the production of granules], *Vestnik KazNMU*. – 2014. – №5. – P.52-53. [in Russian]
- 2 Karzhaubekova Zh.Zh., Gemedzhiyeva N.G. Fotohimicheskoe issledovanie rastenii roda cistanche [Phytochemical study of plants of the cistanche genus] *Cistanche hoffmngg. Etlink*), *Vestnik KazNU*. – 2013. – №3. – P.388-390. [in Russian]
- 3 Jiang Y., Tu P.F. (2009) Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species, *Journal of Chromatography A*. – P.1970-197.
- 4 Kobayashi H., Karasawa H., Miyase T., Fukushima S. (1984) Studies on the constituents of *Cistanche Herba*. II: Isolation and structures of new iridoids, cistanin and cistachlorin, *Chemical and pharmaceutical bulletin*. – Vol.32, №5. – P.1729-1734.
- 5 Karzhaubekova Zh.Zh., Gemedzhiyeva N.G., Nabieva Zh.S. K fotohimicheskim issledovaniyam *Cistanche Salsa* [To phytochemical studies of *Cistanche salsa*] (OROBANCHACEAE), *Himiya rastitel'nogo syr'ya*. – 2016. – №4. – P.123-130. [in Russian]
- 6 Sarsembayev K.N., Baramysova G.T., Djiembayeva B.Zh., Kozhamzharova L.S., Isabayev S.O., Kolosova N.G., Imanbayeva A.A. Morfologicheskie biohimicheskie osobennosti kazhastanskih populyatsii cistanche somnitel'noi [Morphological biochemical features of Kazakhstan populations of *Cistanche* of dubious], *Khimicheskii zhurnal Kazakhstana*. – 2009. – №1. – P.5-10. [in Russian]
- 7 Baramysova G.T., Djiembayeva B.Zh., Kozhamzharova L.S., Isabayev S.O., Kolosova N.G., Sarsembayev K.N. Konstruirovaniye nanochistits na osnove stolonov tsiskhankhe somnitel'noy [The construction of nanoparticles based on stolons of *Cistanche* of dubious], *Vestnik Almatinskogo instituta energetiki i svyazi*. – Almaty, – 2010, №1. – P.87-90. [in Russian]
- 8 Wang T, Xie X.V., Ma Y.C. *Cistanche deserticola* «Desert Ginseng» A Review the American Journal of Chinese Medicine. – 2012. – Vol.406, №6. – P.1123-1141. [in Russian]
- 9 Zhang A., Li Q., Yang X., Yang Y. (2018) Immunostimulatory activity of water-extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* as a plant adjuvant in vitro and in vivo *PLoS ONE*. – Vol.13. – P.1086-1105.
- 10 Butenko R.G. *Biologiya kletok vysshikh rasteniy in vitro i biotekhnologii na ikh osnove* [Biology of cells of higher plants in vitro and biotechnology based on them]// *Uchebnoye posobiye*. – M.: – 1999. – P.158. [in Russian]
- 11 Nosov A.M. *Regulyatsiya sinteza vtorichnykh soyedineniy v kul'ture kletok rasteniy* *Biologiya kul'tiviruyemykh kletok i biotekhnologiya rasteniy* Red. R.G. Butenko [Regulation of the synthesis of secondary compounds in plant cell culture *Biology of cultured cells and plant biotechnology*]. – M.: Nauka. – 1991. – P.5-20. [in Russian]
- 12 Nosov A.M. *Ispol'zovaniye kletochnykh tekhnologiy dlya promyshlennogo polucheniya biologicheskii aktivnykh veshchestv rastitel'nogo proiskhozhdeniya* *Biotekhnologiya* [The use of cellular technologies for the industrial production of biologically active substances of plant origin], *Biotekhnologiya*. – 2010. – №5. – P.7-24. [in Russian]

13 Liu X., Yan Y., Liu Y., Mo T., Song X., Wang Y., Chen Q., Zhao Y., Shi S., Tu P. (2008) Cell culture establishment and regulation of two phenylethanoid glycosides accumulation in cell suspension culture of desert plant *Cistanche tubulosa* Plant cell, tissue and organ culture. – Vol.134. – P.107-118.

Сведения об авторах:

Беккужина С.С. – автор для корреспонденции, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

Талканбаева А.К. – Лаборант лаборатории генетической инженерии растений РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, магистрант 1-ого курса специальности биотехнология 6M070100 Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан.

Рахимжанова А.Ө. – Научный сотрудник РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» МОН РК, Нур-Султан, Казахстан .

Манабаева Ш.А. – Кандидат биологических наук, заведующий лабораторией генетической инженерии растений РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» МОН РК, доцент кафедры общей биологии и геномики, Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

Bekkuzhina S.S. – **corresponding author**, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Plant Genetic Engineering «National center for biotechnology», Nur-Sultan, Kazakhstan.

Talkanbayeva A.K. – laboratory assistant of the laboratory of Plants Genetic Engineering «National center for biotechnology», 1st year master's student specialty 6M070100 Biotechnology at the L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Rakhimzhanova A.O. – Researcher of the laboratory of Plants Genetic Engineering «National center for biotechnology», Nur-Sultan, Kazakhstan.

Manabayeva S.A. – Candidate of Biological Sciences, Head of the laboratory of Plants Genetic Engineering «National center for biotechnology», associate professor of Department of General Biology and Genomics at the L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.

Шек Г.О.¹, Есимсеитова А.К.¹
Жаныбекова Ж.Т.¹, Бабкенов А.Т.²
Дюсембекова Д.А.¹, Шелаева Т.В.², Какимжанова А.А.¹

¹Национальный центр биотехнологии, Казахстан, Нур-Султан, Казахстан

²Научно-производственный центр зернового хозяйства им. А.И. Бараева,
п. Шортанды, Казахстан

(E-mail: sheckgo@mail.ru, asel_1388@bk.ru, zhanargul.zhanybekova@mail.ru, babkenov64@mail.ru, dusembekova.damira@mail.ru, kakimzhanova@biocenter.kz)

Получение засухоустойчивых растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы

Аннотация: Одной из причин снижения качества зерна являются изменение природно-климатических условий в Казахстане. К ним следует отнести нарастающую угрозу засух и заморозков в период вегетации пшеницы, усиление ветров и контрастности климата на фоне деградации почв (засоление, опустынивание) в результате нерационального использования и нарушения экологического равновесия в биоценозе. Целью работы было получение растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы на устойчивость к засухе в культуре *in vitro*, и их размножение для получения семенного потомства. Ввели в культуру *in vitro* 10 отечественных сортов яровой мягкой пшеницы. При проведении клеточной селекции морфогенные каллусные ткани пшеницы культивировали на питательную среду МС, с добавлением оптимальных концентраций селективных агентов: полиэтиленгликоль 6000 – 5%; маннит – 2%; NaCl – 0,5%. Определяли регенерационную способность генотипов пшеницы. Морфогенетический потенциал был выше у 10 сортов при использовании 2% маннита и 5% полиэтиленгликоля, что составило 44,2% и 38,9% соответственно, что характеризует их адаптационные способности к засухе в условиях *in vitro*. Получено семенное потомство R₀-R₁ линий-регенерантов пшеницы. Проведен структурный анализ растений-регенерантов, полученных с селективных агентов маннит 2%, NaCl 0,5% и полиэтиленгликоль 5%. На основании проведенных экспериментов выделены наиболее засухоустойчивые растения-регенеранты и получено семенное потомство R₁.

Ключевые слова: клеточная селекция, растения-регенеранты, засухоустойчивость, линии яровой мягкой пшеницы

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-53-68>

Одним из основных источников развития экономики страны является агропромышленный комплекс, Казахстан входит в 10-ку стран в мире по выращиванию пшеницы. Это стало возможно благодаря двум основным факторам: плодородные почвы и климат. Основной регион производства пшеницы расположен в северных, центральных регионах, где рельеф в основном плоский, почвы представлены продуктивными черноземами и каштановыми почвами, на которых произрастает около 70% общего урожая пшеницы в стране. В Казахстане возделывают два вида пшеницы это: мягкая (*Triticum aestivum* L.) и твёрдая (*Triticum durum* D.). Климат страны полузасушливый, обычно с теплым летом и холодной зимой. Это благоприятные условия для нормального развития и получения качественной пшеницы. Засухи встречаются в среднем

по 2 года из 5, благодаря этому в северных районах выращивают твердую пшеницу высокого качества, этот вид пшеницы хорошо переносит засухи [1].

Пшеница одна из крупнейших продовольственных культур в мире, основная зерновая культура, возделываемая в Казахстане [2]. Роль производства пшеницы для страны огромна, климатические условия и благоприятные почвы северного Казахстана, превосходно подходят для ее возделывания. Так в 2017 году, в Казахстане было собрано 14802,9 тыс. тонн пшеницы, из них на Северо-Казахстанскую, Акмолинскую и Костанайскую области приходится 11874,7 тыс. тонн пшеницы [3].

В связи с тем, что производство пшеницы играет важную роль в экономике Казахстана, необходимо повышать качество и урожайность пшеницы для более эффективного использования.

На протяжении всей истории доместикации пшеницы, производился отбор по внешним признакам, по урожайности, который привел к снижению генетического разнообразия [4]. Этот подход требует многолетних испытаний, поскольку во многих регионах засуха нерегулярна. Проблема состоит в том, что селекционный процесс требует отбраковки растений по результатам одного года испытаний. Использование физиологических признаков, наряду с селекцией по урожайности может позволить вести отбор в отсутствие засухи. Поэтому проводятся многочисленные исследования возможности отбора засухоустойчивых растений по физиологическим признакам [5, 6, 7]. Также с развитием селекции и биотехнологии были разработаны новые методы создания сортов с необходимыми ценными признаками, такими как устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды и устойчивость к различным болезням.

Использование *in vitro* техник позволяет в короткие сроки получать линии пшеницы с необходимыми признаками. Для индукции в культуру *in vitro* могут быть использованы незрелые и зрелые зародыши, пыльники, соцветия, апикальные меристемы [8].

In vitro культура клеток и тканей дает возможность увеличить генетическую вариабельность для последующих физиологических исследований. В исследованиях *in vitro* на коэффициент каллусообразования и регенерации влияет генотип, тип экспланта, качество исходного материала, состав питательной среды и общее взаимодействие между ними. Для регенерации наиболее предпочтительным является использование в качестве экспланта незрелых зародышей, однако из-за сезонности данный тип экспланта нельзя использовать круглогодично в отличие от зрелых зародышей, в то время как зрелые зародыши можно хранить в течение нескольких лет, однако коэффициент регенерации у них меньше.

Состав питательной среды, регуляторы роста и добавки основные факторы, влияющие на инициацию *in vitro* культуры [9]. Для индукции каллусообразования наиболее часто применяют ауксины 2,4-Д, дикамба и пиклорам, одними или с добавлением цитокининов. Также стадия каллусообразования сильно зависит от генотипа. Для пшеницы использование культуры *in vitro* эффективно для создания сортов с признаками устойчивости к различным болезням и абиотическим факторам окружающей среды [10].

Так, известно, что при применении техники *in vitro* культуры высока вероятность возникновения соматоклональных вариаций, однако отмечается, что данные изменения приносят генетическую вариабельность, которая может быть мощным толчком в создании устойчивых к засухе, холоду, засоленности растений и т.д. В одном исследовании по созданию сортов *Triticum durum* устойчивых к засухе, в питательную среду для каллусообразования добавляли ПЭГ, для создания осмотического стресса. Они проверяли наличие соматоклональных вариаций по устьичному аппарату, так, закрытие устьиц является одним из первых признаков у пшеницы, находящейся в условиях засухи. В результате исследований было отмечено, что в линиях с соматоклональными вариациями стадия цветения наступает позже, и что позднее цветение из-за осмотического стресса приводит к формированию большего числа зерен. Таким способом, растение пытается

избежать сильных повреждений от стресса, накопив ресурсы и время. Показано, что наличие соматональных вариаций улучшили качества пшеницы [11].

Соматический эмбриогенез и регенерация являются ключевыми этапами для получения фертильных растений [12].

Вся культивируемая пшеница принадлежит к роду *Triticum*, существуют диплоидные, тетраплоидные и гексаплоидные формы, с базовым числом хромосом равным 7. Так, геномы будут выглядеть как AA, AABB, AABBDD, гаплоидные формы будут выглядеть как A, AB, ABD с набором 7, 14, 21 соответственно. Гаплоидные формы могут спонтанно возникнуть в природе, однако такое явление редко и имеет низкую практическую ценность. Исследователями были разработаны технологии для создания гаплоидных форм с последующим удвоением генома [13]. На сегодняшний день хорошо изучены три различные техники получения дигаплоидов; через кукурузу, культура пыльников и изолированные микроспоры [14, 15]. Для использования в гаплоидной технологии исходный материал должен быть генетически стабильным и отборанным по необходимым признакам. Так, при использовании традиционных методов селекции для выведения сорта необходимо 5 поколений, то при использовании метода гаплоидной технологии необходима только одно поколение и необходимый нам признак будет закреплен [13].

В настоящее время актуально создание новых сортов сельскохозяйственных культур с повышенной толерантностью к засухе, засолению, болезням и вредителям, которые могут давать стабильные урожаи при наименьшем водопотреблении. Для создания таких сортов следует использовать не только методы классической селекции, но и методы биотехнологии. Преимущества биотехнологических методов очевидны: они близки к естественному отбору для растений в экстремальных условиях и выявлению адаптационных возможностей имеющихся сортов и гибридов.

В качестве осмотических агентов для создания линий устойчивых к засухе некоторые ученые используют ПЭГ, маннит, сахарозу. Однако, ПЭГ с высоким молекулярным весом непроникающий осмотический агент, который не проникает в апопласт, поэтому вода выводится не только из клетки, но также из клеточной стенки создавая снижения водного потенциала, похожий на высушенную почву, также ПЭГ является наименее фитотоксичным [16, 17, 18, 19].

Для формирования осмотического стресса используют различные концентрации ПЭГ-6000, однако в некоторых исследованиях было установлено что, большие концентрации летальны для зародышей пшеницы [20, 21]. В одном из исследований было показано, что оптимальной концентрацией ПЭГ в культуре *in vitro* является 5% ПЭГ [22].

Целью данной работы являлось получение растений-регенерантов яровой мягкой пшеницы на устойчивость к засухе в культуре *in vitro*, и их размножение для получения семенного потомства. В этом исследовании мы сообщаем о получении семенного потомства R₁ растений-регенерантов пшеницы с физиологической устойчивостью к засухе. Полученные растения-регенеранты с устойчивостью к селективным агентам в дальнейшем будут размножены и генотипы с лучшими показателями будут внедрены в селекционный процесс.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовали 10 отечественных сортов яровой мягкой пшеницы: Акмола 2, Астана, Шортандинская 95 ул, Целина 50, Астана 2, Орал, Тәуелсіздік 20, Асыл Сапа, Шортандинская 2012, Шортандинская 2014, которые были предоставлены Научно-производственным центром зернового хозяйства им. А.И. Бараева.

Для введения *in vitro* сортов яровой мягкой пшеницы использовали следующие методы – стерилизация и введение эксплантов в культуру *in vitro*, культивирование клеточных линий и регенерация растений [23, 24].

Для каллусообразования использовали питательную среду Мурасиге и Скуга, с добавлением тиамина HCl – 1 мг/л, мезо-инозита – 100 мг/л, сахарозы – 30 г/л, агара – 7 г/л, 2,4-Д – 3 мг/л, рН среды доводили до значения 5,8. При проведении клеточной селекции морфогенные кал-

лусные ткани пшеницы культивировали на питательную среду МС, с добавлением оптимальных концентраций селективных агентов: полиэтиленгликоль 6000 (ПЭГ) – 5%; маннит – 2%; NaCl – 0,5%.

Определяли регенерационную способность генотипов пшеницы. Отбирались устойчивые морфогенные каллусные ткани пшеницы, которые культивировали *in vitro* на среде МС с фитогормонами (ИУК 0,5 мг/л и кинетин 1,5 мг/л). Пробирочные каллусные линии выращивали в оранжерее в условиях 16-часового светового дня (освещенностью 3000 лк) при температуре 26°C и влажности 70%. Высаживали укорененные пробирочные растения пшеницы в смеси торфа с землей в соотношении 4:1. Полив и опрыскивание проводили по мере подсушивания субстрата. Рыхление проводили после полива один раз в 14-20 дней. Растения выращивали при температуре от 16 до 26°C с влажностью воздуха 50-60% и 16-часовым фотопериодом (освещенностью 3000 лк).

Проводили структурный анализ растений-регенерантов полученных с селективных агентов маннит 2%, NaCl 0,5% и ПЭГ 5%. Получены средние значения по следующим показателям: высота растений, длина колоса, число колосков в колосе, число зерен в колосе и их стандартные ошибки. Статистическую обработку данных проводили согласно общепринятым методам с помощью встроенного статистического пакета EXCEL (MS OFFICE 2010).

Результаты и обсуждение. Адаптивные механизмы растений к абиотическим стрессовым воздействиям разнообразны. В тоже время, вопрос об ответных реакциях растений на повреждающее действие стрессов окончательно не выяснен, так как на любое воздействие растительный организм отвечает целым веером защитно-приспособительных реакций. Значительное место в решении проблем адаптации занимает клеточная селекция, основанная на отборе клеточных популяций, устойчивых к селективному фактору, и регенерации из них целых растений [25, 26, 27].

Авторами при использовании селективной системы с применением маннита для создания засухоустойчивых растений сахарной свеклы была выбрана оптимальная концентрация маннита для изучаемых двух видов эксплантов: микроклонов 0,40-0,45М и для зрелых зародышей семян 0,45-0,50М. Так, при концентрации маннита от 0,25 до 0,35М, у микроклонов наблюдали пожелтение листьев и небольшое снижение роста при их выживаемости 65-79%. При увеличении концентрации селективного агента до 0,50 и 0,60М выявлено угнетение роста и массовая гибель регенерантов, вызванная некрозом листьев [28].

Для изучения адаптационной способности яровой мягкой пшеницы к засухе и засолению культивировано 1468 зрелых зародышей 10 сортов на селективные среды: МС (контроль), МС с 2% маннитом, МС с 0,5% NaCl, МС с 5% ПЭГ 6000. Получено с селективных сред 560 морфогенных каллусных линий пшеницы. В среднем процент морфогенеза на питательной среде МС (контроль) у 10 сортов пшеницы составил 60,5% (рисунок 1).

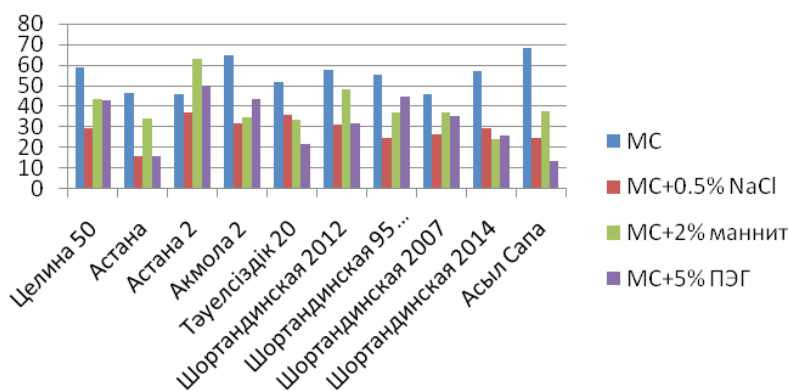


Рисунок 1 – Процент морфогенеза на селективных средах у 10 сортов пшеницы

Для получения устойчивых к осмотическому стрессу каллусов сои был использован селективный агент ПЭГ-6000 в возрастающих концентрациях – 5%, 10%, 15% и 20%. В результате получено 6 устойчивых к осмотическому стрессу растений-регенерантов сои. Регенерация из каллуса отмечена только у 8,3% из высаженных каллусов, исследователи связывают это с длительностью пассирования каллуса и низким морфогенетическим потенциалом [29].

При добавлении в питательную среду МС селективного агента 0,5% NaCl процент морфогенеза снизился до 32,8%. Морфогенетический потенциал был выше у 10 сортов при использовании 2% маннита и 5% ПЭГ, что составило 44,2% и 38,9% соответственно, что характеризует их адаптационные способности к засухе в условиях *in vitro*. Каллусные линии сортов Акмола 2, Астана 2, Целина 50 и Шортандинская 95 ул. были устойчивыми к недостатку влаги в питательной среде МС с селективными агентами 2% маннит и 5% ПЭГ.

В результате проведения клеточной селекции на устойчивость к засухе и засолению из 10 сортов яровой мягкой пшеницы Северо-Казахстанской селекции получены 496 растений-регенерантов в культуре *in vitro* (таблица 1). Разные генотипы яровой мягкой пшеницы значительно различались по реакции на селективные агенты (МС с 2% маннитом, МС с 5% ПЭГ, МС с 0,5% NaCl) в культуре *in vitro*.

Авторами проведена биохимическая и физиологическая оценка растений-регенерантов ячменя, полученных в селективных системах. Так, частота выживания каллусов снижалась на 15,6-23% по сравнению с контролем при добавлении селективного агента ПЭГ 10% в питательную среду. В результате получены устойчивые каллусные линии ячменя, способные к регенерации, которая определялись генотипом исходного растения [30].

В наших исследованиях у сортов Шортандинская 2012, Целина 50 и Шортандинская 2007 и Астана 2 наблюдали наибольший выход пробирочных растений-регенерантов: 111, 96, 69 и 65 штук соответственно. Наиболее заметно количество пробирочных растений-регенерантов устойчивых к манниту у сортов Шортандинская 2012 – 33 штук, Целина 50 – 27 штук, Астана 2 – 28 штук и Шортандинская 2007 – 21 штук. У сортов Асыл сапа, Шортандинская 95 улучшенная и Акмола 2 наблюдали наибольшую гибель растений-регенерантов на всех трех селективных агентах.

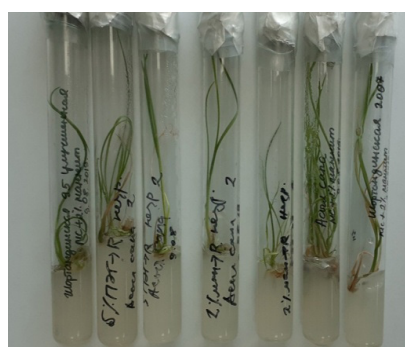
Сообщается об аналогичных результатах [31], где отмечена высокая отзывчивость 13 родительских генотипов яровой мягкой пшеницы, только 3 оказались неустойчивыми к ПЭГ 6000 в культуре *in vitro*. По мнению автора, данные генотипы могут быть использованы для создания засухоустойчивых гибридных линий и включаться в селекционный процесс на засухоустойчивость в качестве исходных форм.

Таблица 1 – Количество пробирочных растений-регенерантов, полученных на селективных средах у 10 сортов яровой мягкой пшеницы (2019 г.)

| Генотип | Количество растений-растений <i>in vitro</i> , штук | | | | |
|----------------------|---|----------------|-------------|----------------|-------|
| | МС (контроль) | МС с 2% маннит | МС с 5% ПЭГ | МС с 0,5% NaCl | Итого |
| Акмола 2 | 7 | 1 | 1 | 3 | 12 |
| Астана | 10 | 12 | 5 | 1 | 28 |
| Астана 2 | 32 | 28 | 1 | 4 | 65 |
| Шортандинская 95 ул. | 10 | 6 | 1 | 1 | 18 |
| Шортандинская 2007 | 28 | 21 | 8 | 12 | 69 |
| Шортандинская 2012 | 45 | 33 | 15 | 18 | 111 |

| | | | | | |
|--------------------|----|----|----|----|----|
| Шортандинская 2014 | 10 | 8 | 7 | 6 | 31 |
| Асыл сапа | 15 | 9 | 6 | 3 | 33 |
| Целина 50 | 36 | 27 | 18 | 15 | 96 |
| Тәуелсіздік 20 | 11 | 12 | 1 | 9 | 33 |

Таким образом, среди исследуемого материала яровой мягкой пшеницы можно выделить генотипы, которые в использованных условиях культивирования на селективных агентах показали высокую (Шортандинская 2012, Целина 50, Шортандинская 2007 и Астана 2), среднюю (Тәуелсіздік 20, Шортандинская 2014, Астана и Асыл сапа) и низкую (Шортандинская 95 улучшенная и Акмола 2) отзывчивость на культуру *in vitro* (рисунок 2).



1



2



3



4

1, 2 – растения-регенеранты *in vitro*; 3,4 – растения-регенеранты, в условиях оранжереи
Рисунок 2 – Получение растений-регенерантов пшеницы с селективных сред

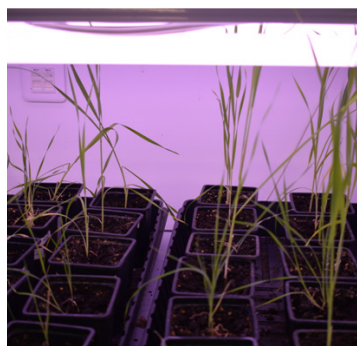
Затем полученные растения-регенеранты со сформировавшейся корневой системой высаживали в горшки с почвой в оранжерее. Из 496 растений-регенерантов, полученных в культуре *in vitro*, удалось получить и высадить в почву 200 растений-регенерантов, среди которых можно выделить следующие генотипы: Шортандинская 2012 и Целина 50, у которых был получен наибольший выход количества растений. В результате получено и доведено до семенного потомства R_0 поколения 78 регенеранта на среде МС (контроль) и 122 регенеранта на селективных средах. Данные результаты, могут косвенно говорить о высокой засухо- и солеустойчивости растений-регенерантов, выделенных из каллусных линий, которые в последующем могут быть использованы в селекционном процессе для создания новых форм (таблица 3).

Таким образом, получено 122 растений-регенерантов из 10 сортов в поколении R_0 , устойчивых к селективным факторам: 2% манниту – 54 регенерантов, 5% ПЭГ – 31 регенерантов, 0,5% NaCl – 37 регенерантов.

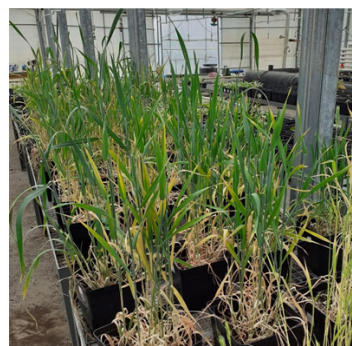
Таблица 3 – Количество растений-регенерантов, высаженных в почвогрунт для получения семенного потомства R0 (2020 г.)

| Генотип | Количество растений-регенерантов, высаженных в почвогрунт | | | |
|----------------------|---|----------------|-------------|----------------|
| | МС (контроль) | МС с 2% маннит | МС с 5% ПЭГ | МС с 0,5% NaCl |
| Акмола 2 | 6 | 2 | 3 | 8 |
| Астана | 5 | - | - | 5 |
| Астана 2 | 11 | 9 | 2 | 4 |
| Шортандинская 95 ул. | 6 | 2 | - | - |
| Шортандинская 2007 | 4 | 4 | - | 3 |
| Шортандинская 2012 | 18 | 20 | 2 | 8 |
| Шортандинская 2014 | 3 | 2 | 2 | - |
| Асыл сапа | 9 | 7 | 6 | 3 |
| Целина 50 | 9 | 8 | 15 | 1 |
| Тәуелсіздік 20 | 7 | - | 1 | 5 |
| Итого | 78 | 54 | 31 | 37 |

Полученные растения-регенеранты адаптировали *in vivo* в условиях оранжереи до фазы выхода в трубку, во время которой происходит интенсивное нарастание вегетативной массы и формирование генеративных органов. В этот период необходимо обеспечить растение максимумом воды, так как ее недостаток приводит к значительному снижению урожайности. Благоприятные условия в оранжерее (оптимальная температура и достаточное количество света) ускорили рост стебля растений пшеницы. В последующем растения пшеницы были перенесены в условия пленочной теплицы до последующего полного их созревания (рисунок 3).



1



2

1 – растения-регенеранты в оранжерее; 2 – растения-регенеранты в теплице

Рисунок 3 – Растения-регенеранты пшеницы в условиях *in vivo*

Аналогичным образом, другие авторы также использовали в клеточной селекции на устойчивость к засухе селективные агенты ПЭГ и оксипролин для получения регенерантов гороха, анализ морфологических признаков показал, что все линии двух сортов из пяти изученных, оказались короткостебельными в сравнении с исходным сортом. По семенной продуктивности, полученные линии-регенеранты были на уровне исходного сорта. Результаты показывают, что полученные линии могут использоваться при создании засухоустойчивых вариантов гороха [32].

В результате исследований в конце вегетации нами был проведен структурный анализ растений пшеницы, полученных с селективных агентов: 2% маннит, 0,5% NaCl и ПЭГ 5%. Высоту растений, длину колоса определяли с помощью линейки. Также производили подсчет числа колосков и числа зерен в колосе. В таблице показаны средние данные со стандартной ошиб-

кой (таблица 5, 6, 7). В результате проведения структурного анализа по среде с 2% маннитом были выявлены следующие результаты: высота растений варьировала от 25 до 70,4 см. У растений-регенерантов из сорта Шортандинская 2014 этот показатель был выше по сравнению с другими сортами в среднем составил 74,0 см, длина колоса - 7,0 см, число колосков в колосе - 8,0 штук. При этом показатель число зерен в колосе был низким по сравнению с другими растениями-регенерантами. Лучшие показатели наблюдали растений-регенерантов из сорта Астана, где высота растений в среднем составила 54,9 см, а число зерен в колосе – 16,4 штук.

Также элементы продуктивности яровой мягкой пшеницы – величины непостоянные и изменяются в зависимости от почвенно-климатических, агротехнических и других условий, как сообщается в исследованиях Пушкарева Д.В. [33].

Кроме того, потенциальный уровень продуктивности колоса пшеницы зависит от числа колосков. Количество зерен в колосе и масса зерна с одного колоса тем больше, чем больше количество колосков [34].

Таблица 5 - Структурный анализ растений-регенерантов со среды 2% маннит поколения R₀

| Наименование растений-регенерантов | Растения, штук | Высота растений, см | Длина колоса, см | Число колосков в колосе, штук | Число зерен в колосе, штук |
|------------------------------------|----------------|---------------------|------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Шортандинская 2007 | 2 | 25,0±0,8 | 1,0±0,3 | 2,0±0,1 | 1,0±0,3 |
| Шортандинская 2012 | 6 | 39,3±14,6 | 3,3±1,6 | 5,2±0,8 | 5,3±3,2 |
| Шортандинская 2014 | 2 | 74,0±3,7 | 7,0±0,2 | 8,0±0,2 | 3,0±0,1 |
| Астана | 17 | 54,9±5,5 | 6,3±1,8 | 10,4±3,2 | 16,4±7,3 |
| Астана 2 | 2 | 49,0±9,9 | 8,50±2,1 | 11,0±4,2 | 14,0±11,3 |
| Акмола 2 | 2 | 60,0±1,8 | 5,0±0,2 | 5,0±0,2 | 12,0±0,4 |
| Асыл сапа | 2 | 44,0±1,3 | 5,0±0,2 | 9,0±0,3 | 13,0±0,4 |
| Целина 50 | 3 | 60,3±5,5 | 7,5±2,8 | 7,7±0,6 | 10,7±3,2 |

При проведении структурного анализа пшеницы с селективного агента ПЭГ, высота растений варьировала от 41,5 до 60 см. Выше этот показатель был у растений-регенерантов из сорта Шортандинская 2012. Число колосков в колосе варьировало от 6 до 17 штук. Наибольшее количество их было у растений-регенерантов из сорта Асыл сапа – 17 штук. При этом число зерен в колосе у растений-регенерантов из сорта Акмола 2, Астана 2 и Шортандинская 2012 было 17 штук, у растений-регенерантов из сорта Целина 50 – 7 штук. Наименьший показатель числа зерен в колосе был у растений-регенерантов из сорта Асыл сапа – 3 штуки (таблица 6). Следовательно, лучшие показатели наблюдали у растений-регенерантов из сорта Акмола 2, где высота растений в среднем составила 58,3 см, число колосков в колосе – 9,8 штук, число зерен в колосе – 17,0 штук.

Таблица 6 - Структурный анализ растений-регенерантов со среды 5% ПЭГ поколения R₀

| Наименование | Растения, штук | Высота растений, см | Длина колоса, см | Число колосков в колосе, штук | Число зерен в колосе, штук |
|--------------------|----------------|---------------------|------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Целина 50 | 2 | 41,5±2,1 | 4,5±0,7 | 7,0±0,2 | 7,0±0,2 |
| Акмола 2 | 4 | 58,3±15,8 | 5,3±0,6 | 9,8±2,6 | 17,0±4,3 |
| Асыл сапа | 2 | 57,0±1,7 | 8,0±0,2 | 17,0±0,5 | 3,0±0,1 |
| Астана 2 | 2 | 49,0±1,5 | 5,5±0,2 | 12±0,4 | 17,0±0,5 |
| Шортандинская 2012 | 2 | 60,0±1,8 | 7,5±0,2 | 6±0,2 | 17,0±0,5 |

В исследованиях Шуплецовоу О.Н. показано, что по сравнению с благоприятными условиями преимущество регенерантов относительно исходных сортов проявляется в большей степени на стрессовых фонах. Сорта, созданные на основе регенерантов, превосходят стандарт по урожайности, имеют высокую продуктивную кустистость (выше стандарта на 29-67,5 %) и плотный колос (выше стандарта на 4,5-6,6 %). Их преимущество обусловлено устойчивостью к полеганию, высоким уровнем выживаемости, всхожести и средообразующей активности корневой системы. Полученные данные будут использоваться для создания 15 линий ячменя, которые будут устойчивы к засухе и ионной токсичности кислых почв [35].

При проведении структурного анализа пшеницы с селективного агента 0,5% NaCl, высота растений варьировала от 47,0 до 60 см. Выше этот показатель был у растений-регенерантов из сорта Астана 2. Самый длинный колос был у сорта Астана 2, что составила 7,0 см, самый низкий у сорта Шортандинская 2007 – 3,5 см. Число колосков в колосе варьировало от 5 до 13 штук. Наибольшее количество их было у растений-регенерантов из сорта Астана 2 – 13 штук. При этом число зерен в колосе варьировало от 4,0 до 15 штук. Наименьший показатель число зерен в колосе был у растений-регенерантов из сорта Шортандинская 2007 – 4,0 штуки (таблица 6, рисунок 4).

Таблица 6 - Структурный анализ растений-регенерантов со среды 0,5% NaCl поколения R0

| Наименование | Растения, штук | Высота растений, см | Длина колоса, см | Число колосков в колосе, штук | Число зерен в колосе, штук |
|--------------------|----------------|---------------------|------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Шортандинская 2007 | 2 | 47,0±1,4 | 3,5±0,1 | 5,0±0,2 | 4,0±0,1 |
| Шортандинская 2012 | 3 | 53,3±5,8 | 6,5±0,9 | 11,0±3,0 | 15,0±3,6 |
| Астана 2 | 2 | 60,0±1,8 | 7,0±0,2 | 13,0±0,4 | 10,0±0,3 |
| Астана | 13 | 48,9±11,1 | 6,1±1,2 | 9,1±3,3 | 10,2±8,3 |
| Акмола 2 | 7 | 54,7±7,5 | 5,6±2,0 | 10,6±2,8 | 11,7±5,8 |
| Тәуелсіздік 20 | 4 | 47,0±3,9 | 5,5±1,3 | 9,0±3,4 | 10,8±3,3 |
| Целина 50 | 2 | 54,0±1,6 | 5,0±0,2 | 10,0±0,3 | 15,0±0,5 |

Таким образом, лучшие показатели наблюдали у растений-регенерантов из сорта Шортандинская 2012, где высота растений в среднем составила 53,3 см, число колосков в колосе – 11,0 штук, число зерен в колосе – 15,0 штук.



1



2

1, 2 - растения-регенеранты,



3 – колосья растений-регенерантов
Рисунок 4 – Структурный анализ пшеницы поколения R1

В дальнейшем семена растений-регенерантов в поколении R_0 посеяли в горшки для размножения и получения семенного потомства R_1 . Выращены растения-регенеранты и получено семенное потомства R_1 из 6 сортов пшеницы на селективных и контрольных средах. Проведен структурный анализ полученных растений-регенерантов поколения R_1 . Так у растений-регенерантов из сорта Акмола 2 с 2% маннит наблюдали пустой колос и отсутствие семян в колосе. При этом у сорта Тәуелсіздік 20 с 0,5% NaCl получено два растения-регенеранта, длина колоса в среднем составило 4,8 см, числе зерен - 15,7 штук, наблюдали наибольшую массу зерна – 0,5 гр. (таблица 7).

Таблица 7 – Структурный анализ пшеницы с селективных сред поколения R_1

| Наименование растения-регенеранта | Растения, штук | Длина колоса, см | Число колосков в колосе, штук | Число зерен в колосе, штук | Масса зерна, гр. |
|-----------------------------------|----------------|------------------|-------------------------------|----------------------------|------------------|
| Акмола 2 с 0,5% NaCl | 4 | 5,3 | 10,6 | 8,1 | 0,2 |
| Акмола 2 с МС | 3 | 6,4 | 12,5 | 11,6 | 0,3 |
| Акмола 2 с 5% ПЭГ | 2 | 6,9 | 14,0 | 10,0 | 0,2 |
| Акмола 2 с 2% маннит | 2 | 5,3 | 11,0 | 0 | 0 |
| Астана 2 с 0,5% NaCl | 4 | 7,8 | 14,9 | 12,9 | 0,3 |
| Целина 50 с 2% маннит | 2 | 5,5 | 12,0 | 7,2 | 0,2 |
| Шортандинская 2012 с МС | 2 | 5,6 | 11,5 | 6,7 | 0,1 |
| Шортандинская 2012 с 2% маннит | 2 | 5,2 | 10,6 | 1,3 | 0,03 |
| Тәуелсіздік 20 с 0,5% NaCl | 2 | 4,8 | 8,7 | 15,7 | 0,5 |

Заключение. В заключении следует отметить, что среди исследуемых сортов яровой мягкой пшеницы выделяются генотипы с высокой, средней и низкой отзывчивостью на культуру *in vitro*. Из 496 растений-регенерантов, полученных в культуре *in vitro*, удалось получить и высадить в почву 200 растений-регенерантов, среди которых можно выделить следующие генотипы: Шортандинская 2012 и Целина 50, у которых был получен наибольший выход пробирочных растений. В результате исследований в конце вегетации нами был проведен структурный анализ растений-регенерантов пшеницы в поколении R_0 , полученных с селективных агентов: 2% маннит, 0,5% NaCl и ПЭГ 5%. Получены лучшие показатели по высоте растений, по длине колоса, по числу колосков в колосе, по числу зерен в колосе у растений-регенерантов с 2% ман-

нита из сорта Астана, у растений-регенерантов с 5% ПЭГ из сорта Акмола 2, у растений-регенерантов с 0,5% NaCl из сорта Шортандинская 2012.

В дальнейшем семена растений-регенерантов в поколении R₀ посеяли в горшки для размножения и получения семенного потомства R₁. Выращены растения-регенеранты и получено семенное потомство R₁ из 6 сортов пшеницы на селективных и контрольных средах, которые в последующем могут быть использованы в селекционном процессе при создании новых форм.

Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта «Трансферт и адаптация технологий по точному земледелию при производстве продукции растениеводства по принципу «демонстрационных хозяйств (полигонов)» в Акмолинской области на 2018-2020 гг.» при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

Список литературы

- 1 Gomez S., Mary S., Langrell S. The Eurasian Wheat Belt and Food Security. – Switzerland: Springer International Publishing, 2017. – 319 p.
- 2 ГОСТ СТ РК 1046-2008. Пшеница Технические условия. Комитет по техническому регулированию и метрологии Министерства индустрии и торговли Республики Казахстан. – Астана, 2008.
- 3 <http://stat.gov.kz>. Статистика сельского, лесного, охотничьего и рыбного хозяйства. – 2019.
- 4 Quarrie S.A., Stojanovic J., Pekic S. Improving drought resistance in small-grained cereals: a case study, progress and prospects // J. Plant Growth Regul. – 1999. – Vol. 29. – P.1-21.
- 5 Lee E.A., Tollenaar M. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield // Crop Sci. – 2007. – Vol. 47, №3. – P. 202-215.
- 6 Reynolds M., Dreccer F., Trethowan R. Drought adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces // J. Exp. Bot. – 2007. – Vol. 58. – P. 177-186.
- 7 Tardieu F. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress // Comp. Rend. Geosci. – 2005. – Vol. 337. – P. 57-67.
- 8 He Y., Jones H.D., Chen S., Chen X.M., Wang D.W., Li K.X., Wang D.S., Xia L.Q. Agrobacterium-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency // Journal of experimental botany. – 2010. – Vol. 61. – P. 1567-1581.
- 9 Raziuddin, Swati Z. A., Bakht J., Farhatullah U. N., Shafi M., Hassan G. In situ assessment of morpho-physiological response of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to drought // Pakistan Journal of Botany. – 2010. – Vol. 42(5). – P. 3183-3195.
- 10 Chang Ch.M., Penna S., Bhagwat S.G. Callus induction and plant regeneration from different *Triticum* species // The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2012. – Vol. 6. – P. 56-62.
- 11 Bajji M., Bertin P., Lutts S., Kinet J.M. Evaluation of drought resistance-related traits in durum wheat somaclonal lines selected in vitro // Anim. Reprod. Sci. – 2004. – Vol. 44. – P. 27-35.
- 12 Munazir M. Qureshi R., Muhammad Ali G., Rashid U., Noor S., Mehmood K., Ali Sh., Arshad M. Primary callus induction, somatic embryogenesis and regeneration studies in selected elite wheat varieties from Pakistan // Pak. J. Bot. – 2010. – Vol. 42(6). – P. 3957-3965.
- 13 Tadesse W., Inagaki M., Tawkaz S., Baum M., Van Ginkel M. Recent advances and application of doubled haploid in wheat breeding // African Journal of Biotechnology. – 2012. – Vol. 11(89). – P. 15484-15492.
- 14 Гуторова О.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Создание генетически маркированных линий кукурузы с наследуемым и индуцированным типами партеногенеза // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Т.18, №2. – С. 341-344.
- 15 Islam S. M. The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Australian Journal of Crop Science. – 2010. – Vol. 4(9). – P. 660-665.

- 16 Hassan N. M., Serag M. S., El-Feky F. M. Changes in nitrogen content and protein profiles following in vitro selection of NaCl resistant mung bean and tomato // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2004. – Т. 26. – №. 2. – С. 165.
- 17 Verslues P. E., Ober E. S., Sharp R. E. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions // *Plant Physiology*. – 1998. – Т. 116. – №.4. – С. 1403-1412.
- 18 Landraces D. W. Evaluation of Interaction Between Genotype and Environments in Term of Germination and Seedling Growth in Durum Wheat Landraces // *Advances in Environmental Biology*. – 2011. – Т.5. – №4. – С. 551-558.
- 19 Sammar Raza M.A., Saleem M. F., Khan I. H., Jamil M., Ijaz M., Khan M. A. Evaluating the drought stress tolerance efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. – 2012. - №12. – P. 41-46.
- 20 Soliman H. I. A. et al. Selection for drought tolerance genotypes in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under in vitro conditions // *Middle East Journal of Scientific Research*. – 2013. – Т.14. – №.1. – С. 69-78.
- 21 Rai M. K. et al. Developing stress tolerant plants through in vitro selection - an overview of the recent progress // *Environmental and Experimental Botany*. – 2011. – Т.71. – №.1. – С. 89-98.
- 22 Galovic V., Kotaranin Z., Dtnic S. In vitro assessment of wheat tolerance to drought // *Genetika*. – 2005. – Vol. 37, №2. – P. 165-171.
- 23 Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: КолосС. – 2006. – 144 с.
- 24 Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З и др. Сельскохозяйственная биотехнология – М.: Высшая школа. – 2008. – 710 с.
- 25 Кидрей Т.А. Устойчивость С4 растений к засолению среды корнеобитания // *Вопросы экологии Волжско-Окского междуречья: Межвузовский сборник*. – 1999. – С.80-83.
- 26 Babadoost M., Herbert T.T. Factor saffecting infection of wheat seedlings by *Septoria nodorum* // *Phytopathology*. – 1984. – Vol. 74. – P. 592-595.
- 27 Svabova L., Lebeda E. In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens // *Phytopathology*. – 2005. – Vol. 153. – P. 52-64.
- 28 Черкасова Н.Н., Жужалова Т.П., Ткаченко О.В. Разработка оптимальных условий in vitro для повышения устойчивости регенерантов сахарной свёклы к засухе // *Сахар*. – 2020. - № 9. – С. 50-52.
- 29 Мохаммад Н.Н, Ержебаева Р.С., Даниярова А.К. Многоступенчатая клеточная и тканевая селекция сои на устойчивость к осмотическому стрессу с применением ПЭГ 6000 в условиях in vitro // *Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия аграрных наук*. – 2017. – №2. – С. 199-204.
- 30 Широких И. Г., Огородникова С. Ю., Далькэ И. В., Шуплецова О. Н. Биохимическая и физиологическая оценка растений регенерантов ячменя, полученных в селективных системах // *Известия РАН. Серия биологическая*. – 2011. – №6. – С. 703-709.
- 31 Круглова Н.Н. Оценка коллекции генотипов яровой мягкой пшеницы по устойчивости автономных зародышей in vitro на селективных средах, имитирующих засуху // *Известия Самарского НЦ РАН*. - 2012. - Т. 16. №1. - С. 2243-2245
- 32 Соболева Г.В. Сравнительная оценка регенерантных линий гороха, полученных методами клеточной селекции // *Научно-производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры*. – 2015. – №1(13). – С. 20-25.
- 33 Пушкарев Д. В. Оценка сортов яровой мягкой пшеницы на экологическую пластичность и стабильность урожайности зерна в степной зоне Омской области: дис.....канд. с/х. наук: 06.01.05. – Омск, 2018. – 135 с.
- 34 Ковтун В.И. Озерненность, масса зерна с колоса и масса 1000 зерен в повышении урожайности озимой мягкой пшеницы // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. – 2015. – №3. – С. 27.
- 35 Шуплецова О.Н. Селективные системы in vitro для получения генотипов ячменя с комплексной устойчивостью к почвенным стрессовым факторам: автореф. дис. на соиск. учен. степ. докт. биол. наук. – Москва, 2019. – 46 с.

Г.О.Шек¹, А.К.Есимсеитова¹, Ж.Т.Жаныбекова¹, А.Т.Бабкенов²,
Д.А.Дюсембекова¹, Т.В.Шелаева², А.А.Какимжанова¹

¹ Ұлттық биотехнология орталығы, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

² А.И. Бараев атындағы астық шаруашылығы ғылыми-өндірістік орталығы, Шортанды, Қазақстан

Жұмсақ жаздық бидайдың құрғақшылыққа төзімді регенерант өсімдіктерін алу

Аңдатпа. Астық сапасының төмендеу себептерінің бірі - Қазақстанның табиғи-климаттық жағдайларының өзгеруі. Оларға биоценоздағы рационалды емес пайдаланудың және экологиялық тепе-теңдіктің бұзылуы нәтижесіндегі құрғақшылық пен аяз, желдің күшеюі және топырақтың деградациялануы (тұздылық, құрғақшылық) фонындағы климаттық өзгерістің әсерлерін жатқызамыз. Жұмыстың мақсаты *in vitro* жағдайында құрғақшылыққа төзімді жұмсақ жаздық бидайдың регенерант өсімдіктерін алу және көбейту. Жұмсақ жаздық бидайдың 10 отандық сұрыпы *in vitro* жағдайына енгізілді. Жасушалық селекцияны жүзеге асырған кезде бидайдың морфогендік каллус ұлпалары селективті агенттердің оңтайлы концентрациясын қосып, қоректік ортада өсірілді: полиэтиленгликоль 6000 – 5%; маннит – 2%; NaCl – 0,5%. Бидай генотиптерінің регенерациялану қабілеті анықталды. Жоғары морфогенетикалық потенциал көрсеткіші 2% маннит пен 5% полиэтиленгликоль қолданылуы арқылы алынған 10 сұрыпта анықталды. Олардың морфогенетикалық көрсеткіштері 44,2% және 38,9% құрды және олардың *in vitro* құрғақшылыққа бейімделу қабілетін сипаттайды. R0-R1 регенерант өсімдіктердің тұқымдықтары алынды. Маннит 2%, NaCl 0,5% және полиэтиленгликоль 5% селективті агенттерін пайдалану арқылы алынған регенерант өсімдіктерінің құрылымдық талдауы жүргізілді. Тәжірибелер нәтижесінде, құрғақшылыққа төзімді регенерант өсімдіктер таңдалып, олардың R1 ұрпағы алынды.

Түйін сөздер: жасуша селекциясы, регенерант өсімдіктер, құрғақшылыққа төзімділік, жаздық бидай линиялары.

G.O.Shek¹, A.K.Yessimseitova¹, Zh.T.Zhanybekova¹, A.T.Babkenov²,
D.A.Dyussebekova¹, T.V.Shelaeva², A.A.Kakimzhanova¹

¹ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan

² A.I. Barayev research and production centre for grain farming, Shortandy, Kazakhstan

Production of drought-resistant regenerant plants of spring soft wheat

Abstract: Climate change is one of the reasons influences to decline grain quality in Kazakhstan. This includes the growing threat of droughts and frosts during the growing season of wheat, increased winds, and climate contrast against the background of soil degradation (salinization, desertification) because of irrational use and disruption of the ecological balance in the biocenosis. The aim of this work is to obtain drought-resistant regenerant plants of spring soft wheat in *in vitro* culture and their seeds. The authors have introduced 10 domestic varieties of spring wheat into *in vitro* culture. Obtained morphogenetic callus of wheat have been cultivated on nutrient medium MS, with treatment of optimal concentrations of selective agents: polyethylene glycol 6000 - 5%; mannitol - 2%; NaCl – 0,5%. There have been determined the regenerative capacity of wheat genotypes. High morphogenetic potential was observed among 10 cultivars using 2% mannitol and 5% polyethylene glycol, which made up to 44,2% and 38,9%, respectively and characterizes there *in vitro* adaptive ability to drought. Seeds (R0-R1) of obtained wheat regenerant lines were produced. Structural analysis has been carried out for obtained regenerant plants from selective agents such as mannitol 2%, NaCl 0.5% and polyethylene glycol 5%. As a result, drought-resistant regenerant plants have been selected and grown to produce their seeds (R1).

Key words: cell selection, regenerant plants, drought-resistant, spring soft wheat lines

References

1 Gomez S., Mary S., Langrell S. The Eurasian Wheat Belt and Food Security. Switzerland: Springer International Publishing, 319 (2017).

- 2 GOST ST RK 1046-2008. Pshenica Tehnicheskie uslovija. Komitet po tehničeskomu regulirovaniju i metrologii Ministerstva industrii i trgovli Respubliki Kazahstan [GOST ST RK 1046-2008. Wheat Specifications. Committee for Technical Regulation and Metrology of the Ministry of Industry and Trade of the Republic of Kazakhstan], Astana, 2008. [in Russian]
- 3 Statistika sel'skogo, lesnogo, ohotnich'ego i rybnogo hozyajstva. [Agriculture, forestry, hunting and fisheries statistics]. <http://available.at.stat.gov.kz>. – 2019. [in Russian]
- 4 Quarrie S.A., Stojanovic J., Pekic S. Improving drought resistance in small-grained cereals: a case study, progress and prospects, J. Plant Growth Regul, 29, 1-21 (1999).
- 5 Lee E.A., Tollenaar M. Physiological basis of successful breeding strategies for maize grain yield, Crop Sci, 47(3), 202-215 (2007).
- 6 Reynolds M., Drecker F., Trethowan R. Drought adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces // J. Exp. Bot., 58, 177-186 (2007).
- 7 Tardieu F. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress, Comp. Rend. Geosci., 337, 57-67 (2005).
- 8 He Y., Jones H.D., Chen S., Chen X.M., Wang D.W., Li K.X., Wang D.S., Xia L.Q. Agrobacterium-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency, Journal of experimental botany, 61, 1567-1581 (2010).
- 9 Raziuddin, Swati Z. A., Bakht J., Farhatullah U. N., Shafi M., Hassan G. In situ assessment of morpho-physiological response of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to drought, Pakistan Journal of Botany, 42(5), 3183-3195 (2010).
- 10 Chang Ch.M., Penna S., Bhagwat S.G. Callus induction and plant regeneration from different *Triticum* species, The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 6, 56-62 (2012).
- 11 Bajji M., Bertin P., Lutts S., Kinet J.M. Evaluation of drought resistance-related traits in durum wheat somaclonal lines selected in vitro, Anim. Reprod. Sci., 44, 27-35 (2004).
- 12 Munazir M. Qureshi R., Muhammad Ali G., Rashid U., Noor S., Mehmood K., Ali Sh., Arshad M. Primary callus induction, somatic embryogenesis and regeneration studies in selected elite wheat varieties from Pakistan // Pak. J. Bot., 42(6), 3957-3965 (2010).
- 13 Tadesse W., Inagaki M., Tawkaz S., Baum M., Van Ginkel M. Recent advances and application of doubled haploid wheat breeding, African Journal of Biotechnology, 11(89), 15484-15492 (2012).
- 14 Gutorova O.V., Apanasova N.V., Judakova O.I. Sozdanie geneticheski markirovannyh linij kukuruzy s nasleduemym i inducirovannym tipami partenogeneza [Creation of genetically marked maize lines with inherited and induced types of parthenogenesis], Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk [Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 18(2), 341-344 (2016). [in Russian]
- 15 Islam S. M. The effect of colchicine pretreatment on isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.), Australian Journal of Crop Science, 4(9), 660-665 (2010).
- 16 Hassan N. M., Serag M. S., El-Feky F. M. Changes in nitrogen content and protein profiles following in vitro selection of NaCl resistant mung bean and tomato. Acta Physiologiae Plantarum, 26 (2), 165 (2004).
- 17 Verslues P. E., Ober E. S., Sharp R. E. Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions, Plant Physiology, 116 (4), 1403-1412 (1998).
- 18 Landraces D. W. Evaluation of Interaction Between Genotype and Environments in Term of Germination and Seedling Growth in Durum Wheat Landraces Advances in Environmental Biology, 5 (4), 551-558 (2011).
- 19 Sammar Raza M.A., Saleem M. F., Khan I. H., Jamil M., Ijaz M., Khan M. A. Evaluating the drought stress tolerance efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences, 12, 41-46 (2012).
- 20 Soliman H. I. A. et al. Selection for drought tolerance genotypes in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under in vitro conditions // Middle East Journal of Scientific Research, 14 (1), 69-78 (2013).
- 21 Rai M. K. et al. Developing stress tolerant plants through in vitro selection - an overview of the recent progress, Environmental and Experimental Botany, 71 (1), 89-98 (2011).
- 22 Galovic V., Kotaranin Z., Dtnic S. In vitro assessment of wheat tolerance to drought, Genetika, 37 (2), 165-171 (2005).

- 23 Kalashnikova E.A., Kochieva E.Z., Mironova O.Ju. Praktikum po sel'skhozjajstvennoj biotekhnologii [Workshop on Agricultural Biotechnology]. – Moscow (KolosS, 144 (2006). [in Russian]
- 24 Sheveluha V.S., Kalashnikova E.A., Kochieva E.Z i dr. Sel'skhozjajstvennaya biotekhnologiya [Agricultural biotechnology] – M.: Vysshaya shkola, 710 (2008). [in Russian]
- 25 Kidrej T.A. Ustojchivost' S4 rastenij k zasoleniju sredy korneobitaniya [Resistance of C4 plants to the salinity of the root habitat] , Voprosy jekologii Volzhsko-Okskogo mezhdurech'ja: Mezhvuzovskij sbornik [Issues of ecology of the Volga-Oka interfluvium: Interuniversity collection], 80-83 (1999). [in Russian]
- 26 Babadoost M., Herbert T.T. Factor affecting infection of wheat seedlings by *Septoria nodorum* , *Phytopathology*, 74, 592-595 (1984).
- 27 Svabova L., Lebeda E. In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens, *Phytopathology*, 153, 52-64 (2005).
- 28 Cherkasova N.N., Zhuzhzhhalova T.P., Tkachenko O.V. Razrabotka optimal'nyh uslovij in vitro dlya povysheniya ustojchivosti regenerantov saharnoj svyokly k zasuhe [Development of optimal in vitro conditions to increase the drought resistance of sugar beet regenerants], *Sahar*, 9, 50-52 (2020). [in Russian]
- 29 Mohammad N.N., Erzhebaeva R.S., Daniyarova A.K. Mnogostupenchataya kletchnaya i tkanevaya selekciya soi na ustojchivost' k osmoticheskomu stressu s primeneniem PEG 6000 v usloviyah in vitro [Multistage cell and tissue selection of soybeans for resistance to osmotic stress using PEG 6000 in vitro] , *Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Respubliki Kazahstan. Seriya agrarnykh nauk* [Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Agrarian Science Series], 2, 199-204 (2017). [in Russian]
- 30 Shirokih I. G., Ogorodnikova S. YU., Dal'ke I. V., SHuplecova O. N. Biohimicheskaya i fiziologicheskaya ocenka rastenij regenerantov yachmenya, poluchennyh v selektivnyh sistemah [Biochemical and physiological evaluation of barley regenerated plants obtained in selective systems], *Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya* [Bulletin of the RAS. Biological series], 6, 703-709 (2011). [in Russian]
- 31 Kruglova N.N. Ocenka kollekcii genotipov yarovoj myagkoj pshenicy po ustojchivosti avtonomnyh zarodyshej in vitro na selektivnyh sredah, imitiruyushchih zasuhu [Assessment of the collection of spring bread wheat genotypes for the resistance of autonomous embryos in vitro on selective media simulating drought] , *Izvestiya Samarskogo NC RAN* [Izvestia of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 16(1), 2243-2245 (2012). [in Russian]
- 32 Soboleva G.V. Sravnitel'naya ocenka regenerantnyh linij goroha, poluchennyh metodami kletchnoj selekcii [Comparative evaluation of regenerated pea lines obtained by cell selection methods], *Nauchno-proizvodstvennyj zhurnal «Zernobobovye i krupyanye kul'tury* [Scientific and production journal «Legumes and cereals], 1(13), 20-25 (2015). [in Russian]
- 33 Pushkarev D. V. Ocenka sortov yarovoj myagkoj pshenicy na ekologicheskuyu plastichnost' i stabil'nost' urozhajnosti zerna v stepnoj zone Omskoj oblasti [Assessment of varieties of spring soft wheat for ecological plasticity and stability of grain yields in the steppe zone of the Omsk region]: dis. kand. s/h. nauk: 06.01.05 [dis. ... cand. agricultural. Sciences: 06.01.05], Omsk, 135 (2018). [in Russian]
- 34 Kovtun V.I. Ozernennost', massa zerna s kolosa i massa 1000 zeren v povyshenii urozhajnosti ozimoi myagkoj pshenicy [Grain content, grain weight per ear and 1000 grain weight in increasing the yield of winter soft wheat] , *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Orenburg State Agrarian University], 3, 27 (2015). [in Russian]
- 35 Huplecova O.N. Selektivnye sistemy in vitro dlya polucheniya genotipov yachmenya s kompleksnoj ustojchivost'yu k pochvennym stressovym faktoram [Selective in vitro systems for obtaining barley genotypes with complex resistance to soil stress factors]: avtoref. dis. na soisk. uchen. step. dokt. biol. Nauk [author. dis. for a job. learned. step. doct. biol. sciences]. – Moskva, 46 (2019). [in Russian]

Сведения об авторах

Шек Г.О. – автор для корреспонденции, к.с.-х.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

Есимсеитова А.К. – научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

Жаныбекова Ж.Т. – младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

Бабкенов А.Т. – к.с.-х.н., зав. отделом селекции яровой мягкой пшеницы, Научно-производственного центра зернового хозяйства им. А.И. Бараева, Шортанды, Казахстан.

Дюсембекова Д.А. – инженер лаборатории биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

Шелаева Т.В. – научный сотрудник отдела селекции яровой мягкой пшеницы, Научно-производственного центра зернового хозяйства им. А.И. Бараева, Шортанды, Казахстан.

Какимжанова А.А. – д.б.н., доцент, зав. лабораторией биотехнологии и селекции растений Национального центра биотехнологии, Кургальжинское шоссе, 13/5, Нур-Султан, Казахстан.

Shek G.O. – *corresponding author*, Candidate of Agricultural Sciences, A.I. Barayev research and production centre for grain farming, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan

Yessimseitova A.K. – Researcher of the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan

Zhanybekova Zh.T. – Junior Researcher of the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, National Center For Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan

Babkenov A.T. – Candidate of Agricultural Sciences, A.I. Barayev Research and Production Centre for Grain Farming, Shortandy, Kazakhstan

Dyussebekova D.A. – Engineer of the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan

Shelaeva T.V. – Researcher of Breeding Department, A.I. Barayev Research and Production Centre for Grain Farming, Shortandy, Kazakhstan

Kakimzhanova A.A. – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Nur-Sultan, Kazakhstan

В. Н. Шмаков¹
Ю. М. Константинов^{1,2}

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия
²Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия
(E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru, yukon@sifibr.irk.ru)

Культура клеток *in vitro* в изучении внутривидового генетического полиморфизма у *Pinus sibirica* Du Tour

Аннотация: Изучены характеристики каллусогенеза у деревьев сосны сибирской (*Pinus sibirica*) двух популяций: контрольной популяции и популяции элитных (плюсовых) деревьев. Для популяции плюсовых деревьев появление каллусной культуры на эксплантах почек и хвои происходило в более ранние сроки по сравнению с представителями контрольной популяции. Установлены различия в скорости роста каллусных культур исследуемых популяций для первых 2-х месяцев культивирования. Делается заключение, что метод культуры клеток *in vitro* может служить эффективным способом дифференциации генотипов *P. sibirica*.

Ключевые слова: *Pinus sibirica*, каллусная культура, дифференциация генотипов.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-69-73>

Кедр сибирский, или сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) является одним из основных лесообразующих и хозяйственно-ценных видов и имеет обширный природный ареал: вид распространен в Западной и Восточной Сибири, Северной Монголии, на Урале, Восточном Казахстане и [1, 2]. В пределах своего ареала кедр сибирский, являясь важным элементом формации темнохвойной тайги, образует как чистые насаждения (кедровники), так и смешанные - с пихтой сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и елью сибирской (*Picea obovata* Ledeb.). В настоящее время с учетом обширности природного ареала и значительной хозяйственной ценностью большое внимание уделяется генетико-селекционным исследованиям сосны кедровой. При этом организация лесовоспроизводства на традиционной основе решается путем создания постоянной лесосеменной базы как путем отбора плюсовых деревьев, так и формированием насаждений, характеризующихся значительным генотипическим разнообразием [3]. Согласно «Указаниям по лесному семеноводству в Российской Федерации» отобранные по фенотипическим признакам плюсовые растения подлежат испытанию по потомству [4]. Основные положения методики закладки испытательных культур предусматривают длительные и трудоемкие манипуляции. Многообещающим, с нашей точки зрения, подходом в подобных работах является использование метода культуры тканей и клеток растений, который позволяет проводить скрининг и детальные исследования генетических механизмов, обеспечивающих проявление хозяйственно-ценных признаков у представителей видов хвойных.

Целью настоящей работы было изучение возможности использования характеристик каллусогенеза у *P. sibirica* для дифференциации популяций, представляющих ценность в лесохозяйственной деятельности.

Материалы и методы исследования

Растительный материал. Материалом для данной работы послужили 7 деревьев сосны сибирской контрольной популяции (условно пронумерованные от 1 до 7) и 8 представителей популяции плюсовых деревьев, используемых для получения привоя и обозначенных (согласно учетным документам Слюдянского лесхоза Иркутской области), соответственно, как 265/29, 273/37, 55/19, 50/4, 48/2, 217/11, 267/31. Для каждого генотипа использована выборка из 6-ти эксплантов почек и 3-х эксплантов хвои.

Условия культивирования. Для инициации и субкультивирования каллусных культур *P. sibirica* использовали среду следующего состава: макро- и микросоли по Мурашиге и Скуту [5, 6] с добавлением 0,4 мг/л тиамина, 0,1 мг/л пиридоксина, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 100 мг/л инозитола, 200 мг/л гидролизата казеина и 20 г/л сахарозы. В качестве регуляторов роста использовали 2,4 D (1 мг/л) и БАП (0,1 мг/л). Экспланты и полученные из них каллусы культивировались в темноте при постоянной температуре 250С. Согласно предварительным экспериментам, наиболее приемлемым для получения каллусных культур растительным материалом являются хвоя и почки взрослых деревьев. В связи с этим для экспериментов брали ветви верхней трети кроны (примерно 3-4 см) с хвоей и почками. Перед стерилизацией хвою удаляли и стерилизовали отдельно от почек с участками несущих побегов. Процедура стерилизации включала следующие этапы:

1. Обработка материала раствором, содержащим 0,1% этилмеркури-тиосалицилата натрия (Sigma, США), 0,75% хлорамина и 0,3% детергента Twin-80 (Ferak, ФРГ) в течение 15 мин.
2. Выдерживание в течение 2 мин в 70% растворе этанола (с добавлением HCl: на 100 мл раствора этанола 1 капля концентрированной кислоты) [7].
3. Трехкратная отмывка в стерильной дистиллированной воде.

Для получения эксплантов стерильные почки с участками несущих побегов переносили на стерильные фильтры (в чашках Петри). После удаления покровных чешуй из средних частей почек вырезали поперечные диски толщиной 2-3 мм и помещали срезом на среду.

В качестве эксплантов из хвои (размером до 1 см) использовали только проксимальную часть хвои длиной до 1 см. На среду экспланты помещали горизонтально.

Частоту каллусообразования рассчитывали как отношение числа эксплантов с каллусом к общему числу эксплантов и выражали в % [8].

Скорость роста каллусов оценивали по формуле:

$$I = (m_i - m_0)/m_0,$$

где m_0 - исходная масса каллуса; m_i - масса каллуса к моменту пересадки.

Скорость роста определяли путем оценки изменений объема каллуса в течение первых двух месяцев культивирования.

Результаты

Исследуемые образцы кедрового сибирского (за исключением генотипов № 1 и 55/19, у которых отсутствовал каллусогенез на хвое) были способны к каллусообразованию на обоих типах эксплантов (хвоя и почки). Тем не менее, они существенно различались по времени начала образования каллуса. У плюсовых генотипов появление каллусной культуры отмечено на 6-10-е сутки (на почках) и на 15-18-е сутки (на хвое), тогда как у контрольных генотипов это происходило только на 7-12-е сутки (на почках) и 20-31-е сутки (на хвое) от начала инициации каллуса (рис. 1).

Рис. 1

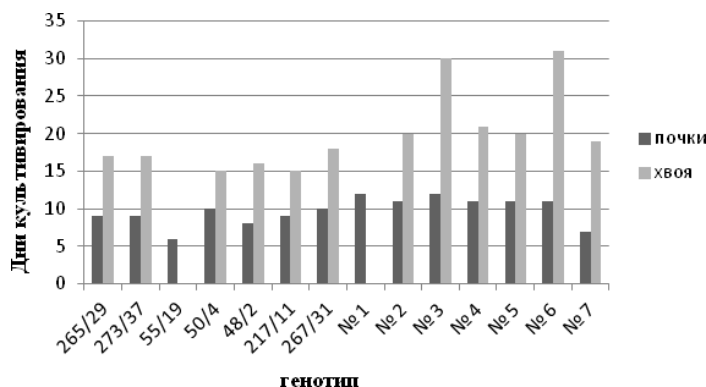


Рис. 1. Инициация каллусной культуры на эксплантах почек и хвои деревьев *Pinus sibirica* контрольной и плюсовой популяций.

Используемые обозначения: деревья контрольной популяции: №1, №2, №3, №4, №5, №6, №7; деревья плюсовой популяции: 265/29, 273/37, 55/19, 50/4, 48/2, 217/11, 267/31.

Частота каллусогенеза варьировала от 33 до 100 % при использовании эксплантов почек и от 0 до 67 % для эксплантов из хвои. При этом данный показатель был существенно выше у представителей популяции плюсовых деревьев (данные не представлены).

Значительно различалась также скорость роста каллусных культур в первые 2 месяца культивирования (рис. 2). Данный показатель оценивался путем еженедельного измерения объема каллусов, полученных на эксплантах почек. Установлено, что средняя скорость роста каллусов выше у представителей популяции плюсовых деревьев, начиная с 4-ой недели культивирования и сохранялась таковой вплоть до 7-ой недели культивирования.

Рис. 2

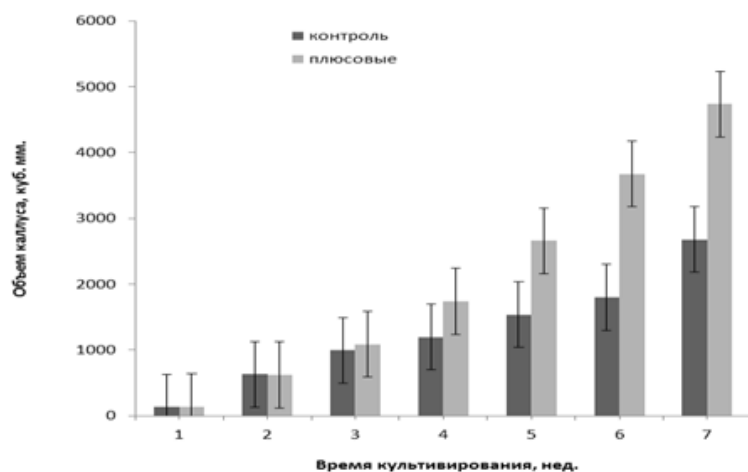


Рис. 2. Ростовой активность каллусных культур, полученных от деревьев *Pinus sibirica* плюсовой и контрольной популяций.

В качестве эксплантов для инициации каллусогенеза использовались почки. Приведены средние значения объема каллусной культуры, полученной от 7-8 генотипов каждой популяции + средне-арифметическое отклонение.

Обсуждение. Результаты настоящего исследования хорошо согласуются с имеющимися на сегодняшний день данными других исследователей, изучавших каллусогенез у различных видов высших растений. Так, способность к каллусообразованию, темп и тип роста культуры клеток зависят не только от состава среды, условий выращивания, физиологического состояния растений-доноров и типа экспланта *9-11+. Известно, что одинаковые по возрасту и тканевой принадлежности первичные экспланты, взятые от растений одного вида, выращиваемые в одинаковых условиях, отличаются в зависимости от исходного генотипа (сорта, линии) по частоте каллусообразования и интенсивности роста клеточной культуры *12 - 16+. Однако подобного рода исследования с использованием в качестве растительного объекта деревьев сосны сибирской (*Pinus sibirica*) ранее не проводились. В соответствии с полученными в данной работе результатами каллусогенез, полученный на основе эксплантов почек, позволяет четко дифференцировать популяции контрольных и плюсовых деревьев *Pinus sibirica*.

Заключение. В настоящей работе впервые установлена возможность использования каллусной культуры для дифференциации контрольной популяции и популяции плюсовых деревьев *P. sibirica*. Очевидно, что данный подход может найти свое применение в исследованиях лесной генетики, имеющих целью скрининг генотипов с хозяйственно-ценными признаками.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Список литературы

1. Рысин Л.П. Кедровые леса России / Л.П. Рысин. - М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2011. - 240 с.
2. Farjon A.A. Handbook of the World's Conifers / A. Farjon. - LeidenBoston: Brill, 2010. - Vol. II - 1111 p.
3. Малаховец П.М. Лесные культуры / П.М. Малаховец - Архангельск: ИПЦ САФУ, 2012. - 222 с.
4. Указания по лесному семеноводству в Российской Федерации. Под ред. Сергеева М.М. - М.: ВНИИЦ лесресурс, 2000. - 197 с.
5. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* - 1962. - V. 15. - P. 473-497.
6. Скрипаченко В. В. Выращивание *in vitro* тканей проростков трех видов сосны // *Физиология растений.* - 1982. - Т. 29. - № 1. - С. 205-211.
7. Bonga J.M. Adventitious shoot formation in cultures of immature female strobili of *Larix decidua* // *Physiol. Plant.* - 1984. - V.62. - P. 416-421.
8. Мишарина Е.А., Оводова Р.Г., Бушнева О.А., Оводов Ю.С. Каллусообразование *Silene vulgaris* (Moench) Garcke *in vitro* // *Растительные ресурсы.* - 1999. - № 2. - С. 88-95.
9. Wernicke W., Milkovits L. Development gradients in wheat leaves – Response of leaf segments in different genotypes cultured *in vitro* // *J. Plant Physiology.* - 1984. - V. 115. - №1. - P. 49-58.
10. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений 3. Каллусообразование *in vitro* // *Биополимеры и клетка.* - 1997. - Т.13. - №5. - С. 362-371.
11. Gonzalez J.M., Friero E., Jouve N. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. cultivars // *Plant Breeding.* - 2001. - V. 120. - P. 513-517.
12. Izumi I., Fumio K., Hyoji N. Diallel analysis of callus formation ability in anther culture of rice // *Jap. J. Genet.* - 1991. - V.41. - № 1. - P. 153-162.
13. Чуб В.В., Власова Т.А., Бутенко Р.Г. Каллусогенез и морфогенез в культуре генеративных органов весеннецветущих видов *Crocus L.* // *Физиология растений.* - 1994. - Т. 41. - №6. - С. 815-820.

14. Мигранова И.Г., Леонова И.Н., Салина Е.А., Чураев Р.Н., Мардамшин А.Г. Влияние генотипа и типа специализации тканей экспланта на способность каллусной ткани борца северного *Aconitum serpentrionale* Koelle к длительному культивированию *in vitro* // Биотехнология. - 2002. - № 2. - С. 37-41.
15. Schween G., Schwenkel H.-G. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula ssp.* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2003. - V. 72. - P. 53-61.
16. Константинов Ю.М., Шмаков В.Н. Межвидовая и внутривидовая дифференциация сибирских видов *Larix* с использованием метода культуры клеток *in vitro* // Сибирский экологический журнал. - 2005. - № 4. - С. 583-587.

В.Н. Шмаков¹, Ю.М. Константинов^{1,2}

¹Ресей Ғылым академиясының Сібір бөлімі,

Өсімдіктер физиологиясы және биохимиясы институты, Иркутск, Ресей

²Иркутск мемлекеттік университеті, Иркутск, Ресей

Pinus sibirica du Tour-да ішкі генетикалық полиморфизмді зерттеудегі *in vitro* жасуша мәдениеті

Аңдатпа. Сібір қарағайы (*Pinus sibirica*) ағаштарындағы каллусогенездің сипаттамалары екі популяцияда зерттелді: бақылау популяциясы және элиталық (артықшылығы бар) ағаштардың популяциясы. Ағаштардың популяциясына бүршіктер мен инелердің эксплантында каллус мәдениетінің пайда болуы бақылау популяциясының өкілдерімен салыстырғанда ертерек пайда болды. Өсірудің алғашқы 2 ай мерзімінде зерттелген популяциялардың каллус дақылдарының өсу қарқынында айырмашылықтар анықталды. *In vitro* жасуша мәдениеті әдісі *P. sibirica* генотиптерін саралаудың тиімді әдісі бола алады деген қорытынды жасалады.

Түйін сөздер: *Pinus sibirica*, каллустік мәдениет, дифференциация генотиптер дифференциясы.

V.N. Shmakov¹, Yu.M. Konstantinov^{1,2}

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

²*Irkutsk State University, Irkutsk, Russia*

(E-mail: shmakov@sifibr.irk.ru, yukon@sifibr.irk.ru)

Cell culture *in vitro* in studying of intraspecies genetic polymorphism in *Pinus sibirica* Du Tour

Abstract: The authors have studied characteristics of callusogenesis in Siberian pine (*Pinus sibirica*) trees of two populations: the control population and the population of elite (plus) trees. For the population of plus trees, the appearance of callus culture on the explants of buds and needles occurred earlier than in the control population. Differences in the growth rate of callus cultures of the studied populations have been established for the first 2 months of cultivation. It is concluded that the *in vitro* cell culture method can serve as an effective method for differentiating of *P. sibirica* genotypes.

Kew words: *Pinus sibirica*, callus culture, differentiation of genotypes.

Сведения об авторах:

Шмаков В.Н. – к.б.н., с.н.с. лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН Иркутск, Россия.

Константинов Ю.М. – автор для корреспонденции, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия.

V. N. Shmakov – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Plant Genetic Engineering, SIFIBR SB RAS, Irkutsk, Russia.

Yu. M. Konstantinov – corresponding author, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Plant Genetic Engineering of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia.

Редакторы: **Р.І. Берсімбай, Р.Т. Омаров**
Компьютерде беттеген: **Д. Елешева**

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің
Хабаршысы. Биологиялық ғылымдар сериясы.
- 4(133)/2020 - Нұр-Сұлтан: ЕҰУ. 74-б.
Шартты б.т. - 12,86.

Авторларға арналған нұсқаулықтар
публикациялық этика журнал сайтында енгізілген: <http://bulbio.enu.kz>

Мазмұнына типография жауап бермейді

Редакция мекен-жайы: 010008, Қазақстан Республикасы Нұр-Сұлтан қ.,
Сәтбаев көшес 13.

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті
Тел.: +7(71-72) 70-95-00(ішкі 31-428)

Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің баспасында басылды