

5. Nei M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases / M. Nei, W. Li // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, vol. 76. pp. 5269-5273.

6. Логинов, Ю. П. Многобиотипные сорта яровой пшеницы - резерв повышения урожайности и качества зерна в Тюменской области / Ю.П. Логинов, А.А. Казак, Л.И. Якубышина // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2018. – № 4(72). – С. 43-45. – EDN LZFKCL.

7. Любимова, А. В. Изменение биотипного состава сортов яровой тритикале в процессе возделывания / А. В. Любимова, Э. Т. Ярова, Д. И. Еремин // Вестник КрасГАУ. – 2018. – № 5(140). – С. 3-8. – EDN YQNUMP.

УДК 576.5

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ TARAXACUM КОК-SAGHYZ МЕТОДОМ ВАКУУМНОЙ ИНФИЛЬТРАЦИИ

Мартirosян Левон Юрьевич, аспирант ИБХФ им. Н.М. Эмануэля РАН, м.н.с. ФГБНУ ВНИИСБ, levon-agro@mail.ru

Мяжкова Евгения Романовна, студент института агробιοтехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, tyagkovaevg@yandex.ru

***Аннотация:** Была проведена агробактериальная трансформация с использованием метода вакуумной инфильтрации. В результате получена культура изолированных косматых корней и растения-регенеранты с фенотипом *hairy roots*. Затем был проведён сравнительный анализ на содержание каучука и инулина в полученных корнях.*

***Ключевые слова:** кок-сагыз, *hairy roots*, агробактериальная трансформация, натуральный каучук, инулин*

Натуральный каучук – стратегически важное сырьё, используемое для производства огромного количества изделий, в том числе первой необходимости [1]. Во многих случаях, например в авиа- и автомобилестроении, он не может быть полностью заменён синтетическими аналогами [7].

Несколько важных факторов делают актуальным поиск альтернативных каучуконосов. Среди них наиболее важным является опасность распространения грибковых заболеваний, угрожающих плантациям гевеи, основного экономически значимого источника натурального каучука, по всему миру [5]. В последние годы также выявлено увеличение случаев аллергии на каучук из гевеи, особенно среди работников здравоохранения – основной группы риска [2]. Таким образом, неудивительно, что исследования по поиску

альтернативных источников натурального каучука и увеличению в них его содержания интенсивно развиваются.

На территории нашей страны самым перспективным каучуконосом является кок-сагыз или русский одуванчик (*Taraxacum kok-saghyz*), корни которого могут являться источником не только натурального каучука, но и инулина [4]. Инулин является как ценным пищевым сырьём, так и резервным углеводом растений, распад которого обеспечивает синтез дополнительного ацетил-КоА, используемого при синтезе каучука [7].

В настоящее время исследователи ведут селекцию более продуктивных сортов и линий данной культуры, в том числе и с использованием методов генной инженерии. Одним из таких направлений является агробактериальная трансформация с целью получения растений с фенотипом *hairy roots*, корни которых, иначе называемые косматыми, активнее набирают биомассу, а также синтезируют и накапливают больше каучука, инулина и других вторичных метаболитов, по сравнению с нетрансформированными растениями [3].

Материалы и методы. Для агробактериальной трансформации был использован штамм *Rhizobium rhizogenes* 15834 с устойчивостью к канамицину. Бактериальная культура выращивалась 12 часов в среде YEB (*yeast extract broth*) (0,75% агара) при 23°C в темноте, на шейкере (90 rpm), далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 10000 rpm, затем осажденные бактерии ресуспендировали в среде QL с добавлением ацетосирингона (100 мкМ/л).

Для проведения трансформации полученную суспензию разливали в чашки Петри, куда помещали листовые пластинки кок-сагыза с предварительно нанесёнными на внешнюю сторону стерильным скальпелем небольшими механическими повреждениями. Чашки стерильно помещали в вакуумную систему, состоящую из вакуумной камеры (Микроанаэроостат МИ, 752) и вакуумного насоса (Millipore, XX5522050), и включали её при давлении -0,8 атм. на разную продолжительность – 1, 2,5 и 5 мин. Затем экспланты оставляли инкубироваться в агробактериальной суспензии на 1 час в темноте.

После листовые пластинки промакивали стерильной фильтровальной бумагой и переносили на чашки Петри с агаризованной средой QL с добавлением НУК (0,02 мг/л), ZR (2 мг/л), ГКЗ (2 мг/л), а также 1000 мг/л цефотаксима для элиминирования агробактерий и 100 мг/л канамицина в качестве селективного антибиотика. Чашки размещали на световых стеллажах с освещенностью 80 ммоль/м²сек, фотопериодом 16 часов/сут. и температурой 24°C. Каждые 7 суток культивирования экспланты переносили на среду того же состава, но с сокращенной на 20% дозой антибиотиков. На 35-й день культивирования экспланты пересаживали на среду без цефотаксима и канамицина.

Полученные на чашках Петри корни с начальной массой 0,5 г стерильно изолировали и переносили в колбы объёмом 100 мл с 20 мл жидкой среды QL без антибиотиков и регуляторов роста и культивировали при 24°C в темноте, на шейкере (90 rpm). По мере роста корни переносили в колбу большего объёма с

увеличенным содержанием питательной среды в ней. Таким образом, была получена культура изолированных косматых корней.

Для получения регенерантов корни массой 1 г стерильным пинцетом переносили из колб в чашки Петри на агаризованную безгормональную среду QL. Культивирование проводили при 24°C, фотопериоде 16 ч/сутки и освещенности 80 ммоль/м²сек с пересадками на среду того же состава раз в две недели. Через месяц полученные растения-регенеранты пересаживали в культивационные ёмкости с половинчатой средой QL без гормонов и также переносили на свежую среду того же состава каждые 2 недели.

Проведённый ПЦР-анализ на наличие генов *rolA* и *rolB* показал содержание данных генов, подтвердив успешную трансформацию.

Повторность всех экспериментов была трёхкратной. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Excel. Достоверность различий между вариантами оценивали по t-критерию Стьюдента при P_{0,95}. В таблице приведены средние арифметические значения со стандартной ошибкой.

Влияние времени вакуумирования на эффективность трансформации.

От продолжительности нахождения эксплантов при отрицательном давлении напрямую зависит успех трансформации – недостаточное приводит к отсутствию трансформации как таковой, а при избыточном может происходить угнетение и гибель экспланта. Эффективность трансформации рассчитывалась, как процентное соотношение эксплантов, давших каллус и/или регенеранты на момент пересадки эксплантов на среду без антибиотиков (табл. 1). Значения округлены до целых.

Таблица 1

Эффективность трансформации в зависимости от времени вакуумирования

Время вакуумирования, мин	Кол-во эксплантов, шт.	Кол-во эксплантов с признаками каллусо-и/или морфогенеза, шт.	Эффективность трансформации, %
1	30	13±1	43±4
2,5	30	26±2	86±5
5	30	21±1	70±3

Максимальное количество жизнеспособных эксплантов наблюдалось при вакуумировании в течение 2,5 мин.

Сравнение содержания каучука и инулина. Анализ на содержание каучука проводили с использованием аппарата Сокслета, а для анализа на содержание инулина применяли метод кислотного гидролиза. В качестве образцов были взяты изолированные корни из жидкой среды, культивируемые 70 суток и корни трёхмесячных растений с фенотипом *hairy roots*. В качестве контроля были использованы корни интактных растений. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Сравнение содержания каучука и инулина в корнях трансформированных и интактных растений

Анализируемый образец	Содержание каучука, %	Содержание инулина, %
Культура косматых корней	13,6±1,13	11,4±0,93
Корни растений с фенотипом <i>hairy roots</i>	11,7±1,3	12,9±1,18
Корни интактных растений	5,2±0,44	6,8±0,75

Результаты анализа показали более высокое содержание исследуемых веществ в культуре изолированных косматых корней. При этом трансформированные корни накапливают примерно в 2 раза больше каучука и инулина по сравнению с корнями интактных растений.

На 70 сутки культивирования изолированных корней наблюдается преобладание в содержании каучука над инулином. Это может свидетельствовать о том, что в корнях идут литические процессы, связанные с естественным старением культуры. Эти процессы отсутствуют у полноценных растений с листовой розеткой, т.к. они получают энергию за счёт фотосинтеза, и расход запасяющих углеводов у них идёт медленнее. Поэтому у корней, взятых у растений-регенерантов и интактных растений, содержание инулина преобладает над содержанием каучука.

Таким образом, можно сделать вывод о преимуществе культивирования растений с фенотипом *hairy roots*, в особенности культуры изолированных косматых корней.

Библиографический список

1. Америк А. Ю. и др. *Parthenium argentatum* A. Gray, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse Альтернативные источники натурального каучука: нужны ли они нам? // Сельскохозяйственная биология. 2022. Т. 57. № 1. С. 3-26.
2. Вдовина К. С. и др. Патологический механизм аллергии на латексные изделия // Научное обозрение. Педагогические науки. 2019. №. 5-3. С. 37-39.
3. Кулуев Б. Р. и др. Получение культур волосовидных корней кок-сагыза и анализ содержания в них натурального каучука // Биомика. 2020. Т. 12. №. 4. С. 449-454
4. Кутузова С. Н. и др. Кок-сагыз-*Taraxacum kok-saghyz* (Asteraceae, Compositae)-источник ценного растительного сырья для резиновой, пищевой и фармацевтической промышленности // Биосфера. 2015. Т. 7. №. 4. С. 392-402.
5. Cornish K. Alternative natural rubber crops: why should we care? // Technology & Innovation. 2017. Т. 18. №. 4. P. 244-255

6. Panara F. et al. Comparative transcriptomics between high and low rubber producing *Taraxacum kok-saghyz* R. plants //BMC genomics. 2018. Т. 19. №. 1. P. 1-14.

7. Salehi M. et al. Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of *Taraxacum kok-saghyz* //Industrial Crops and Products. 2021. Т. 170. P. 113667.

УДК 633.13

ВЛИЯНИЕ ХИМИЗМА И КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛЕЙ НА ПРОРАСТАНИЕ ОВСА ПОСЕВНОГО КРАСНОДАРСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

Менщикова Анастасия Александровна, младший научный сотрудник, лаборатория геномных исследований в растениеводстве, Федеральный исследовательский центр Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, menschikova.aa.b23@ati.gausz.ru

Сергеева Татьяна Евгеньевна, студент ФГБОУ ВО ГАУ Северного Зауралья, sergeeva.te.b23@ati.gausz.ru

Аннотация: В статье изучено влияние солей разной концентрации на прорастание овса посевного Краснодарской селекции. Было установлено, что сорта Десант и Ассоль устойчивы к хлоридному и сульфатному засолению. Сорт Петрович не имеет генетической устойчивости к обоим видам засоления. Содовому засолению смог противостоять только сорт Ассоль.

Ключевые слова: овёс посевной, генетическая устойчивость, солевой стресс, хлоридное и сульфатное засоление.

Засоление почв – это процесс накопления в корнеобитаемом слое сульфатов, хлоридов и карбонатов в количествах, превышающих норму. В результате происходит угнетение сельскохозяйственных культур, а вместе с этим снижение качества и количества урожая.

Существует первичное (природное) и вторичное засоление почв. При первичном засолении большое значение имеет климат (преобладание испарения над осадками), рельеф (обычно в понижениях рельефа), а также незначительная глубина залегания грунтовых вод. К засоленным почвам в России относятся солончаки, солончаковатые, солончаковые и глубокозасоленные почвы, солонцы, солонцеватые почвы, солоди и осолоделые почвы. В условиях глобального потепления с каждым годом увеличиваются площади засоленных земель. Это значит, что возникает необходимость поиска рациональных путей использования таких территорий, а также выведения новых сортов сельскохозяйственных растений, обладающих определенной генетической солеустойчивостью. Солеустойчивость представляет собой способность растений противостоять высоким концентрациям солей в почве, не снижая интенсивности течения основных физиологических процессов.