

Для получения GE-клонов фетальных фибробластов коровы была проведена электропорация эмбриональных фибробластов второго пассажа смесью плазмид, кодирующих Cas9 и гРНК, направленные на инактивацию генов PAEP и LOC100848610. Трансфецированные соматические клетки, содержащие плазмиду, кодирующую компоненты системы CRISPR/Cas9, были отделены от нетрансфецированных клеток как описано выше.

После сортировки общий пул клеток, экспрессирующих гены компонентов системы CRISPR/Cas9, растили в течение 2 суток, после чего клетки высевали индивидуально в 96-ти луночные планшеты и культивировали до получения колоний и формирования ими 80–90 % монослоя. Доля сформированных колоний составила 20.8 % от общего числа клеток (380/1824). Одна часть каждой колонии была заморожена для возможного дальнейшего использования, а другую часть использовали для выделения ДНК и анализа на наличие мутаций. С этой целью, проводили амплификацию фрагментов генов PAEP и LOC100848610, содержащих целевые области, с последующим секвенированием по Сэнгеру. В 4 из 380 полученных колоний индивидуальных фибробластов был установлен нокаут генов PAEP и LOC100848610, что соответствует эффективности геномного редактирования 1.05 %. Полученные клоны будут использованы для получения методом соматического клонирования GE-эмбрионов и потомства женского пола с отсутствием синтеза бета – лактоглобулина.

#### **Литература**

1. Salamone D., Baraño L., Santos C., et al. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow // Journal of Biotechnology. 2006. Vol. 124, N2. P. 469–472.
2. Wang J., Yang P., Tang B., et al. Expression and characterization of bioactive recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows // Journal of Dairy Science. 2008. Vol. 91, N12. P. 4466–4476.
3. Yu S., Luo J., Song Z., et al. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // Cell Research. 2011. 21. P. 1638–1640.
4. Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Багиров В.А. Геномное редактирование: современное состояние исследований и применение в животноводстве // Биотехнология. 2018. Т.34, № 3. С. 9–22.

***Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18–29–07089) и Министерства науки и высшего образования РФ***

УДК 573.6.086.83+577.2

### **ТЕСТ-РЕАКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ИЗВЕСТКОВАНИЕ КИСЛЫХ ПОЧВ**

***Е.А. Прищепенко, И.А. Дегтярева***

*Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН, Казань, Россия*

**Введение.** В последнее время мировым приоритетом является производство органической продукции. Значимой остается проблема плодородия почв, поскольку это напрямую связано с продовольственной безопасностью всех стран мира. Способность экосистемы почва – микроорганизмы – растение улавливать и накапливать солнечную энергию в виде фитомассы является плодородием почвенного покрова – основой гетеротрофной жизни в целом и человека в особенности. Благодаря неисчерпаемому метаболическому потенциалу микроорганизмы используются человеком для решения многих экологических проблем. По микробному генофонду почва – самый богатый природный субстрат, который выполняет функции биологического поглотителя, разрушителя, нейтрализатора различных загрязнений.

Одной из главных причин низкого плодородия почв и недостаточной эффективности удобрений является снижение значений водородного показателя [1]. Для развития многих растений оптимальное значение pH составляет от 5,5 до 7,5. Поэтому известкованию кислых почв принадлежит важное место в комплексе мер, направленных на повышение продуктивности земледелия, так как в Российской Федерации более 75 млн га кислых почв. Изучением агрохимических свойств различных типов почв в условиях агрогенеза занимаются многие исследователи [2–4].

Важное место в ряду показателей состояния любой почвы принадлежит состоянию ее микрофлоры, так как в зависимости от различных факторов в почве изменяются направленность и интенсивность биологических процессов. Известкование существенно влияет на состав, численность и активность почвенных микроорганизмов [1, 5–6], ведь для большинства агрономически значимых групп микроорганизмов оптимальные значения pH составляют от 6,0 до 7,0. Необходимо отметить, что микробный ценоз черноземных почв изучен не в полной мере.

В отделе агроэкологии и микробиологии Татарского НИИАХП ФИЦ КазНЦ РАН проводятся комплексные многолетние исследования по влиянию агрогенной нагрузки на агрохимические и биологические свойства серых лесных и черноземных почв Республики Татарстан (РТ).

Цель исследований – оценить влияние различных доз извести на биоразнообразие микробного комплекса выщелоченного чернозема при выращивании озимой ржи.

**Материалы и методы.** Известь вносили в количестве 0,5; 1,0 и 1,5 дозы, рассчитанной по гидролитической кислотности (8,8 т/га  $\text{CaCO}_3$  – 1 г.к., Нг.) на естественном и минеральном ( $\text{N}_{60} \text{P}_{60} \text{K}_{60}$ ) фонах. Полевой опыт в Предволжской зоне РТ был заложен по схеме: 1 – контроль (почва без растений); 2 – известь 0,5 г.к. (2,2 т/га под вспашку + 2,2 т/га под культивацию); 3 – известь 0,5 г.к. +  $\text{N}_{60} \text{P}_{60} \text{K}_{60}$  под предпосевную культивацию; 4 – известь 1,0 г.к. (4,4 т/га под вспашку + 4,4 т/га под культивацию); 5 – известь 1,0 г.к. +  $\text{N}_{60} \text{P}_{60} \text{K}_{60}$  под предпосевную культивацию; 5 – известь 1,5 г.к. (6,6 т/га под вспашку + 6,6 т/га под культивацию); 6 – известь 1,5 г.к. +  $\text{N}_{60} \text{P}_{60} \text{K}_{60}$  под предпосевную культивацию.

Агрохимическая характеристика выщелоченного чернозема тьжелосуглинистого состава следующая: pH 5,1, низким содержанием гумуса (5,59 %), подвижного фосфора и обменного калия (59 и 42 мг/кг почвы соответственно). Валовое содержание азота 0,38 %, гидролитическая кислотность и сумма поглощенных оснований 6,63 и 36,3 мг-экв/100 г. почвы. Культура – озимая рожь сорта Казанская 560.

Ризосферную почву отбирали из слоя 0–20 см в фазах молочной и восковой спелости озимой ржи. Из пяти точек отбора конкретного варианта составляли средний образец. Численность различных эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов определяли путем посева соответствующих разведений на селективные питательные среды по стандартным методикам [7, 8], респираторную активность – газохроматографически [9].

Особое внимание было направлено на изучение количественного и качественного составов азотфиксирующих бактерий и микроскопических грибов как индикаторных микроорганизмов. Все параметры измеряли не менее чем в трехкратной повторности, а статистическую обработку результатов осуществляли с помощью электронных таблиц Excel и программы Origin 4.1.

**Результаты.** Изучение влияния внесения извести на реакцию среды и микробный состав ризосферы озимой ржи показало, что послойная заделка мелиоранта из-за равномерного распределения его по всей глубине пахотного горизонта оказала более выраженное влияние на почвенную кислотность. Если в начале вегетационного сезона  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  был 5,1, то в фазе восковой спелости озимой ржи в зависимости от доз внесения извести получены разные значения pH: при внесении при 0,5 г.к. – 5,4; при 1,0 г.к. – 5,6; при 1,5 г.к. – 5,8.

Известкование способствовало изменению биоморфологической структуры микробного сообщества в пользу бактериальной составляющей. Вне зависимости от доз извести ризосферная зона характеризовалась более высокой численностью изученных групп микроорганизмов.

Вне зависимости от сроков отбора образцов ризосфера озимой ржи характеризовалась более высокой численностью азотфиксаторов. Информативным показателем являются ризосферный эффект (R/S), который для диазотрофов был более высоким в фазе восковой спелости – до 4,1.

Максимальную их численность ( $4,1 \times 10^6$  –  $6,2 \times 10^6$  КОЕ/г почвы) отмечали при дозе извести 1,0 г.к. Помимо этого, при этой дозе активно развивались представители рода *Azotobacter*, что отразилось на повышении урожайности озимой ржи. Положительный факт присутствия этих бактерий состоит в том, что при оптимальном развитии в почве азотобактер может быть антагонистом некоторых микромицетов и бактерий, вызывающих заболевания растений. Сопоставление изучаемых факторов свидетельствует, что доза извести 1,0 г.к. не только снижает кислотность почвенного раствора, но и оказывает активизирующее влияние на численность азотфиксирующих бактерий.

Существенных отличий по количеству денитрифицирующих микроорганизмов между вариантами не обнаружено. Наибольшее количество фосфатмобилизирующих микроорганизмов отмечали при дозе извести 1,0 г.к. Следовательно, известкование почвы, снижая кислотность, способствует увеличению агрономически значимых групп микроорганизмов.

Внесение извести в разных дозах привело к изменению не только рН, но и численности микроскопических грибов, заметное снижение количества которых отмечали в вариантах с мелиорантом в дозах 1,5 и 1,0 г.к. Анализ родовой структуры почвенных микромицетов показал, что представители рода *Trichoderma* преобладали при внесении извести в дозах 0,5 и 1,0 г.к., а в сильнокислых доминировали микромицеты рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Следует отметить доминирование триходермы, которая обладает антагонистической активностью к фитопатогенным грибам. Итак, на выщелоченном черноземе, который является высокобуферной почвой, отмечена корреляция между дозой извести, рН почвенной среды и численностью микромицетов.

Определение интенсивности выделения углекислоты почвенными микроорганизмами дает возможность оценить, насколько активно протекают окислительно-восстановительные процессы в почве. Проведенные исследования показывали, что известкование вызывает стимуляцию почвенного дыхания. Так, в фазе восковой спелости озимой ржи произошло существенное увеличение метаболической активности микроорганизмов, максимальная интенсивность которой отмечена при дозе извести 1,0 г.к. с удобрениями и без них, а также при дозе 0,5 г.к. + N<sub>90</sub> P<sub>60</sub> K<sub>60</sub>. В последнем варианте интенсивность дыхания увеличилась по сравнению с фазой молочной спелости в 22 раза.

Наиболее оптимальным считаем внесение извести в дозе 1,0 г.к., рассчитанной по гидролитической кислотности, как на фоне удобрений, так и без них. Именно в этих вариантах отмечали максимальную урожайность озимой ржи. В последнем варианте интенсивность дыхания увеличилась по сравнению с фазой молочной спелости более чем в 20 раз.

Максимальную урожайность озимой ржи отмечали в вариантах с внесением извести в дозе 1,0 г.к., рассчитанной по гидролитической кислотности, как на фоне удобрений, так и без них.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют, что основными микробиологическими индикаторами биогенности выщелоченного чернозема при известковании являются численность диазотрофных бактерий (при наличии рода *Azotobacter*) и микромицетов (и присутствие представителей рода *Trichoderma*), а также респираторная активность.

Знание направленности микробиологических процессов, протекающих в агроэкосистемах, необходимо для воспроизводства почвенного плодородия. Известкование выщелоченного чернозема является надежным средством увеличения его биогенности. Известь целесообразно заделывать в верхнюю половину пахотного слоя, испытывающего наибольшие антропогенные нагрузки.

Для применения технологий, эффективных для выщелоченного чернозема, на других типах почв необходимо проводить их апробацию с обязательным микробиологическим мониторингом.

#### Литература

1. Зинченко, М.К. Влияние известкования на численность эколого-трофических групп микроорганизмов в серой лесной почве / М.К. Зинченко, С.И. Зинченко // Успехи современного естествознания. – 2018. – № 7. – С. 43–47.
2. Ломако, Е.И. Почвы Татарии и воспроизводство их плодородия / Е.И. Ломако, Н.Б. Бакиров – Казань: Центр инновационных технологий, 2007. – 340 с.
3. Davlyatshin, I.D. Dynamics of Light-Gray Forest Soils Agrochemical Properties in the Conditions of Agrogenesis / I.D. Davlyatshin, L.G. Gaffarova // Earth and Environmental Science. – 2019. – V. 272. – P. 10–14.
4. Муртазина, С.Г. Свободные и связанные аминокислоты в почвах лесостепи Поволжья и их роль / С.Г. Муртазина, Л.Г. Гаффарова, М.Г. Муртазин, А.С. Ахрарова // Вестник Казанского ГАУ. – 2019. – № 4 (55). – С. 80–84.
5. Дегтярева, И.А. Комплексное применение средств химизации и биологическая активность серой лесной почвы / И.А. Дегтярева, Е.И. Ломако, Ф.К. Алимова // Агрохимический вестник. – 2003. – № 4. – С. 14–17.
6. Дегтярева, И.А. Влияние известковых и минеральных удобрений на биологическую активность выщелоченного чернозема / И.А. Дегтярева, Е.И. Ломако // Эффективность применения средств химизации и ресурсосберегающие технологии в сельском хозяйстве: Труды Татарского НИИ агрохимии и почвоведения. – Казань, 2005. – С. 189–192.
7. Колешко, О.И. Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум / О.И. Колешко – Минск: Высшая школа, 1981. – 175 с.
8. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. – 304 с.
9. Гарусов, А.В. Газохроматографический метод анализа в биомониторинге почвы / А.В. Гарусов, Ф.К. Алимова, Н.Г. Захарова – Казань: Изд-во КГУ, 1999. – С. 32–36.