

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Мартиросян Левон Юрьевич

**Биотехнологические аспекты получения новых форм каучуконоса
Taraxacum kok-saghyz L. E. Rodin и разработка условий их аэропонного
культивирования**

1.5.6 – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.х.н., профессор, член-корр. РАН
Варфоломеев Сергей Дмитриевич

Москва – 2025 г.

Оглавление

Введение.....	9
Актуальность темы исследования	10
Цель и задачи работы.....	11
Научная новизна и практическая значимость работы.....	12
Методология и методы исследования.....	13
Положения, выносимые на защиту	13
Степень достоверности и апробация работы	14
Личный вклад автора в проведенные исследования	15
Публикации.....	15
Структура и объем работы	15
Глава 1. Обзор литературы.....	16
1.1 Натуральный каучук, его применение, свойства и источники.....	16
1.1.1 Преимущества НК перед синтетическим каучуком	16
1.1.2 Проблема дефицита растительных источников НК	18
1.2 Объект исследования – <i>T. kok-saghyz</i> R.....	19
1.2.1 Физиологические особенности <i>T. kok-saghyz</i> R.	19
1.2.2 Биохимические особенности <i>T. kok-saghyz</i> R.....	25
1.2.2.1 Биосинтез НК.....	26
1.2.2.2 Биосинтез инулина и его ценность для промышленности	29
1.2.3 Влияние элементов минерального питания на рост и развитие <i>T. kok-saghyz</i> R.	31
1.2.4 Патогены <i>T. kok-saghyz</i> R.	33
1.2.5 Генетические особенности <i>T. kok-saghyz</i> R.	36
1.2.6 Селекция высокопродуктивных растений <i>T. kok-saghyz</i> R.	37

1.2.7. Полиплоидизация <i>T. kok-saghyz</i> R.	40
1.2.8. <i>T. kok-saghyz</i> R. в культуре <i>in vitro</i>	42
1.2.9. Генная инженерия <i>T. kok-saghyz</i> R.	42
1.3 Совершенствование методов выделения НК из <i>T. kok-saghyz</i> R.....	44
1.4 Влияние спектрального состава освещения на рост и развитие растений <i>T. kok-saghyz</i> R.	46
1.5 Влияние CO ₂ на рост и развитие растений <i>T. kok-saghyz</i> R.	49
1.6 Фитотронные технологии в научных исследованиях	50
1.7 Заключение по обзору литературы. Будущее <i>T. kok-saghyz</i> R.....	54
Глава 2. Материалы и методы.....	58
2.1 Растительный материал. Создание рабочей коллекции растений <i>T. kok-saghyz</i> R.	58
2.2 Разработка технологии фитотронного выращивания <i>T. kok-saghyz</i> R.....	60
2.2.1 Аэропонный фитотрон.....	60
2.2.2 Подбор питательного раствора для выращивания <i>T. kok-saghyz</i> R. в условиях аэропонного фитотрона	64
2.2.3 Разработка устройства для измерения массы растений в фитотроне в режиме реального времени	65
2.2.4 Исследование влияния спектрального состава света на физиолого-биохимические процессы и биосинтез каучука и инулина у растений <i>T. kok-saghyz</i> R. в условиях аэропонного фитотрона.....	66
2.2.5 Исследование влияния CO ₂ -газообмена на физиолого-биохимические процессы и биосинтез каучука и инулина у растений <i>T. kok-saghyz</i> R. в условиях аэропонного фитотрона	68

2.2.6 Исследование влияния переменной флуоресценции на физиолого-биохимические процессы и биосинтез каучука и инулина у растений <i>T. kok-saghyz</i> R. в условиях аэропонного фитотрона.....	69
2.2.7 Количественный анализ глюкозы и сахарозы в листьях <i>T. kok-saghyz</i> R.	69
2.3. Оздоровление растений <i>T. kok-saghyz</i> R. от фитопатогенов.....	70
2.3.1. Выделение и идентификация патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.	71
2.3.1.1 Выделение бактериальных патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.	72
2.3.1.2 Идентификация бактериальных патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.	73
2.3.1.2.1 Биохимическая идентификация бактериальных патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.	74
2.3.1.2.2 Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.	75
2.3.1.3 Подтверждение патогенности выделенных бактерий способом искусственного заражения	77
2.3.2 Способы оздоровления растений <i>T. kok-saghyz</i> R. от идентифицированных патогенов.....	78
2.3.2.1 Подбор антибиотиков и исследование их активности в отношении выделенных патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.	78
2.3.2.2 Получение бактериофагов против выделенных патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.	80
2.3.2.3 Анализ оздоровленных растений <i>T. kok-saghyz</i> R. на наличие идентифицированных патогенов.....	81
2.4 Введение <i>T. kok-saghyz</i> R. в культуру <i>in vitro</i> и дальнейшее микрклональное размножение.....	81
2.4.1 Введение <i>T. kok-saghyz</i> R. в культуру <i>in vitro</i>	81

2.4.2	Получение каллуса и регенерантов <i>T. kok-saghyz</i> R.	82
2.4.3	Исследование влияния антиоксидантного свойства глутатиона на физиологическое состояние каллусных масс <i>T. kok-saghyz</i> R. в культуре <i>in vitro</i>	83
2.5	Агробактериальная трансформация <i>T. kok-saghyz</i> R.	84
2.5.1	Получение культуры « <i>hairy roots</i> » <i>T. kok-saghyz</i> R.	84
2.5.2	Изучение ростовых характеристик « <i>hairy roots</i> » <i>T. kok-saghyz</i> R. и содержания в них каучука и инулина	87
2.5.3	Получение регенерантов из « <i>hairy roots</i> » <i>T. kok-saghyz</i> R.	87
2.6	Полиплоидизация <i>T. kok-saghyz</i> R.	88
2.6.1	Полиплоидизация семян <i>T. kok-saghyz</i> R.	88
2.6.2	Полиплоидизация каллусных масс <i>T. kok-saghyz</i> R.	88
2.6.3	Определение пloidности <i>T. kok-saghyz</i> R.	88
2.6.3.1	Метод проточной цитометрии	89
2.6.3.2	Метод подсчета хромосом на давленных препаратах	89
2.6.3.3	Метод подсчета хлоропластов в замыкающих клетках устьиц	91
2.7	Метод периодической срезки корней <i>T. kok-saghyz</i> R.	91
2.8	Выделение инулина и натурального каучука из корней <i>T. kok-saghyz</i> R. .	92
2.8.1	Выделение инулина методом кислотного гидролиза	92
2.8.2	Выделение и количественный анализ НК <i>T. kok-saghyz</i> R.	94
2.8.2.1	Гравиметрический метод выделения НК	94
2.8.2.2	Разработка метода количественного определения содержания НК в растениях <i>T. kok-saghyz</i> R. с помощью ЭПР спиновое зонда	95
2.8.2.3	Исследования образцов НК, выделенных из корней <i>T. kok-saghyz</i> R.	96

2.8.2.3.1 Исследования образцов НК, выделенных из корней <i>T. kok-saghyz</i> R. методом ИК-спектроскопии.....	97
2.8.2.3.2 Определение молекулярной массы НК, выделенного из корней <i>T. kok-saghyz</i> R. методом гель-проникающей хроматографии	97
2.9 Статистическая обработка данных	98
Глава 3. Результаты и обсуждение	99
3.1 Подбор линии <i>T. kok-saghyz</i> R. для дальнейших исследований.....	99
3.2 Исследование влияния регуляторов роста на каллусогенез и морфогенез <i>T. kok-saghyz</i> R. <i>in vitro</i>	100
3.2.1 Исследование влияния регуляторов роста на каллусогенез <i>T. kok-saghyz</i> R. <i>in vitro</i>	100
3.2.2 Исследование влияния регуляторов роста на морфогенез <i>T. kok-saghyz</i> R. <i>in vitro</i>	102
3.2.3 Влияние антиоксидантного свойства глутатиона на физиологическое состояние каллусных масс <i>T. kok-saghyz</i> R. в культуре <i>in vitro</i>	105
3.3 Оздоровление растений <i>T. kok-saghyz</i> R.	109
3.3.1 Идентификация бактериальных патогенов <i>T. kok-saghyz</i> R.....	110
3.3.2 <i>P. putida</i> и <i>R. terrigena</i> как фитопатогены	117
3.3.2.1 Ранние исследования взаимодействия <i>P. putida</i> и <i>R. terrigena</i> с растениями.....	117
3.3.2.2 Влияние условий окружающей среды на развитие патогенеза у <i>T. kok-saghyz</i> R.	119
3.3.3 Оздоровление растений <i>T. kok-saghyz</i> R. с помощью антибиотиков....	126
3.3.4 Оздоровление растений <i>T. kok-saghyz</i> R. с помощью бактериофагов ..	131
3.4 Исследование отдельных параметров минерального питания <i>T. kok-saghyz</i> R. при выращивании в аэропонном фитотроне.....	134

3.5 Исследование влияния различных участков спектра видимого света на рост и развитие растений <i>T. kok-saghyz</i> R. в аэропонном фитотроне.....	143
3.5.1 Исследование активности фотосинтетического аппарата ряда различных коллекционных образцов <i>T. kok-saghyz</i> R.....	143
3.5.2 Исследование активности фотосинтетического аппарата растений <i>T. kok-saghyz</i> R. в зависимости от спектрального состава и интенсивности облучения	149
3.6 Агробактериальная трансформация <i>T. kok-saghyz</i> R. с целью получения культуры « <i>hairy roots</i> »	157
3.6.1 Получение культуры изолированных корней « <i>hairy roots</i> » <i>T. kok-saghyz</i> R.	158
3.6.2 Ростовые характеристики культуры корней « <i>hairy roots</i> » <i>T. kok-saghyz</i> R. и содержание в них каучука и инулина	162
3.6.3 Получение композитных растений <i>T. kok-saghyz</i> R. с фенотипом « <i>hairy roots</i> ».....	164
3.7 Оценка уровня пloidности и морфологических параметров растений <i>T. kok-saghyz</i> R. полученных в процессе полиплоидизации	167
3.7.1 Оценка жизнеспособности и эффективности полиплоидизации <i>T. kok-saghyz</i> R. в зависимости от концентрации и экспозиции колхицинирования	167
3.7.2 Оценка пloidности растений <i>T. kok-saghyz</i> R. методом проточной цитометрии.....	170
3.7.3 Кариологический анализ растений <i>T. kok-saghyz</i> R. полученных в процессе полиплоидизации.....	171
3.7.4 Показатели абаксимального эпидермиса у растений <i>T. kok-saghyz</i> R. полученных в процессе полиплоидизации	174

3.7.5 Морфологические характеристики листьев и корней растений <i>T. kok-saghyz</i> R., полученных в процессе полиплоидизации	176
3.8 Периодическая срезка корней <i>T. kok-saghyz</i> R. при выращивании в аэропонном фитотроне, как метод увеличения продуктивности.....	181
3.9 Исследование качественного состава каучука, полученного из растений <i>T. kok-saghyz</i> R.	185
3.9.1 Гель-проникающая хроматография каучука, выделенного из корней <i>T. kok-saghyz</i> R.	185
3.9.2 Исследование качественного состава каучука из корней <i>T. kok-saghyz</i> R. методом ИК-спектроскопии.....	189
Заключение	195
Выводы	198
Список используемых сокращений.....	200
Список используемых терминов	202
Список литературы	204
Приложение	249

Введение

Растения-продуценты ценных с точки зрения промышленности веществ являются актуальными объектами биотехнологии – разрабатываются эффективные методики культивирования растений, исследуются пути увеличения биосинтеза и накопления растительных метаболитов, оптимизируются процессы их выделения и очистки. Разработка новых методов и технологических приемов для данных задач, а также опыт их использования остаются перспективными направлениями современной биотехнологии растений.

Одна из важных задач в этом контексте, как в фундаментальном, так и в прикладном, – исследование процессов биосинтеза каучука в *Taraxacum kok-saghyz* L. E. Rodin. (далее *T. kok-saghyz* R. или кок-сагыз). Этот вид одуванчика представляется наиболее подходящим альтернативным источником натурального каучука, незаменимого сырья для производства многочисленных резинотехнических изделий.

В настоящее время единственным индустриально значимым источником натурального каучука является гевея бразильская (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Mull. Arg.). Разнообразные грибковые патогены, вызывающие массовые заболевания, приводят к значительным экономическим потерям на каучуковых плантациях, угрожая мировым поставкам каучука. В результате гибели от грибных болезней плантаций гевеи на Южно-Американском континенте значительно возросла опасность дефицита производства натурального каучука (Ainusyifa et al., 2024). Наиболее перспективной альтернативой гевее сегодня, по общему мнению, считается кок-сагыз, в частности, он является наиболее подходящим для выращивания на территории Российской Федерации.

Однако, прежде чем кок-сагыз станет коммерчески жизнеспособной и конкурентоспособной культурой каучуконоса, требуется дальнейшее

улучшение его урожайности и агрономической пригодности за счет биотехнологической, молекулярно-генетической и традиционной селекционной работы. Основными задачами улучшения характеристик этого потенциального альтернативного источника натурального каучука являются ускорение роста и развития растений, формирование большей биомассы корней, увеличение содержания каучука, селекция форм, устойчивых к неблагоприятным условиям среды. Решение поставленных задач требует стандартизации условий выращивания кок-сагыза с применением фитотронной технологии, способов стимуляции роста и развития растения, оптимизации процесса экстрагирования из его корней каучука и сопутствующего фруктана – инулина и в перспективе других, не менее ценных вторичных метаболитов, проведения биофизических и биохимических исследований.

Для решения поставленных задач использована базовая информация и новые, защищенные патентами собственные разработки аэропонных фитотронов и устройств учета роста растений, разработки методов выращивания в контролируемых условиях, приемов стимуляции роста, способов экстрагирования каучука из корней кок-сагыза. Новые методы расширяют выбор возможностей для исследований и практического приложения полученных результатов.

Актуальность темы исследования

Натуральный каучук (НК) – востребованный и ценный биополимер, используемый для производства около 50 000 резиновых изделий, включая авиационные и автомобильные шины, медицинские изделия. Одной из причин устойчивого роста спроса на НК является отсутствие синтетического каучука с физическими свойствами, сопоставимыми со свойствами НК, несмотря на все успехи в разработке полимеров. В настоящее время производство НК полностью ориентировано на гевею бразильскую (*H. brasiliensis*). Растущий спрос на НК, а также реальные проблемы, связанные с уязвимостью *H.*

brasiliensis к фитопатогенам, объясняют повышенный интерес исследователей и компаний-производителей изделий из НК к альтернативным культурам, биосинтезирующим НК.

Для науки и промышленности огромный интерес представляет каучуконосное растение кок-сагыз. Кок-сагыз – травянистое растение, произрастающее в Казахстане и Китае, и его каучук очень похож по качеству на каучук *H. brasiliensis*. Кок-сагыз можно культивировать плантационным способом, прямым посевом семян или посадкой адаптированными саженцами. Кок-сагыз широко приспособлен к умеренным регионам, может быть выращен и как однолетняя культура, и как многолетник.

Чтобы кок-сагыз стал промышленно возделываемой каучуконосной культурой, требуется улучшение как продукционных, так и агрономических свойств растения. С целью увеличения содержания каучука, формирования большей биомассы корней, проявления устойчивости к фитопатогенам проводятся молекулярно-генетические, биотехнологические исследования, а также традиционная селекционная работа. Для изучения факторов, лежащих в основе синтеза и накопления НК у видов *Taraxacum*, необходима стандартизация условий выращивания растений с применением фитотронных технологий, использование методов ускорения роста и развития растений, методов оздоровления от фитопатогенов и разработка способов защиты. Также предусмотрены молекулярно-биологические исследования, селекция высокопродуктивных форм, далее интенсификация их размножения. Данные работы предусматривают постоянную оценку продуктивных качеств растений на содержание НК и ценного сопутствующего фруктана – инулина, с применением биофизических и биотехнологических методов.

Цель и задачи работы

Цель работы: получение высокопродуктивных форм растений *T. kok-saghyz* R., установление факторов (на основе изучения физиологических

механизмов), влияющих на биосинтез каучука и инулина, в условиях фитотронного культивирования методом аэропоники.

Основные задачи.

1. Создать рабочую коллекцию растений *T. kok-saghyz* R. *in vitro*, провести оздоровление растений от фитопатогенов, получить и размножить генетически однородный материал.
2. Исследовать условия выращивания растений *T. kok-saghyz* R. в аэропонном фитотроне. Провести подбор параметров минерального питания, исследовать влияние различных участков спектра видимого света на активность фотосинтетического аппарата и на содержание каучука и инулина в корнях растений.
3. Получить культуру трансформированных корней *T. kok-saghyz* R. с фенотипом «*hairy roots*». Получить композитные растения с фенотипом «*hairy roots*» из культуры корней. Изучить их продуктивность по каучуку и инулину.
4. Получить полиплоидные растения *T. kok-saghyz* R. с последующим определением содержания каучука и инулина.

Научная новизна и практическая значимость работы

1. Показано, что оздоровленные растения *T. kok-saghyz* R., как продуцент НК, можно выращивать в контролируемых условиях фитотрона методом аэропоники. Выход НК можно повысить за счет использования трансформированных («*hairy roots*») и полиплоидных растений, а также оптимизации условий выращивания.
2. Разработаны и запатентованы: исследовательский аэропонный фитотрон, позволяющий одновременно контролировать основные факторы роста и развития растений; способ периодический срезки корней растений *T. kok-saghyz* R. культивируемых в аэропонном фитотроне, увеличивающий общую биомассу корней и суммарный выход НК; устройство для непрерывного взвешивания растений в течение вегетации; экспресс-метод

ЭПР спинового зонда, позволяющий определить содержание НК в образцах сухих корней микрорастений *T. kok-saghyz* R. без экстракции растворителями.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составил системный подход с применением методов биотехнологии, генетической инженерии, физиологии и биохимии растений, статистики, а также анализ данных отечественной и зарубежной литературы. При проведении исследования и изложении материала были применены теоретический и методологический анализ литературных источников, экспериментальные методы исследования и сравнительный анализ полученных данных. Используемые методы и статистическая обработка экспериментального материала позволили обеспечить объективность полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Создана коллекция растений *T. kok-saghyz* R. *in vitro*, оздоровленных от патогенов, получен и размножен генетически однородный материал.
2. Для защиты растений *T. kok-saghyz* R. от бактериальных патогенов выделены чистые культуры бактерий и определена их видовая принадлежность, получены и применены бактериофаги.
3. Разработан, изготовлен и запатентован исследовательский аэропонный фитотрон.
4. Создан количественный метод анализа НК в микрообразцах корней методом ЭПР-спектроскопии спиновых зондов, что позволяет с высокой точностью определять содержание каучука.
5. Разработано, изготовлено и запатентовано устройство для непрерывного взвешивания растений *T. kok-saghyz* R. в процессе вегетации в условиях аэропонного фитотрона.

6. В условиях фитотронного культивирования исследовано влияние различных участков спектра видимого света, влияние элементов минерального питания и содержания CO₂ на рост, развитие и на биосинтез НК и инулина растений *T. kok-saghyz* R.

7. Получена культура корней *T. kok-saghyz* R. с фенотипом «*hairy roots*» и композитные растения с фенотипом «*hairy roots*».

8. Получены полиплоидные формы *T. kok-saghyz* R.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных в ходе исследования результатов подтверждена применением современных методов биотехнологии, микробиологии, биохимии и физиологии растений, а также объемом проведенных экспериментальных работ. Для интерпретации и анализа полученных результатов привлечены современные данные литературы (354 источника). Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов.

Материалы диссертации были представлены на XIII международной конференции «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» Сочи-Москва, 2018 г; XXI Всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», Москва, 2021 г.; VIII Международной молодежной научной конференции ФТИ-2021, Екатеринбург, 2021 г.; конференции «Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий», Нижний Новгород, 2022 г.; IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков, Новосибирск, 2022 г.; конференции «Неделя студенческой науки», Москва, 2022 г.; Международной научной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 135-

летию со дня рождения А.Н. Костякова, Москва, 2022 г.; XXII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 2022 г.; XIII Международной конференции ученых-биологов Симбиоз-Россия, Пермь, 2022 г.; Всероссийской студенческой научно-практической конференции «Эколого-физиологические аспекты формирования агро- и биоценозов», посвященной памяти профессора М.Н. Кондратьева, Москва, 2022 г.; XXII Международной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», Москва, 2022 г.

Личный вклад автора в проведенные исследования

Автором самостоятельно изучена отечественная и зарубежная литература по теме диссертации и лично написана рукопись данной работы. Автор непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикациям по диссертационной теме и их написании. Экспериментальная работа выполнена автором самостоятельно.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-316-90032.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, из них 2 статьи входит в международную базу цитирования научных работ Scopus, 1 в базу Web of Science. Новые разработки автора защищены 4 патентами.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 252 страницах, содержит 30 таблиц и 56 рисунков. Включает в себя введение, обзор литературы (глава 1), описание методов исследования (глава 2), результаты и их обсуждение (глава 3), заключение, выводы и список литературы (354 источника).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Натуральный каучук, его применение, свойства и источники

НК (цис-1,4-полиизопрен) – стратегически важный и ценный биополимер, востребованный для изготовления более 50 000 видов резиновых изделий (Mooibroek, Cornish, 2000). В современной промышленности его используют в производстве автомобильных и авиационных шин, на его основе производят клеи, лакокрасочные материалы, полимерные покрытия, уплотнители, промышленные транспортеры и ленты, разнообразные строительные материалы и медицинские изделия, а также многое другое (Кутузова и др., 2015).

Источником получения НК является млечный сок каучуконосных растений – латекс. Латекс представляет собой водную эмульсию, содержащуюся в специализированных клетках – латиферах (Priyadarshan, Priyadarshan, 2017). В них молекулы НК синтезируются и накапливаются в так называемых каучуковых частицах (Ramos et al., 2019). По составу свежий латекс содержит около 60% воды, 35% цис-1,4-полиизопрена и 5% неизопреновых молекул (Америк и др., 2022).

1.1.1. Преимущества НК перед синтетическим каучуком

В XX веке повышенный спрос на полимерные вещества, с одной стороны, и дефицит растительных источников – с другой, привел к организации целых отраслей, задействованных на производстве синтетического каучука (СК), получаемого полимеризацией бутадиена, хлоропрена и изопрена с другими компонентами (Thorn, Robinson, 2018). Несмотря на то, что процесс получения НК более дорогостоящий и трудоемкий, современная промышленность не может полностью заменить его искусственным аналогом, что было подтверждено на заседании Европейской комиссии 13 сентября 2017 года (Борейко и др., 2019). НК обладает

уникальными свойствами, такими как износостойкость, высокая когезионная прочность, ударопрочность, эффективное рассеивание тепла, эластичность и устойчивость по отношению к изменениям температуры (Salehi et al., 2021).

В таблице 1.1 сравниваются некоторые свойства НК и нескольких видов СК как материалов для практического применения.

Таблица 1.1 – Сравнение некоторых свойств каучуков натурального и синтетического происхождения (Рахманкулов и др., 2006)

Каучук	Когезионная прочность, МПа	Клейкость	Прочность на растяжение при 100 °С, МПа
Натуральный	1,27	100	20,00
Хлоропреновый	0,17	90	8,28
Изопреновый	0,34	90	10,35
Бутадиеновый	0,17	95	9,65
Бутадиенстирольный	0,34	85	10,35
Этиленпропиленовый	0,27	90	10,35
Бутилкаучук	0,27	95	10,35

Как видно из таблицы 1.1, НК существенно превышает синтетические по когезионной прочности и прочности на растяжение. Представленные в таблице 1.1 свойства СК и НК наглядно показывают различия в их характеристиках и обосновывают обязательное добавление НК к синтетическому с целью качественного улучшения его свойств для практического использования.

Главной областью применения НК является шинная промышленность (Насыров и др., 2020). Большинство производителей шин изготавливает их из смеси СК и НК (Setianto et al., 2023). Благодаря уникальным свойствам последнего его широко применяют для изготовления крупногабаритных шин, способных выдерживать нагрузки до 75 тонн (Чалдаева, Хусаинов, 2013). Отличительным свойством натуральной резины также является то, что она

более стабильна при перепадах температур, что особенно важно при производстве авиационных, а также зимних шин (Rodgers, Waddell, 2005).

Стоит также отметить, что синтетические каучуки представляют собой полимеры алкенов или диенов, полученных из нефти, невозобновляемого ресурса, в отличие от растительного сырья (Hirsch et al., 2007).

1.1.2. Проблема дефицита растительных источников НК

В настоящее время основным экономически значимым источником промышленного получения НК является *H. brasiliensis* (Америк и др., 2022). Это древесное растение, и его выращивание является длительным процессом (Nair, Nair, 2021). Сбор латекса начинают на 5–7 год после посадки, максимальная же продуктивность дерева достигается к 20 годам. Для получения латекса деревья используют всего 8 месяцев в году – с января до конца августа. Сбор в оставшиеся 4 месяца приводит к гибели растений, поскольку в этот период происходит листопад (Дыкман и др., 2011; Жигунов, Нгуен, 2017). Кроме того, гевея предъявляет строгие климатические требования, ограничивающие размещение плантаций конкретными тропическими регионами (Priyadarshan, Clément-Demange, 2004).

Но самой главной проблемой выращивания данного каучуконоса является угроза массовой гибели плантаций из-за поражения различными грибами-аскомицетами, к примеру, *Rigidoporus microporus*, вызывающим белую корневую гниль, и *Phanerochaete salmonicolor*, являющимся возбудителем «розовой болезни» гевеи (Lieberei, 2012). Наиболее серьезное и быстро распространяющееся заболевание, поражающее каучуковое дерево – южноамериканский фитофтороз (South American leaf blight (SALB)), вызываемый фитопатогенным грибом *Microcyclus ulei* (Beilen, Poirier, 2007; Guyot, Guen, 2021). Эта болезнь представляет большую угрозу для крупных районов производства каучука в Западной Африке и Юго-Восточной Азии, так как методы борьбы с ней являются дорогостоящими и снижают экономическую ценность культуры (Кулуев и др., 2015). Важно также

отметить, что при возделывании гевеи используются только несколько сортов, являющихся фактически близкородственными клонами (Liu et al., 2020). Таким образом, плантации состоят из генетически однородных растений, имеющих одинаково низкую степень устойчивости к описанным заболеваниям, что подвергает их большой опасности (Priyadarshan, Clément-Demange, 2004). Так, в Бразилии южноамериканский фитофтороз привел к почти полному прекращению производства НК, сделав страну, некогда бывшую лидером по экспорту этого сырья, зависимой от импорта (Cornish, 2017). На сегодняшний день на долю Латинской Америки приходится всего 3% мирового производства НК по сравнению со странами Юго-Восточной Азии, такими как Таиланд, Индонезия и Малайзия, которые вместе производят 92% НК в мире (Hurtado et al., 2015). Установлено, что для получения генотипов гевеи, устойчивых к SALB, и замены используемых сортов потребуется как минимум 25 лет (Guyot, Guen, 2018). Таким образом, глобальная зависимость от этого каучуконоса является рискованной.

По причинам, указанным выше, был начат поиск альтернативных источников НК из других видов растений. Только на территории бывшего СССР в 30-е годы 20-го века были исследованы более 1 048 видов растений, составляющих 316 родов, входящих в 95 семейств. Из 1 048 видов растений 609 оказались содержащими каучук или близкие к нему каучукоподобные вещества (Лапин, 1935). В настоящее время известно более 2500 видов каучуконосов (Cherian et al., 2019; Америк и др., 2021), из которых самым перспективным для выращивания на территории России, является кок-сагыз (*T. kok-saghyz* L. E. Rodin) (Кутузова и др., 2015; Кулуев и др., 2019).

1.2. Объект исследования – *T. kok-saghyz* R.

1.2.1. Физиологические особенности *T. kok-saghyz* R.

Кок-сагыз (*T. kok-saghyz* R.) – многолетнее травянистое растение рода одуванчик (*Taraxacum*). Внешне мало отличается от одуванчика

обыкновенного (*T. officinale*) и очень сходно с разновидностью одуванчика *T. brevicorniculatum* (Рисунок 1.1) (Cornish et al., 2016).

Листья кок-сагыза имеют блестящую поверхность и в отличие от *T. officinale* лишены мелкой зубчатости краев (Гаврилова и др., 2017).

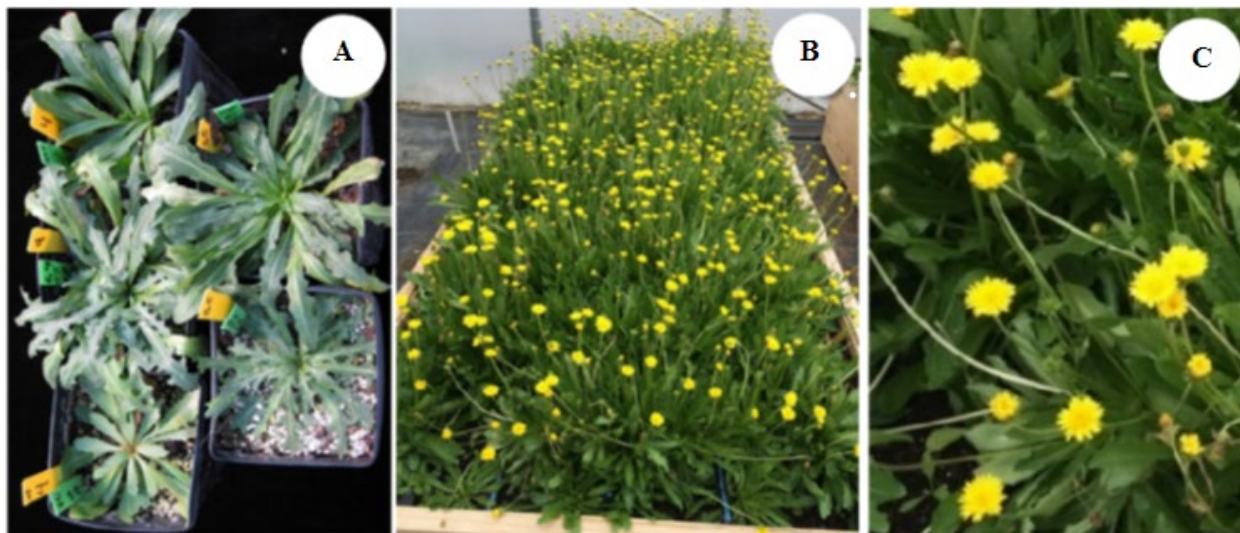


Рисунок 1.1 – Растения кок-сагыза: А) листовые розетки кок-сагыза; В) полянка с растениями; С) цветки кок-сагыза (Cornish et al., 2016)

Корень растений кок-сагыза или стержневой, глубоко проникающий в почву, либо ветвистый, или представляющий из себя розетку из корней, покрытых черной или бурой корой. Отмечается, что при вегетативном размножении корни, в основном, сильно ветвистые (Бари и др., 2021; Uteulin, 2021).

Стебель сильно укороченный (каудекс), несет распластанную по земле розетку из многочисленных сизых, сизовато-зеленых или зеленых, не опушенных листьев, варьирующих по размерам и форме (Mutalkhanov et al., 2021; Boguspaev et al., 2023). Из центра розетки выходят 3–10 округлых, полых, тонких, одновременно развивающихся цветоносов. Соцветие – корзинка средней величины (1,1–2,0 см в диаметре), цветки желтые (Кутузова и др., 2015; Гаврилова и др., 2017).

В природных условиях кок-сагыз размножается семенами (Каратаева, Мукаев, 2012). В естественных местах обитания семена созревают в июне-июле. Цветение одного растения продолжается 17–30 дней, период созревания семян длится 15–18 дней. Семянки снабжены летучками из белых волосков (Новиков и др, 1933; Кутузова и др., 2015; Гаврилова и др., 2017). Климат зоны естественного произрастания кок-сагыз характеризуется значительными колебаниями метеорологических факторов и является горным, резко континентальным. Самая теплая погода по месяцам и в целом в Казахстане стоит в июне, июле, августе 19–22°C. При этом наименьшие температуры окружающего воздуха отмечаются в декабре, январе, феврале от -7 до -14°C. Наиболее дождливые периоды май, июнь, июль, когда за 20 дней выпадает до 65,44 мм осадков. В августе, сентябре, октябре наблюдается засуха, и кок-сагыз уходит на покой. Первый снег выпадает в середине или конце октября. Снеговой покров мощный и устанавливается в первой половине ноября (Утеулин, 2023).

Кок-сагыз – довольно влаголюбивое и перекрестно опыляемое насекомыми растение (Лебедев, 1937; Липшиц, 1953; Wollenweber et al., 2021). Попадая в почву, семена не прорастают. В течение осени и зимы семена проходят процесс послеуборочного дозревания (Uteulin, 2021). Кроме того, они подвергаются воздействию низких температур во влажном состоянии (естественная стратификация) и весной быстро и дружно всходят. Температурный оптимум прорастания семян кок-сагыз 25–30°C (Moussavi et al., 2016). При таких условиях семена прорастают быстро, за 6–8 дней. Прорастание нестратифицированных семян растягивается на 40–60 дней (Кутузова и др., 2015; Гаврилова и др., 2017).

На рисунке 1.2 представлены различные стадии роста и развития растения кок-сагыз от начала прорастания в первый год до пика зрелости на второй год роста (Kreuzberger et al., 2016).



Рисунок 1.2 – Растения кок-сагыза первого года жизни: а) сеянцы на 14 день после всходов; б) развитие у сеянцев листовой розетки; в) начало цветения; д) два типа развития кок-сагыза: цветение в первый год жизни (верхнее) и отсутствие цветения в первый год жизни (нижнее); е) пик цветения на первый год жизни; ф) стадия покоя. Растения кок-сагыза второго года жизни: г) возобновление роста после периода покоя; h) пик цветения на второй год жизни; и) пик семенной зрелости (Kreuzberger M. et al., 2016)

Рост и развитие неокультуренных растений кок-сагыза в долинах Тянь-Шаня происходят в суровых условиях резко континентального климата на бедных биогенными элементами почвах, при недостатке влаги и сильных ветрах (Липшиц, 1953; Ivashchenko et al., 2021). Масса сухого корня кок-сагыза в естественных зарослях составляет около 1 г (Филиппов, 1953), а содержание каучука в растениях из естественных зарослей колеблется от 6 до 24% массы сухого корня (Кобелев, 1937). По данным других исследователей, оно достигает 10–27% (Кутузова, Петросян, 2011; Макагон, 1936; Павлов, 1942). Испытания в культурных условиях не выявили существенных различий у растений из разных урочищ Тянь-Шаня по массе растений и семенной продуктивности. Однако в пределах каждого урочища был обнаружен ряд

генотипически различных растений, отличающихся по форме листовой пластинки, толщине и массе корня, вегетативному ритму (цветение в первый или на второй год жизни), семенной продуктивности и каучуконосности (Кобелев, 1937; Павлов, 1942; Кутузова, Петросян, 2011).

Внутри этих форм обнаружены морфо-биологические типы кок-сагыза, различающиеся по времени зацветания, скороспелости и другим признакам (Королева, 1957; Моисеева, 1960; Hodgson-Kratky et al., 2015).

Как отмечалось ранее, получение каучука связано, в первую очередь, с корневой системой растения (Heim, 2008), поэтому стоит более подробно рассмотреть особенности анатомического строения корня кок-сагыза, его формирование, образование и разрушение чехла.

Снаружи однолетний корень покрыт остатками первичной коры, которая по мере роста корня слущивается (Ничипорович и др., 1936; Liu et al., 2024). Под ней находится вторичная ткань перидерма, состоящая из феллемы, феллогена и феллодермы (Akhmetova et al., 2018). Поверхность корней первого года светло-кремового цвета, более старых – темно-коричневая, следовательно, окраска является отличительной чертой, свидетельствующей о возрасте корня (Zhuo et al., 2021). Под перидермой располагается вторичная кора, образованная вторичной флоэмой, далее к центру – камбий, вторичная ксилема в центре – первичные ксилема и флоэма. От продолжительности периода деятельности камбия зависит разрастание корня в толщину (Гаврилова и др., 2017).

При продольном разламывании корня клетки камбия легко разрываются, и вторичная ксилема вместе с первичными проводящими тканями легко отделяется в виде тонкого плотного стержня (Vági et al., 2013). Центр корня занят элементами проводящих тканей и имеет круглую форму в поперечном сечении (Buttery, 2012). Ксилема в поперечном сечении расположена радиально и имеет звездообразную форму, ее нити идут лучами от первичных элементов ксилемы, расположенных в центре корня и

окруженных клетками склеренхимы. Ксилема и близлежащие ткани не имеют млечников (Ghaffar et al., 2016).

Наиболее широкая часть корня – вторичная кора, в которой и формируются млечники, располагающиеся концентрическими кругами (Fay, Jacob, 2018). Млечники образуются путем слияния отдельных млечных клеток. С первых же дней прорастания семян в корнях начинается образование каучука, как в темноте, так и на свету (Yuan et al., 2020). Млечники заполнены латексом (млечным соком). Латекс состоит из жидкости, в которой содержатся твердые каучуковые частицы – глобулы (Ghaffar, Cornish, 2024). Млечники кок-сагыза сложные, состоящие из рядов клеток. Такие млечники называются членистыми (Медведев, 2013). У кок-сагыза латекс молочно-белого цвета и представляет собой полидисперсную систему, в которой находятся каучуковые частицы, называемые дисперсной фазой, а водный раствор сахаров и других веществ, серум, представляет собой дисперсионную среду (Кутузова и др., 2015).

Сначала смол образуется больше, чем каучука, потом с ростом растения и началом цветения ситуация меняется на противоположную. В период бутонизации в растении кок-сагыза синтезируются и накапливаются большие количества инулина и других сахаров (Прокофьев, 1948; Kreuzberger et al., 2016).

Также к периоду бутонизации кок-сагыза его листья формируются окончательно, увеличивается мощность листовой пластины. В период цветения инулин локализуется в клетках паренхимы между группами млечных сосудов. В период плодоношения формируется и растет млечная система растения. К концу вегетации количество каучука в корнях существенно возрастает, а содержание инулина достигает 40–45% на сухую массу корня. В это время сахара локализуются в млечниках. В листьях содержится каучука менее 1 %, в стеблях то же самое, в корнях содержится каучука 10,6% и более (Прокофьев, 1948).

Ранней весной во второй год жизни кок-сагыза возобновляется деятельность камбия, вторичная кора увеличивается в ширину, внутри вторичной флоэмы формируются новые слои перидермы, и клетки коровой ткани первого года, заполненные латексом, начинают отмирать, образуя так называемый «чехол» (Uteulin et al., 2020). По мере разрастания корня образуются трещины и разрывы в чехле. Старые клетки от давления сплющиваются, латекс в них сворачивается, и каучук превращается в нити, каучуковый чехол постепенно утончается (Рахимбердиева и др., 2020; Утеулин, 2023). К концу вегетации чехол совершенно разрушается (Лапин, 1935) и на выкопанных в это время корнях висит в виде резиновых нитей, которые позднее совсем исчезают. Окраска корня снова становится светлой (Гаврилова и др., 2017). Это ежегодный процесс, и каждый год после сбрасывания вторичной коры начинается образование нового чехла. Наличие двух и более годичных чехлов встречается редко и только у дикорастущих форм (Кутузова и др., 2015).

1.2.2. Биохимические особенности T. kok-saghyz R.

Растения кок-сагыза в процессе роста и развития синтезируют и накапливают огромное количество продуктов первичного и вторичного метаболизма. Промышленный интерес из них представляют каучук и инулин. НК относится к классу изопреноидов, а конкретнее – к политерпенам (Борисова и др., 2014.). Инулин же является запасующим углеводом, он локализуется в клетках паренхимы между группами млечных сосудов (Кутузова и др., 2015) и представляет собой полимер, состоящий из нескольких остатков фруктозы в форме фуранозы (Сербасева и др., 2020). В корнях кок-сагыза инулин составляет от 10 до 40% сухой массы (Arias et al., 2016; Eggert et al., 2018).

Также в кок-сагызе в больших количествах был обнаружен сквален – ценное косметическое сырье (Yang et al., 2022). Значимыми вторичными метаболитами корней кок-сагыза являются и сесквитерпеновые лактоны, в

основном типа эудесманолида и гермакранолида. Эта культура также содержит тритерпены, фитостеролы, фенилпропаноиды, различные фенольные кислоты (например, цикориевую, монокаффеоилтартаровую, хлорогеновую и кофейную кислоты) и кумарины в различных количествах (Panara et al., 2018).

1.2.2.1. Биосинтез НК

Информация о развитии каучуковых частиц, или глобул, ограничена, вероятно, потому, что маленькие латексные глобулы, доступные для исследования только с помощью электронной микроскопии, трудно однозначно отличить от других мелких частиц внутри клетки. Глобулы обычно имеют шарообразную форму, и их размер может сильно варьировать: в начальные стадии развития растения, такого как кок-сагыз, глобулы практически невозможно измерить, но к концу вегетации их диаметр может достигать 1,5–2,0 микрометра (Abarca et al., 2019). Если считать средний размер глобул кок-сагыза равным 0,5 микрометра, и учитывая, что содержание каучука в латексе составляет 35%, то можно оценить, что в 1 кубическом сантиметре латекса содержится около 630 миллиардов каучуковых глобул (Прокофьев, 1948). Все эти частицы находятся в постоянном движении, перемещаясь со средней скоростью около 12 микрометров в секунду (Кутузова и др., 2015).

Глобулы латекса имеют сложное строение: внешний слой состоит из белков, липидов, жирных кислот и других поверхностно-активных веществ, которые присутствуют в латексе (Sarkar, Bhowmick, 2018; Uteulin, 2020). Под ним находится твердый и эластичный каучук. Наконец, внутренняя часть глобулы, составляющая основную массу, также представляет собой углеводород каучука, который по консистенции напоминает очень вязкую жидкость (Кутузова и др., 2015).

Исследования структуры латексных глобул и их биохимических компонентов позволяют предположить, что они формируются в шероховатом

эндоплазматическом ретикулуме (Ghaffar, Cornish, 2020). Структура глобул сходна у всех видов каучуконосных растений, исследованных к настоящему времени (Liu et al., 2024). Глобулы содержат гомогенное латексное ядро, окруженное однослойной мембраной (Ничипорович и др., 1936). Переход от текучего содержимого внутренней части глобулы к эластичному каучуку второго слоя происходит постепенно. Текучее содержимое глобул состоит главным образом из растворимого золь-каучука, а эластичный слой – из гель-каучука. Наличие в глобулах латекса золь-каучука обуславливает возможность слияния отдельных глобул в более крупные частицы. Латексные глобулы заполняют васкулярные пучки по всему растению кок-сагыза, но каучук получают из корней, которые содержат самое большое его количество – 10, 6% и более, в листьях его менее 1%, в стеблях (каудексах) – 2,7% (Ничипорович и др., 1936).

Синтез каучука осуществляется из неспецифических ассимилянтов, оттекающих из листьев. Консервативность природы компонентов биомембраны латексной глобулы позволяет предположить, что генерация латексной частицы зависит от небольшого числа специфических генов. У всех видов каучуконосов есть очень крупные белки или белковые комплексы, содержащие интегрированный, связанный с мембраной фермент цис-пренилтрансферазу или ферментный комплекс каучуктрансферазу, синтезирующий каучук. Этот комплекс синтезирует каучук из гидрофильного субстрата, поступающего из цитоплазмы, и гидрофобного полимера, находящегося в латексной частице. Реакция полимеризации, по-видимому, проходит на поверхности частицы (Кутузова и др., 2015).

Биосинтез натурального каучука происходит при участии фермента цис-пренилтрансферазы, который связан с глобулами в латексе (Tanaka, 1989; Америк и др., 2018, Америк и др., 2022). Этот процесс полимеризации происходит внутри однослойной фосфолипидной мембраны, расположенной между гидрофобными каучуковыми частицами и окружающей водной средой. Гидрофобные полиизопреновые цепи находятся внутри латексных частиц, и

фосфолипидный монослой выполняет важную функцию в стабилизации частиц, предотвращая их склеивание.

Реакция синтеза происходит в активном центре амфифильного фермента, который состоит из гидрофильного гликозилированного региона, отвечающего за связывание гидрофильных мономерных звеньев, и гидрофобного фрагмента, который вероятно определяет взаимодействие фермента с биологической мембраной (Holstein, Hohl, 2004).

В качестве мономера используется изопентенилпирофосфат (IPP), который представляет собой соединение изопрена и пирофосфорной кислоты (Lange et al., 2015). Главным источником IPP в клетке является метаболический путь биосинтеза мевалоновой кислоты, также известный как изопреноидный путь. Этот метаболический путь начинается с ацетилкоэнзима А (AcCoA) и завершается синтезом двух молекул IPP (Мартиросян и др., 2023; Wang et al., 2024; Zhang et al., 2025). У эукариот IPP обычно фосфорилируется дважды в 5-ОН-позиции, после чего происходит декарбоксилирование, формируя IPP (Goldstein, Brown, 1990; Mizioro, 2011).

IPP связывает моновалентные катионы, такие как K^+ , Na^+ или NH_4^+ , и претерпевает изомеризацию, превращаясь в 1,1-диметилаллилпирофосфат (DMAPP) под действием фермента IPP-изомеразы (Castillón, Cornish, 1999; Cornish et al., 2000). Специфическая транс-пренилтрансфераза добавляет от одного до трех остатков IPP к DMAPP, создавая олигомерные аллилпирофосфаты (APP). Эти APP служат инициаторами процесса полимеризации (Cornish, 1993; Америк и др., 2018).

Для ферментативной активности цис-пренилтрансферазы требуются кофакторы в виде дивалентных катионов, таких как Mg^{2+} или Mn^{2+} (Tanaka, 1989; Costa et al., 2005; Schmidt et al., 2010). Было доказано, что скорость биосинтеза и молекулярная масса, получаемые *in vitro* из *H. brasiliensis* и другого альтернативного каучуконоса, *Parthenium argentatum*, регулируются изменением концентрации ионов магния в клетке (Costa et al., 2005; Costa et al., 2006).

Амфифильная цис-пренилтрансфераза находится на границе между частицами каучука и окружающей водной средой латекса. На каждом этапе инициирования и удлинения полимера натурального каучука образуется молекула пирофосфата PPi. Таким образом, биосинтез натурального каучука представляет собой сочетание процессов роста цепи и поликонденсации (Yokozawa, Yokoyama, 2005).

Средняя молекулярная масса натурального каучука может различаться в зависимости от конкретных растений, и механизм регуляции этой процесса пока не полностью понятен (Cornish et al., 2000; Saba et al., 2025). Существует предположение, что структуры, содержащие аминокислоты с большими боковыми группами, в гидрофобных углублениях цис-пренилтрансферазы, могут остановить синтез полиизопреновой цепи, когда она достигает определенной длины, вызывая таким образом завершение синтеза изопреноидов (Liang et al., 2002). Однако данная модель не объясняет образование каучука в гевее и кок-сагызе, где молекулы каучука состоят из нескольких тысяч изопреновых единиц и становятся слишком гидрофобными, чтобы поместиться в гидрофобных углублениях фермента. Поэтому возможно, что комплекс, состоящий из фермента и растущей полимерной цепи, диссоциирует после каждого этапа удлинения (Америк и др., 2018, Америк и др., 2021). Последующая случайная активация и миграция/связывание полимерной цепи с активным центром фермента может привести к образованию каучуковых молекул различных размеров. Предполагается, что молекулярная масса натурального каучука зависит от размеров частиц каучука в конкретном растении и белковых факторов, которые стабилизируют комплекс между трансферазой и полимерной цепью (Puskas et al, 2006).

1.2.2.2. Биосинтез инулина и его ценность для промышленности

Помимо НК, в растениях кок-сагыза также синтезируется важный биохимический компонент, инулин (Сербаетова и др., 2020). Он активно

используется в медицинской и пищевой промышленности. В 2023 году размер рынка инулина был оценен в 1,8 миллиарда долларов США, и, как ожидается, его совокупный среднегодовой темп роста производства вырастет более чем на 6,2% в период с 2024 по 2032 год (URL: <https://www.gminsights.com/ru/industry-analysis/inulin-market>). Рыночная цена инулина зависит от его качества и колеблется в пределах 6–12 долларов США за 1 кг. Одновременная переработка кок-сагыза в целях получения каучука и инулина увеличивает его экономическую привлекательность как культуры.

Инулин представляет собой полимер, состоящий из нескольких остатков фруктозы (от 10 до 36) в форме фуранозы и одного остатка глюкозы в форме пиранозы, связанных через β -2,1 гликозидные связи, и относится к фруктанам (Сербаева и др, 2020).

В биосинтезе инулина участвуют гены, кодирующие фруктанактивные ферменты (например, 1-SST, 1-FFT, 1-FEH, 1-FENI) (Khaldari et al., 2018). В реакциях синтеза инулина также участвует уридиндифосфатфруктоза (УДФ-фруктоза), являющаяся донором остатков фруктозы. Процесс биосинтеза полисахарида начинается с реакций последовательного присоединения остатков фруктозы от УДФ-фруктозы к молекуле сахарозы. Реакции катализируют трансферазы (Рогожин, Рогожина, 2014).

Паренхимные клетки, в которых содержится инулин, расположены рядом с латиферами, синтезирующими натуральный каучук, а деградация данного углевода с помощью фруктан-1-экзогидролазы (1-FEH) обеспечивает синтез дополнительного ацетил-КоА промежуточными продуктами гликолиза (Stolze et al., 2017). Полученный коэнзим, в свою очередь, используется для синтеза каучука. Доказано, что сверхсинтез 1-FEH, ключевого фермента деградации инулина, приводит к удвоению содержания каучука в корнях (Panara et al., 2018), а нокаутирование гена фруктан-1-фруктозилтрансферазы (1-FFT), участвующего в биосинтезе инулина, также приводит к увеличению содержания каучука (Iaffalando et al., 2016).

Отмечено, что баланс между экспрессией генов 1-FFT и 1-FENI влияет на изменения длины или степени полимеризации фруктанов. Также было установлено, что экспрессия генов 1-FFT и 1-SST и накопление инулина у кок-сагыза увеличиваются летом, в то время как осенью экспрессия гена 1-FENI увеличивается и инулин подвергается гидролизу (Karimi et al., 2021). Низкомолекулярные сахара, образующиеся при гидролизе инулина, необходимы растениям для перезимовки и возобновления роста весной (Kreuzberger et al., 2016).

1.2.3. Влияние элементов минерального питания на рост и развитие T. kok-saghyz R.

Минеральное питание кок-сагыза является одним из ключевых факторов получения высокого урожая как в полевых условиях, так и при бессубстратном выращивании и культивировании *in vitro*.

Советскими учеными было установлено, что, при внесении полного минерального удобрения, увеличение дозы фосфора (P), с 60 до 120 кг/га P_2O_5 , способствует лучшему росту и развитию растений в течение всего вегетационного периода и более интенсивному накоплению каучука. Растения, получившие двойную дозу фосфорных удобрений, к началу цветения имели более крупные корни и повышенный процент цветущих растений на плантации (Тихонов, 1951). Количество вносимых удобрений также зависит от климатических условий в местах культивирования, к примеру увеличение внесения P будет положительно сказываться на содержании каучука во влажном климате, в то время как в условиях сухого климата будет наблюдаться обратный эффект (Чжан и др., 2023).

Калий (K) регулирует окислительно-восстановительные процессы в растениях и увеличивает срок жизнедеятельности листьев во вторую половину вегетации. Стимулирует рост корня, усиливает накопление каучука, но тем не менее при внесении калия в качестве подкормки в период розетки выход каучука снижался (Стахорская, 1953).

Азот (N) в сравнении с другими элементами питания в меньшей степени влияет на накопление каучука, оказывает задерживающее влияние на развитие растений на начальном этапе развития и замедляет созревание растений в конце вегетации (Тихонов, 1951). Двухлетние полевые испытания в различных частях Германии, во время которых азотные удобрения вносили на разных стадиях роста кок-сагыза, показали, что внесение азота не оказало существенного влияния на продукционный процесс растений (Eggert et al., 2019). Отмечено также, что увеличенное внесение азота уменьшало содержание каучука в растениях кок-сагыза (Чжан и др., 2023).

Внесение доз сернокислой меди под корень кок-сагыза увеличивало количество цветоносов (увеличение дозы меди с 0,025 г до 0,2 г приводило к возрастанию количества цветоносов более чем в 2 раза). Также с повышением дозы сернокислой меди снижалась заболеваемость плантации с 23,6% до 8,3%. Лучшей дозой, обеспечивающей максимальный урожай семян (в 2 раза), являлось 0,2 г сернокислой меди на одно растение кок-сагыза. Интенсивное нарастание сырой массы корней кок-сагыза было отмечено при внесении меди в количестве 0,1 г на растение (Кирильчик, 1953).

Магний (Mg) положительно сказывается на накапливании каучука корнями кок-сагыза. Соли магния сильно снижают содержание растворимых углеводов в листьях и увеличивают их накопление ко времени созревания семян. Стоит также отметить, что ионы магния являются кофакторами цис-пренилтрансфераз, ферментов, участвующих в синтезе НК (Америк и др., 2021).

Бор (B) способствует усилению роста и развития растений. Обработка растений бором увеличивает выход каучука и повышает его полимерность на 18% (Кирильчик, 1953).

Подобные исследования советских авторов подтверждаются современными работами. Например в работе Munt O. И соавторов изучали минеральное питание, в частности соотношение N:P:K, близкородственного кок-сагызу вида *T. brevicorniculatum* и пришли к выводу, что соотношение N:P

от 1:2 до 1:4 может увеличить содержание каучука в нем. Отмечается, что при повышении уровня Р и постоянном уровне N биомасса листьев и корней была больше и, напротив, биомасса листьев и корней уменьшалась, когда при постоянном уровне N был снижен Р. Сочетание умеренных доз азота с более высокими дозами фосфора способствовало росту корней и накоплению биомассы на более поздних стадиях развития растений (Munt et al., 2012).

Также в ходе полевых испытаний было изучено взаимодействие между N и Р в сочетании с К. Увеличенное количество К уменьшало биомассу листьев и корней в присутствии высоких уровней N. Предыдущие исследования показали, что калийное питание оказывает минимальное воздействие на синтез НК, но положительный эффект К становится более очевиден при наличии высоких уровней N и становится более заметным в сочетании с большим количеством Р. При низком содержании фосфора увеличение калийного питания значительно снижало биомассу корней, и этот эффект был сильнее при низких уровнях N.

Самая высокая биомасса листьев была достигнута при высоком содержании в почве N и Р, но более низком содержании К, в то время как самая низкая биомасса листьев коррелировала с самыми низкими концентрациями удобрений (Munt et al., 2012).

Отмечалось, что нитрат калия положительно влияет на прорастание семян кок-сагыза (Levitt, Hamm, 1943). Однако более поздние исследования опровергли этот факт (Moussavi et al., 2016).

При изучении родственного кок-сагызу каучуконосного вида — одуванчика крым-сагыза (*Taraxacum hybernum*), было показано, что тяжелые металлы (лантаноиды) могут положительно влиять на накопление каучука в условиях неблагоприятного климата (Vorob'ev et al., 2020).

1.2.4. Патогены *T. kok-saghyz* R.

Фитопатологическое исследование кок-сагыза начало проводиться с 1947 года, когда на полях отдела селекции Курской научно-исследовательской

станции каучуконосов были произведены первые наблюдения поражаемости кок-сагыза различными заболеваниями (Черемисинов, 1951). Была установлена неоднородность испытываемых сортов и образцов по устойчивости к некоторым заболеваниям.

Так как кок-сагыз является культурой, начавшей промышленно культивироваться относительно недавно, представляет определенный интерес вопрос о формировании состава его болезней. Их можно классифицировать относительно происхождения:

1) Болезни, завезенные из мест естественного произрастания:

- черный некроз (*Bact. necrosis* Kalin.);
- ржавчина (*Puccinia taraxaci* f. *kok-saghyzi* Zajceva).

2) Болезни, перешедшие с других растений:

- желтуха кок-сагыза – вирусное заболевание, перешедшее с других видов одуванчика;
- пятнистость листьев (*Ramularia taraxaci*) – также перешла с других видов одуванчика;
- мучнистая роса (*Sphaerotheca fuliginca* f. *taraxaci*) – имеет то же происхождение, что и предыдущие заболевания;
- серая гниль корзинок (*Botrytis cinerea* Pers.) – результат расширения круга хозяев у патогена;
- заразиха (*Orobanchе cumana*, *O. ramosa*) – перешла с подсолнечника или конопли.

3) Болезни, связанные с неблагоприятными условиями для роста и развития растений (Утеулин и др., 2014).

Среди бактериальных болезней корней кок-сагыза часто отмечают сосудистый бактериоз, возбудителем которого является бактерия *Pseudomonas campestris*. Заболевание часто встречается на почвах с очень близким стоянием к поверхности грунтовых вод. Бактерии, вызывающие заболевание, закупоривают проводящую сосудистую систему и лишают растение питания водой и минеральными солями. При поражении сосудистым бактериозом

значительного количества растений кок-сагыза на плантации не оставляют на второй год (Утеулин и др., 2014).

Из грибных заболеваний кок-сагыза отмечается ржавчина. В 2019 году при промышленном выращивании кок-сагыза в Китае было отмечено массовое появление темных пятен на листьях, определенные как симптомы ржавчины. Было установлено, что заболевание вызывает ржавчинный гриб *Puccinia hieracii*, характеризующийся широким спектром хозяев (Ren et al., 2021). Ранее уже отмечалось о ржавчине, вызванной *P. hieracii*, на представителях рода *Taraxacum* (Afshan et al., 2009), однако, насколько известно, сообщение китайских ученых о заболевании кок-сагыза, вызываемом *P. hieracii*, является первым. Авторы также отмечают, что заболевания кок-сагыза, в том числе и вызванные инфекционными агентами, представляют угрозу крупномасштабному выращиванию этой культуры (Ren et al., 2021).

Другое грибное заболевание под названием «белая ржавчина» вызывается грибом *Albugo candidae*. При заболевании повреждаются все надземные части растения, особенно активно в первые месяцы вегетации при влажной погоде. Зараженные участки покрываются белыми образованиями, после искривляются, либо вздуваются от большого количества образующихся под эпидермисом спор гриба. Мучнистая роса (*Sphaerotheca fuliginosa* f. *Taraxaci*) – также очень распространенная болезнь кок-сагыза, вызванная грибами. На зараженных листьях появляется быстро распространяющийся белый налет. Инфекция накапливается при отсутствии должного севооборота на плантациях кок-сагыза. Другими распространенными заболеваниями кок-сагыза, вызываемыми грибами, являются серая и черная гниль, фузариоз (Утеулин и др., 2014).

Одним из последних опубликованных сообщений о ранее не задокументированном патогене кок-сагыза была работа исследователей из Китая, они описали вспышку корневой гнили кок-сагыза в провинции Хэйлунцзян, вызванной, как было выяснено при последующем выделении и

идентификации патогена, *Alternaria tenuissima*. Симптомами заболевания являлись увядание листьев, замедление роста, некроз корней и последующая гибель растений (Ao et al., 2025). *A. tenuissima* является условным патогеном некоторых культурных растений, например картофеля (Zheng, Wu, 2013) и, соответственно, относится к классу патогенов кок-сагыза, перешедших с других растений (Утеулин и др., 2014).

Это доказывает, что по мере расширения площадей и регионов промышленного культивирования кок-сагыза будут появляться сообщения о новых ранее не описанных возбудителях его заболеваний. Изучение патогенов кок-сагыза и методов борьбы с ними является актуальной задачей, способствующей его становлению в качестве промышленной культуры.

1.2.5. Генетические особенности *T. kok-saghyz* R.

В настоящее время интенсивно изучают генетические особенности растения кок-сагыз. Для этого проводятся масштабные работы, однако их проведение требует подробной расшифровки генома растения (Collins-Silva et al., 2012; Fricke et al., 2013; Hodgson-Kratky, 2015; Arias et al., 2016; McAssey et al., 2016).

Arias M. с соавторами построили первую генетическую карту кок-сагыза. Для ее построения использовали методы, основанные на применении AFLP (увеличение числа копий полиморфных фрагментов гена), COS (сайты с липкими концами нуклеотидов), SSR (микросателлиты) и маркеры EST-SSR. Интегрированная карта с восемью группами сцепления (LG), представляющая восемь хромосом кок-сагыза, имеет 185 отдельных маркеров AFLP от родителя 1; 188 отдельных маркеров AFLP от родителя 2; 75 общих маркеров AFLP и 6 маркеров COS, 1 маркер SSR и 63 EST-SSR локусов (Arias et al., 2016; Collins-Silva et al., 2012). Поиски доменов в базах данных генов растений выявили некоторые гомологии с полезными генами для применения в будущем (Arias et al., 2016).

Кок-сагыз относится к диплоидному виду ($2n = 16$), воспроизводится половым путем (перекрестное опыление) (Arias et al., 2016; Chandrasekera et al., 2017). Умеренный размер генома и короткий жизненный цикл, по сравнению другими каучуконосными культурами, делает кок-сагыз наиболее подходящим объектом для селекции растения с заданными свойствами (Arias et al., 2016).

Также в широком плане проводятся работы по установлению генетических аспектов биосинтеза каучука. В работе Collins-Silva и соавторов было описано несколько белков, вовлеченных в биосинтез природного каучука. Один из них – малый белок каучуковых частиц (SRPP) – первоначально был идентифицирован в гевее бразильской как довольно распространенный белок, связанный с цитозольными везикулами и известный как каучуковые частицы. Методы генной инженерии позволили определить, будут ли изменения уровней экспрессии генов SRPP влиять на биосинтез каучука; были обнаружены три SRPP кок-сагыз (TkSRPP), имеющиеся в большом количестве в каучуковых частицах. Белки TkSRPP влияют на количество каучука в корне одуванчика и также выполняют функцию регулирования молекулярной массы цис-1,4-изопренового полимера (Collins-Silva et al., 2012).

Для облегчения работ по улучшению гермоплазмы кок-сагыз, McAssey с соавторами разработали простые последовательности повторов SSR-маркеров из имеющихся выраженных последовательностей тегов (EST), которые были использованы для изучения структуры генетического разнообразия популяций кок-сагыз. Их использование обеспечивает новые подходы в определении генетической изменчивости внутри вида и среди природных популяций растений кок-сагыз (McAssey et al., 2016).

1.2.6. Селекция высокопродуктивных растений *T. kok-saghyz* R.

В 30–50 годы в СССР ученые проводили селекцию кок-сагыз, отбирая растения, наиболее продуктивные по образованию латекса и каучука.

Устраивали так называемые маточники, площадью от 10 соток до одного гектара, отделенные территориально от других видов одуванчика. Но сохранить полную стерильность таких посадок было практически невозможно, поскольку кок-сагыз перекрестно опыляемое растение. Поэтому растения с очень высоким урожаем каучука со временем неизбежно теряли свои свойства (Утеулин и др., 2015).

Одним из самых крупных банков растений является ВИР, ныне называющийся Всероссийским институтом растениеводства, директором которого с 1921 по 1940 г. был академик Н. И. Вавилов, чье имя и носит этот институт. Под руководством Н. И. Вавилова была собрана коллекция сортов культурных растений и их диких предков со всего земного шара (более 200 тыс. образцов) во время 180 экспедиций. Во время Великой Отечественной войны эта коллекция сильно пострадала, однако большая часть растений кок-сагыза из коллекции была сохранена (Глазко, Баутин, 2012).

В настоящее время коллекция кок-сагыза в ВИРе насчитывает 128 образцов. Изучение представителей плантационных популяций из разных регионов в условиях Пушкинских лабораторий ВИРа показало, что в коллекции имеется широкое разнообразие генотипов по морфологическим и хозяйственно ценным признакам, по содержанию каучука от 4 до 11%. При индивидуальном анализе выращенных в Пушкинских лабораториях ВИР корней, проведенном на кафедре химии и технологии каучука и резины Санкт-Петербургского технологического института методом экстрагирования хлороформом в аппарате Сокслета, в лучших по содержанию каучука в корнях оно достигало 23% (Кутузова, Петросян, 2011).

В связи с тем, что кок-сагыз долгое время не возделывался промышленным способом, коллекция ВИРа была законсервирована и хранилась при -10°C . Расконсервирование коллекции включало проверку всхожести, восстановление всхожести образцов, посев всех образцов с целью получения свежей репродукции семян в количестве, достаточном для перезакладки коллекции на длительное хранение, и удовлетворения

потребностей пользователей. Кок-сагыз – многолетнее растение, которое цветет и плодоносит, начиная со второго года, поэтому цикл работ должен быть рассчитан не менее, чем на 3 года, чтобы гарантированно получить достаточное количество семян всех образцов.

Летом 2016 года 10 образцов из коллекции кок-сагыза ВИР, по предварительным данным, накапливающих наибольшее количество каучука, по сравнению с другими исследованными образцами, были высажены в вегетационные сосуды с почвой в условиях фитотрона. Для каждого образца было выращено не менее 10 растений. Это обусловлено тем, что каждый образец представляет собой популяцию, в которой растения отличаются друг от друга по габитусу, количеству и размеру листьев, величине корня и содержанию НК и инулина. Были получены растения первого года, среди которых проводился отбор генотипов, характеризующихся наиболее развитой вегетативной массой. Часть растений этих образцов была передана в Институт сельскохозяйственной биотехнологии для проведения опытов по их выращиванию в условиях аэропоники.

Кроме того, наблюдали за физиологическим развитием растений в условиях фитотрона. В полевом опыте на зиму все растения вступают в период покоя: у них усыхает надземная часть побега и в почве остается корень, который дает начало новым растениям весной следующего года. В условиях фитотрона отдельные генотипы ведут себя подобным же образом, другие пока остаются зелеными и, вероятно, продолжают накапливать каучук.

Таким образом, в ВИРе используется отбор наиболее продуктивных генотипов кок-сагыза классическими методами селекции. В настоящее время применение методов молекулярной биологии, клеточной и генной инженерии позволяет получать уникальные клоны высокопродуктивных экземпляров растений, в том числе кок-сагыза.

1.2.7. Полиплоидизация *T. kok-saghyz* R.

Для увеличения урожайности растений кок-сагыза и эффективности производства натурального каучука может использоваться увеличение плоидности (Вершинина и др., 2017).

В работах по получению полиплоидных растений чаще всего используют колхицин. Колхицин является природным алкалоидом с антимитотическим действием (Семенов, Семенова, 2015). Он оказывает ингибирующее действие на формирование веретена деления, вступая в реакцию с тубулином в его составе, таким образом, вызывая сбой во время анафазы и цитокинеза, что приводит к образованию одной клетки с удвоенным набором хромосом (Rauf et al., 2021; Eng, Ho, 2019). Следовательно, обработка колхицином приводит либо к истинно полиплоидным экземплярам, либо к миксоплоидным или анеуплоидным, в зависимости от концентрации колхицина, времени экспозиции, тканей растения и стадии его развития (Rauf et al., 2021). В большинстве случаев миксоплоиды или анеуплоиды демонстрируют низкую фертильность или стерильность, однако они могут иметь уникальные полезные характеристики, а с помощью клонального микроразмножения такие растения можно использовать в селекционном процессе.

Результаты полиплоидизации и получения жизнеспособных полиплоидных форм растений во многом зависят от исходного растительного материала, концентрации антимитотика и условий обработки. Для разработки эффективного протокола полиплоидизации большое значение также имеют компоненты среды и условия выращивания эксплантов после обработки антимитотиками. Имеют значение и другие факторы, которые улучшают процесс полиплоидизации, например, использование шейкера, устройства для вакуумизации и ультразвуковой обработки эксплантов. Предполагаемые полученные полиплоиды отбираются косвенно на основе морфологических и анатомических параметров, а также детектируются методом проточной

цитометрии. Выбранный предполагаемый полиплоид можно проверить с помощью подсчета хромосом.

С развитием методов удвоения хромосом были получены полиплоидные формы растений большого числа видов (Gupta et al., 2024), в том числе и кок-сагыза (Навашин, Герасимова, 1941; Warmke, 1945). Однако, несмотря на значительные перспективы полиплоидизации, было проведено очень мало исследований, связанных с кок-сагызом – опубликовано лишь несколько работ, проведенных в середине прошлого века, когда активно велся поиск и селекция новых высокопродуктивных форм каучуконоса.

Первые тетраплоидные растения кок-сагыза были получены советскими учеными Навашином и Герасимовой в 1941 году с использованием колхицина (Навашин, Герасимова, 1941). Была надежда, что полиплоидия может повысить урожайность каучука кок-сагыза. В 1945 году Warmke Н. Е. получил тетраплоиды кок-сагыза, также посредством обработки колхицином, и сравнил их с диплоидными формами по выходу каучука, массе свежих корней и фертильности. Тетраплоиды кок-сагыза имели урожайность НК в 3,3 раза большую, чем диплоиды в полевых условиях, при этом между ними не было существенных различий при выращивании в теплицах, где тетраплоиды G0 (поколение ноль) имели более крупные корни и более широкие листья, но более низкую концентрацию каучука (Warmke, 1945). По мере развития методов клеточной и молекулярной биологии наиболее эффективным и точным способом обнаружения изменений в уровне ploидности стала проточная цитометрия. Образцы легко и быстро готовятся, требуется всего несколько миллиграммов ткани, и это воспроизводимый метод определения уровня ploидности большого количества образцов. Наиболее надежным для установления ploидности растений представляется сочетание методик проточной цитометрии и микроскопии метафазных пластинок, полученных из меристемных тканей корней (Fomicheva, Domblides, 2023).

1.2.8. *T. kok-saghyz R.* в культуре *in vitro*

В упоминаемом ранее ВИРе применяют методы микроклонального размножения кок-сагыза из каллусов самых продуктивных экземпляров растений с целью получения большого количества проростков для дальнейшего их выращивания в фитотронах или в полевых условиях.

В патенте Утеулина К. Р., Мухамбетжанова С. К. и Рахимбаева И. Р. предложен способ получения посадочного материала от самого продуктивного растения кок-сагыза методом микроклонального размножения, который включал в себя отбор индивидуального растения с наивысшим содержанием каучука, приготовление в качестве эксплантов сегментов листовых пластинок. При этом существенно сокращается продолжительность селекционного процесса (Утеулин и др., 2013).

Культура клеток и тканей является перспективным методом получения вторичных метаболитов растений (Головацкая и др., 2024). Наряду с микроклональным размножением, получение целевых продуктов (например, НК и инулина) таким способом не зависит от сезонных и географических изменений, экологически безопасно и в целом может происходить быстрее, по сравнению с традиционными методами выделения метаболитов из растительного сырья, выращенного *in vivo* (Hussain et al., 2012). На сегодняшний день в целях повышения синтеза и накопления вторичных метаболитов используют так называемую культуру «косматых корней» или «*hairy roots*», речь о которой пойдет в следующем подразделе.

1.2.9. Генная инженерия *T. kok-saghyz R.*

На сегодняшний день разработано много различных способов получения трансгенных растений, в частности с использованием агробактерий *Rhizobium radiobacter* (ранее *Agrobacterium tumefaciens*) и *Rhizobium rhizogenes* (ранее *Agrobacterium rhizogenes*). «*Hairy roots*» или волосподобные (волосовидные) корни, появляющиеся в результате заражения растения *R. rhizogenes*, имеют большое научно-практическое значение, т. к. они способны

в больших количествах продуцировать и секретировать огромный спектр биологически активных веществ, которые невозможно получить путем химического синтеза (Гумерова, 2018), в том числе и терпены (Rogowska, Szakiel, 2021).

Учеными из Уфы была проведена трансформация кок-сагыза с целью увеличения содержания натурального каучука. У растений удаляли несколько нижних листьев и корней и прокалывали гипокотиль, затем на места поранений наносили суспензию, содержащую *R. rhizogenes* штамма А4. Было показано, что полученные «косматые» корни накапливают в среднем 7,5% гексанового экстракта (каучукоподобных веществ) на сухую массу, что примерно в 1,5 раза больше, чем корни кок-сагыза, выращенные в полевых условиях (Кулуев и др., 2020). Полученные данные в очередной раз доказывают перспективность использования растений кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*» для промышленного получения натурального каучука.

Zhang Y. с соавторами разработали протокол агробактериальной трансформации кок-сагыза без использования фитогормонов и регуляторов роста, при котором после кокультивации растительных эксплантов с бактериями *R. rhizogenes* штамма K599, несущего гены, кодирующие зеленый и циановый флуоресцентные белки, в среду для выращивания добавляли только антибиотики отбора. В среднем эффективность трансформации составила 24,7% (Zhang et al., 2015).

Peng C. с соавторами трансформировали кок-сагыз с помощью штамма *R. radiobacter* GV3101, несущего плазмиду с генами фактора элонгации каучука (rubber elongation factor, REF) гевеи бразильской (pHbREF138 и pHbREF258). Эффективность трансформации с целевым геном REF138 составила $24,05 \pm 1,84\%$ и $23,12 \pm 2,43\%$ при трансформации с REF258. Авторы не приводят данных о содержании НК в полученных трансгенных растениях, однако отмечают, что факторы элонгации каучука, а также SRPP, речь о

которых шла ранее, тесно связаны с выходом каучука и являются ключевыми факторами для увеличения биосинтеза НК (Peng et al., 2023).

1.3. Совершенствование методов выделения НК из *T. kok-saghyz* R.

Разработки методов качественного и количественного анализа НК имеют давнюю и обширную историю, обусловленную огромным объемом его практического использования (Salehi et al., 2022). Наибольшее распространение приобрел самый простой и достаточно надежный гравиметрический метод. Он состоит в экстракции каучука из высушенных и диспергированных частей растения-каучуконоса, выделения каучука из экстракта и его взвешивания после сушки. Публикации на эту тему, очевидно, что далеко не первые, можно встретить в 30-х гг. XX века (Прокофьев, 1936). В последующие годы метод был существенно усовершенствован (Black et al., 1983; Salvucci et al., 2009; Pearson et al., 2013; Azadi et al., 2020).

Эта модификация касалась, в основном, сокращения времени экстракции с 1–2 десятков часов до двух часов (ускоренная экстракция с фильтрацией под давлением, английская аббревиатура ASE), а также уменьшения навески исходного растительного материала – с десятка граммов до десятых грамма. Очевидное достоинство гравиметрического метода заключается в том, что он является абсолютным методом. Однако существенными недостатками, в особенности для использования в научных исследованиях, следует считать длительное время анализа (часы) и значительное количество исходного материала.

В последнее время для количественного анализа натурального каучука интенсивно развивается метод ИК-спектроскопии в ближнем ИК-диапазоне (русская аббревиатура БИК; английская – NIRS) (Cornish et al., 2004; Taurines et al., 2019; Davis, Huang, 2020).

Использование переносных БИК-спектрометров оказалось весьма продуктивным для оценки качества каучуконосков при их выращивании на

грунте (Chen et al., 2022; Siano et al., 2022). Разработанные устройства и компьютерные программы позволяют достаточно быстро анализировать такие важные параметры, как влажность, концентрацию смолы, т. е. низкомолекулярных полиизопренов, и каучука. Такая быстрая обратная связь позволяет успешно регулировать агротехнические условия для оптимизации выхода целевого продукта. Метод, однако, обладает невысокой точностью, что требует значительного количества измерений (до сотни) для набора статистики и получения надежного результата. Вследствие этого при разработке конкретного варианта этой методики для достижения приемлемой точности необходимо для градуировки использовать сотни образцов с концентрацией каучука, определенной независимым способом, т. е. тем же самым гравиметрическим методом.

К настоящему времени могут считаться достаточно разработанными лишь два метода количественного определения каучука – гравиметрический и спектроскопический в ближнем ИК-диапазоне (БИК) (Lim, Sirisomboon, 2018; Бари и др., 2021). Предпринимаются попытки дополнительных разработок в этой области, например использование ЯМР-релаксометра (Вассерман, Коварский, 1986). Однако их надежность вызывает определенные сомнения. Упомянутые же ранее методы требуют значительного времени и объема исследуемого материала, и отличаются большой трудоемкостью и небольшой точностью (гравиметрический метод).

Разработка способа определения содержания каучука в корнях растений в микроколичествах и достаточно быстрого значительно упростило бы оценку эффективности различных приемов по интенсификации роста и производительности растений по целевым продуктам. Эта проблема может быть решена с помощью ЭПР метода спиновых зондов.

Метод спинового зонда и метки широко используется для исследования различных соединений (Вассерман, Коварский, 1986; Тихонов, 1998; Птушенко, 2011; Barashkova et al., 2015; Uddin et al., 2020). Спектр ЭПР нитроксильного радикала предоставляет информацию о химических реакциях,

локальной молекулярной подвижности, полярности, молекулярной организации исследуемой системы. В настоящей работе данный метод был использован для определения количества каучука в корнях кок-сагыза (патент RU2805229C1.2023, Мартиросян и др., 2023).

1.4. Влияние спектрального состава освещения на рост и развитие растений *T. kok-saghyz* R.

С целью повышения содержания продуктов вторичного метаболизма растений необходимо исследовать факторы, влияющие на фотосинтез, так как большинство вторичных метаболитов образуются в результате фотосинтеза как процесса первичного метаболизма углерода (Кошанов, Сегизбаева, 2023). Однако в фотосинтезе может эффективно использоваться только свет в диапазоне от 400 до 720 нм – так называемая фотосинтетически активная радиация (ФАР) (Кулешова и др., 2020), хотя на сегодняшний день доказано, что дальнекрасные фотоны (от 701 до 750 нм) света также эффективно используются растениями для фотосинтеза (Zhen et al., 2022). Несмотря на это, в ФАР входит менее 50% естественного излучения, и теоретический максимальный КПД преобразования солнечной энергии в энергию химических связей составляет приблизительно 15 % (Sekar, Ramasamy, 2015). Однако на практике эта величина дополнительно снижается из-за таких факторов, как отражение, дыхание и потребности растений в оптимальном уровне солнечной радиации. Таким образом, конечной является общая эффективность фотосинтеза, составляющая от 3 до 6% от общего объема солнечной радиации (Miyamoto, 1997).

Эффективность фотосинтеза – один из факторов, который влияет на накопление биомассы растений, следовательно, и на их урожайность (Смирнова и др., 2013). Поэтому при выращивании растений в оптимальных условиях их продуктивность определяется эффективностью фотосинтетического аппарата, однако на практике таких условий достичь

тяжело из-за большого количества факторов, влияющих на жизнедеятельность растений (Гольцев и др., 2016). Если фотосинтез является неэффективным, например, при слишком высокой интенсивности света, клеткам необходимо избавляться от избыточной энергии во избежание повреждения фотосинтетического аппарата с помощью нефотохимического тушения (NPQ), при котором энергия рассеивается в виде тепла, или с помощью флуоресценции хлорофилла (Гольцев и др., 2016; Пащенко и др., 2016).

Для эффективной работы с растительными культурами (культивировании, селекции и т. д.) необходимо использование различных способов оценки их физиологического состояния, в частности для того, чтобы прогнозировать их урожайность (Tripodi et al., 2018). Таким способом оценки является измерение ранее упомянутой флуоресценции хлорофилла, т. к. оно связано со световой фазой процесса фотосинтеза. Данный метод успешно используется для прогнозирования урожайности и применяется в селекции растений (Гольцев и др., 2016).

Световая точка компенсации, также известная как световой компенсационный пункт (СКП), представляет собой наименьшую интенсивность света на световой кривой, при которой активность фотосинтеза и дыхания находятся в равновесии по газообмену (Кайбейянен, 2009). В этой точке количество улавливаемого растением углекислого газа точно соответствует количеству, которое растение выделяет в результате дыхания и фотодыхания (Рахманкулова, 2019). В результате, при интенсивности света ниже СКП, все органические вещества, производимые растениями в процессе фотосинтеза, расходуются на дыхание, и не происходит увеличения биомассы (Lambers et al., 2019). Компенсация фотосинтеза дыханием обычно происходит рано утром или поздно вечером, когда интенсивность света невелика (Wilhelm, Selmar, 2011). Это объясняется тем, что интенсивность дыхания остается относительно постоянной, в то время как фотосинтез зависит от интенсивности света и, следовательно, меняется в зависимости от времени суток (Алехин и др., 2005; Медведев, 2013).

При постоянной концентрации CO_2 точка компенсации смещается в область большей освещенности с ростом температуры, так как при повышении температуры дыхание возрастает быстрее фотосинтеза (Кононова и др., 2018). Поэтому при пониженной освещенности (например, в зимний период, в оранжереях) необходима умеренная положительная температура, а ее повышение может снизить темпы роста растений (Sysoeva et al., 2010; Janda et al., 2014). Улучшение минерального питания и CO_2 сдвигает компенсационную точку в сторону меньшей освещенности, а старение листьев – в сторону большей (Skillman et al., 2011).

Выяснение положения светового компенсационного пункта необходимо при изучении продуктивности растений, поскольку она указывает на границу между запасанием и расходом органического вещества (Morison, Lawlor, 1999). Это позволяет оптимизировать все факторы роста и развития растений и увеличить количество целевого продукта (Маракаев, 2005).

Основным свободным сахаром, образующимся при фотосинтезе, является сахароза (Aluko et al., 2021). Однако в литературе не имеется прямых доказательств ингибирующего влияния накопления этого углевода на процесс фотосинтеза (Романова, 2005; Lobo et al., 2015; Shah et al., 2024). Возможно, это связано с тем, что синтез сахарозы происходит уже в цитоплазме за счет поступающих из хлоропластов триозофосфатов (Vanderwall, Gendron, 2023).

Согласно исследованиям, крахмал, который многие растения накапливают в процессе фотосинтеза, в отличие от сахарозы накапливается в хлоропластах (Ferne et al., 2002; Гармаш, 2016). Количество крахмала в таком случае составляет 20–50% от сухой массы хлоропластов (Ghosh, Preiss, 1965; Hostettler et al., 2011). Однако накопление крахмала может создавать механические препятствия для его новообразования и ингибировать активность РБФ-карбоксилазы/оксигеназы, что замедляет процесс фотосинтеза (Романова, 2005; Adichirattle et al., 2018). При этом отток и использование ассимилятов, образовавшихся при фотосинтезе, зависят и от роста растений, что делает связь между фотосинтезом и ростовыми

процессами как прямой, так и обратной (Гэлстон и др., 1983; Gibson et al., 2011).

Согласно закону предельных факторов, скорость фотосинтеза будет ограничена тем фактором, который находится на наименьшем уровне. Любое изменение уровня ограничивающего фактора будет влиять на скорость реакции (Morales et al., 2020). Основными факторами, влияющими на скорость фотосинтеза, являются интенсивность света, концентрация углекислого газа и температура, и в любой конкретной ситуации каждый из них может стать ограничивающим фактором (Miyamoto, 1997; Driesen et al., 2020).

При малых интенсивностях света скорость светозависимой реакции и, следовательно, фотосинтеза в общем, увеличивается пропорционально. Чем больше фотонов света, которые попадают на лист, тем большее количество молекул хлорофилла, которые активизируются, и тем больше запасается энергия (Janeeshma et al., 2022). Однако, когда интенсивность света увеличивается, скорость фотосинтеза в итоге ограничивается другими факторами. При очень высокой интенсивности света хлорофилл может быть поврежден и скорость реакций резко падает (Allakhverdiev, 2020).

1.5. Влияние CO₂ на рост и развитие растений *T. kok-saghyz* R.

Увеличение содержания двуокиси углерода в среде роста растений увеличивает скорость фотосинтеза. Однако скорость фотосинтеза обычно увеличивается до наступления другого фактора ограничения (Алехин и др., 2005). Поскольку CO₂ обычно присутствует в атмосфере при очень низких концентрациях (около 0,03%), то увеличение концентрации CO₂ вызывает быстрый рост; скорость фотосинтеза в итоге достигает уровня плато (Балацкий, 2018; Кошкин, 2019).

Химические реакции в процессе фотосинтеза протекают с более высокой скоростью при высоких температурах (Moore et al., 2021). При повышении температуры на 10°C в диапазоне фоновых температур происходит удвоение

скорости реакции (Расщепкина, Костина, 2012). Растения растут быстрее при более высокой температуре, при условии, что они имеют достаточно углекислоты, воды, солнечного света и питательных веществ для растений (Ahmed et al., 2020).

Если подавать более высокую концентрацию углекислого газа, тогда свет будет являться ограничивающим фактором. Если уровень диоксида углерода и уровень света высоки, но температура низкая, тогда повышение температуры будет оказывать наибольшее влияние на достижение более высокой скорости фотосинтеза (Кошкин, 2019; Esmaili et al., 2020).

Избыточное повышение концентрации CO_2 , в силу разных причин, оказывает ингибирующее влияние. Увеличение содержания CO_2 вызывает закрытие устьиц. Высокие концентрации CO_2 сказываются особенно неблагоприятно при высокой освещенности (Salvucci, Crafts-Brandner, 2004). Это заставляет полагать, что CO_2 в определенных концентрациях ингибирует отдельные ферментативные реакции цикла Кальвина. В естественных условиях содержание CO_2 настолько мало, что может ограничивать возрастание процесса фотосинтеза (Балацкий, 2018; Кошкин, 2019).

1.6. Фитотронные технологии в научных исследованиях

Во многих исследованиях, связанных с физиологией и биохимией растений, в настоящее время активно используют фитотроны. Фитотроны представляют собой различные устройства с исполнительными механизмами и программным обеспечением для контролируемого выращивания растений в искусственных климатических условиях, предназначены как для научных исследований, так и для оптимизации условий выращивания на промышленном производстве (Мартиросян и др., 2020; Adjerid et al., 2020; патент № RU199457U1).

На сегодняшний день масштабное выращивание кок-сагыза осложнено низкой продуктивностью растений даже в условиях защищенного грунта. Это

связано, с одной стороны, с высокой уязвимостью культуры к бактериальным и грибным патогенам, с другой стороны, с необходимостью создания специальных технологий сбора и обработки урожая корней. Также необходима разработка способов сбора и хранения семян, устранение проблем неравномерной всхожести семян, опасности переопыления растений с менее каучуконосными формами, селективное уничтожение сорных растений и др.

Альтернативный подход к культивированию кок-сагыза, исключаящий большинство этих проблем, состоит в использовании бессубстратных технологий, которые могут быть реализованы в современных фитотронах, позволяющих создать оптимальные и стабильные условия для роста и развития растений. Бессубстратное культивирование в условиях фитотрона позволяет сделать цикл производства НК из корней кок-сагыза внесезонным и практически непрерывным.

Фитотроны позволяют контролировать такие основные факторы окружающей среды, как температуру, освещение, влажность и воздухообмен, а также показатели питательного раствора – его состав, pH, электропроводность и другие ключевые параметры, определяющие функциональное состояние растений (Мартиросян и др., 2022). Программное обеспечение современных фитотронов автоматически анализирует вышеуказанные показатели и оптимизирует их в соответствии биологическими потребностями выращиваемых растений (Adjerid et al., 2020; Abdelouhahid et al., 2020).

Основными преимуществами использования фитотронов являются следующие:

- 1) исключение использования почвы и других субстратов;
- 2) экономия воды и удобрений;
- 3) отсутствие сезонности выращивания растений и независимость от факторов окружающей среды;
- 4) сокращение вегетационного периода растений и увеличение количества циклов их выращивания в течение года;

- 5) улучшение качества получаемой продукции за счет отсутствия необходимости в использовании средств защиты растений;
- 6) управление накоплением вторичных метаболитов и необходимых микроэлементов (селен, кремний, цинк и т. д.);
- 7) повышение производительности труда и уровня производства (AlShrouf et al., 2017; Мартиросян и др., 2017; патент № RU199457U1).

Следовательно, использование фитотронов позволяет получать экологически чистые продукты без вреда для окружающей среды и человека. Применение этой технологии частично снимает нагрузку с полей, уменьшает поступление и удаление оттуда питательных веществ и воды и исключает внесение пестицидов (Torabi et al., 2012).

На сегодняшнее время основной функционал этих устройств реализуется при проведении научных работ. Возможность регулировать условия культивирования позволила исследовать влияние элементов питания, спектра и интенсивности света, газового состава среды, температуры и других параметров, которые затруднительно или невозможно изучить в полевых условиях, а также их взаимодействие на жизнедеятельность растений (Torabi et al., 2012; Patterson et al., 2019; Cifuentes-Torres et al., 2021).

Исследования, произведенные с помощью фитотронов, носят как фундаментальный характер, например, они позволили оценить действие дальнего красного света на фотосинтез (Zhen et al., 2022), так и прикладной, например, установлено, что освещение УФ-спектром света способствует накоплению ценных метаболитов в болгарском перце (Ellenberger et al., 2020). Подобные работы затруднительно было бы проводить не только в полевых, но и в лабораторных условиях без использования фитотронных систем, т. к. их использование обеспечило необходимую стандартизацию условий роста и развития растений, делая результаты воспроизводимыми (Кулешова и др., 2016).

Таким образом, фитотроны позволяют получать информацию об оптимальных условиях культивирования растений и переносить эти знания на практику для получения больших объемов урожая повышенного качества.

Выращивание *in vitro* является востребованным методом сохранения исчезающих растений и растений с ценными генотипами, а также позволяет защищать их от неблагоприятных условий внешней среды (Salgotra, Chauhan, 2023). Как и в агрономии, фитотроны применяются в биотехнологии растений, поскольку они дают исследователям возможность подбирать и контролировать микроклимат, защищать растения от биотических и абиотических стрессоров, ставить эксперименты (Evans, 1976; Adjerd et al., 2020).

Также за счет возможности изменения большого количества функциональных показателей, фитотроны дают возможность изучать влияние на растение сразу нескольких признаков, например спектра света и его интенсивность (Федорова, Федорова, 2019).

Из вышеуказанного можно сделать вывод, что использование фитотронных систем различного типа позволяет ускорять процесс роста и развития растений, изучать корреляционные связи различных признаков и получать высокоточные результаты. Актуальным остается вопрос разработки фитотронов для научно-исследовательских работ, в том числе и по биотехнологии, т. к. существующие модели не в полной мере соответствуют требованиям для проведения подобных изысканий (Мартиросян и др., 2020; Adjerd et al., 2020).

В работе Cornish K. с соавторами описаны эксперименты по выращиванию кок-сагыза в гидропонной установке. В качестве посадочного материала использовали 6-месячные растения, выращенные в почве в природных условиях. Для освещения использовали солнечный свет, а при его недостатке – искусственное освещение, имитирующее естественное. Авторы подтвердили, что содержание каучука в корнях растений, выращенных гидропонным способом, практически не отличается от его содержания в

корнях растений, выращенных в полевых условиях. Однако, при переносе растений, выращенных в почве, в гидропонную установку увеличивается риск инфицирования среды выращивания фитопатогенами, которые способны интенсивно развиваться в благоприятных условиях фитотрона и приводить к болезням и гибели растений (Cornish et al., 2019).

В работе Кулуева Б. Р. проводится сравнение гидропонного и аэропонного способов выращивания кок-сагыза. Относительно короткий период наблюдений не позволил авторам выявить отличия в развитии корневой системы растений, выращенных в аэропонных и гидропонных условиях, однако установлено, что побеги кок-сагыза развиваются лучше при аэропонном выращивании. Показав принципиальную возможность выращивания кок-сагыза аэропонным способом, авторы признают, что оптимальные условия выращивания этой культуры в аэропонных условиях ими не достигнуты (Кулуев и др., 2017).

Таким образом, очевидно, что потенциал современных аэропонных технологий для эффективного выращивания кок-сагыза, как источника промышленного получения НК, еще далеко не реализован.

1.7. Заключение обзора литературы. Будущее *T. kok-saghyz* R.

Исходя из вышеописанных фактов, можно сделать выводы относительно культивирования кок-сагыза в качестве потенциального промышленного каучуконоса. По данной культуре проводится большое количество разнонаправленных научных работ, объединённых целью увеличения его продуктивности и устойчивости к биотическим и абиотическим стрессовым факторам. Современные направления исследования этой культуры затрагивают агротехнику, генетику, селекцию и биотехнологию кок-сагыза. Проводятся работы по расшифровке генома кок-сагыза (He et al., 2024), геномные редактирования для модификации генов, ответственных за биосинтез каучука (Ariyaratne et al., 2023) и маркер-

ассоциированная и маркер-ориентированная селекция для получения линий с высоким содержанием НК (Yang et al., 2023), скрещивание с другими представителями рода *Taraxacum* для увеличения устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды (Iaffaldano et al., 2018).

Еще одним важным направлением работ по данной теме является оптимизация выделения латекса и НК из корней кок-сагыза. Основными задачами в области экстракции и очистки каучука являются разработки эффективных методов выделения (ферментативные, механические, химические), позволяющих снизить содержание смол и примесей (King-Smith et al.; 2023; Zheng et al., 2025).

На сегодняшний день ряд крупных иностранных компаний уже инвестирует в проекты по использованию *T. kok-saghyz* R. в качестве альтернативного гевее бразильской источника НК. С 2011 года компания Continental реализует проект «Taraxagum», направленный на получение НК из кок-сагыза и его применение. В рамках проекта были созданы опытные образцы велосипедных шин, таких как «Urban Taraxagum», полностью изготовленные из каучука кок-сагыза (Рисунок 1.3). Компания также открыла исследовательский центр в Германии для изучения агрономических и технологических аспектов промышленного выращивания кок-сагыза и производства каучука. Цель проекта – снизить зависимость от традиционных источников НК и обеспечить устойчивое производство шин.



Рисунок 1.3 – Опытные образцы велосипедных и автомобильных шин «Urban Taraxagum» (URL: <https://www.continentaltires.com/products/b2c/bicycle/tires/urban-taraxagum/> (дата обращения: 10.12.24))

Отмечается, что компания Continental удостоилась нескольких наград за разработку своих велосипедных шин, изготовленных из НК кок-сагыза.

В апреле 2022 года американская компания Goodyear объявила о многолетней программе по разработке методики получения НК из кок-сагыза. Проект реализуется в сотрудничестве с Министерством обороны США, Исследовательской лабораторией BBC, BioMADE и компанией Farmed Materials. Целью является обеспечение военной, авиационной и грузовой промышленности НК альтернативного происхождения. Первые посадки и сбор урожая кок-сагыза в рамках программы начались весной 2022 года в штате Огайо. После тестирования НК кок-сагыза при производстве шин для военной авиации планируется расширить его применение на все типы шин.

В России подобные проекты с 2015 года проводила ПАО «Татнефть». Совместно различными научно-исследовательскими институтами компания работает над разработкой технологий выращивания кок-сагыза в полевых и контролируемых условиях.

Как упоминалось ранее, помимо НК и инулина, в корнях и листьях кок-сагыза содержится огромное количество биологически активных и ценных

соединений: флавоноиды (кверцетин, хризозериол, лютеолин-7-глюкозид); фенольные кислоты (кофейная кислота, хлорогеновая кислота, цикориевая кислота); сесквитерпеновые лактоны (тараксиновая кислота, тараксакозид, 11 β ,13-дигидролактучин, иксерин D, тараксаколид-O- β -глюкопиранозид); стерины (тараксастерол, β -ситостерол, стигмастерол); тритерпены (α -амирин) (Singh et al., 2008; Mir et al., 2013). В дальнейшем для экономической эффективности аэропонного культивирования кок-сагыза большую роль будет играть комплексная переработка всей выращенной растительной биомассы с одновременным получением всех ценных продуктов. Важным аспектом в вопросах экономики и коммерциализации будет играть тот привлекательный и неоспоримый факт, что применение аэропонных технологий в строго контролируемых условиях фитотрона позволяет создать биопроизводство нового типа, соответствующее всем требованиям международного стандарта GMP (good manufacturing practice).

Исходя из анализа литературных источников, указывающих на обширность и глубину научных исследований, а также основываясь на наших экспериментальных данных, мы убеждаемся, что кок-сагыз сможет стать жизнеспособным дополнением к импортируемому каучуку из гевеи бразильской. Уже сегодня в полевых экспериментах с кок-сагызом получают до 960 кг/га каучука в год. После внедрения молекулярно-генетических достижений в практику можно рассчитывать на увеличение продуктивности до 1200–1500 кг/га в год. Если учитывать, что производительность пока единственного промышленно значимого каучуконоса гевеи бразильской составляет от 800 до 1100 кг/га НК в год, то кок-сагыз в ближайшее время сможет конкурировать по эффективности с гевеей. Кок-сагыз как источник НК в умеренной климатической зоне может стать коммерческим продуктом, и велика вероятность, что в течение 10–15 лет начнётся широкомасштабное плантационное выращивание этой культуры.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал. Создание рабочей коллекции растений *T. kok-saghyz* R.

В работе использованы семена кок-сагыза, полученные из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР) и Института биологии и биотехнологии растений Республики Казахстан.

Предварительную обработку семян проводили ультразвуком с частотой 22 кГц в течение 30 с в суховоздушном состоянии с использованием ультразвуковой ванны («ПСБ-1322-05 Экотон», Россия) патент № RU 2779988 С1.2022, для снятия периода покоя, для увеличения энергии прорастания и дружности всходов.

Семена высаживали в вегетационные сосуды ёмкостью 25 л с верховым торфом («Агробалт-С», Россия) (фракция 0–20 мм, pH 5,5–6,0) и выращивали в течение 4 недель на открытом воздухе, в естественных климатических условиях экспериментального участка (Рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 – Первичная высадка коллекционных образцов кок-сагыза

Экспериментальный участок находился в поселке Горки Ленинские (55.50774596069086, 37.77990167337447), Ленинский район, Московская область. Показатели средних ежемесячных значений температуры воздуха, количество осадков, влажность и среднесуточная продолжительность светового дня в период выращивания приведены в таблице 2.1. Данные взяты с официального сайта ФГБУ «Гидрометеорологический научно-исследовательский центр Российской Федерации» (URL: <https://meteoinfo.ru/>).

Таблица 2.1 – Ежемесячные значения температуры воздуха, влажности, количества осадков и продолжительности светового дня, период выращивания по месяцам (2022 г.)

Параметр	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь
Среднедневная температура воздуха, °C	14±2	19±2	27±2	29±3	26±3	23±2	10±1	3±1
Средненочная температура воздуха, °C	8±1	8±1	16±2	18±2	15±1	13±1	6±1	2±1
Средняя влажность, %	66	65	68	72	74	80	82	85
Средне количество осадков, мм	47	32	186	64	34	11	83	71
Среднесуточная продолжительность светового дня (час)	14,2	16,2	17,3	17,1	15,2	12,8	10,3	8,1
Кол-во солнечной радиации, кВт·ч/м ² .	145,5	189,4	209,9	189,7	174,7	127,8	81,7	45,0

Необходимо отметить, что климатические условия при выращивании в вегетационных сосудах отличались от климатических условий в местах естественного произрастания, описанных в разделе 1.2.1. Температурный пик

в Казахстане в местах естественного произрастания составляет в июне, июле, августе 19–22°C, в условиях Горок Ленинских, Московской области пик температур в июне, июле, августе составлял 29–32°C.

С помощью методик, представленных в разделе 2.7, растительные образцы были проанализированы на содержание каучука в корнях. Опираясь на данные показатели, для дальнейших работ были выбраны экземпляры растений с наибольшим содержанием каучука.

2.2. Разработка технологии фитотронного выращивания *T. koksaghyz* R.

2.2.1. Аэропонный фитотрон

Для исследований использовался аэропонный фитотрон, разработанный нами, патент № RU 196013U1.2020 Он представляет собой вегетационную камеру с полностью регулируемыми условиями выращивания (освещение, температура, влажность, питание, газовый состав среды), где водно-минеральное питание растений осуществляется по принципу аэропоники.

Фитотрон предназначен для выращивания невысоких и среднерослых растений, которые требуют умеренной и высокой интенсивности света. Камера с установленной ячеистой полкой из нержавеющей стали, разделена на две части, что позволяет выращивать растения высотой до 610 мм. Площадь для выращивания растений – 0,96 м².

Для освещения камеры используется комбинация светодиодных матриц. Система управления позволяет регулировать освещение в широком спектре. Также стандартным является режим замкнутого цикла освещения (программируется в мкмоль·м⁻²·с⁻¹), что позволяет осуществлять точный и воспроизводимый контроль освещения, а также автоматическую регулировку стабильности светового потока. Интенсивность освещения измеряется квантовым фотометром и отображается на панели управления. Выделение тепла от светильников компенсируется системой охлаждения.

Система вентиляции создает в камере равномерный восходящий поток воздуха. Объемный расход свежего фильтрованного воздуха до 0,57 м³/мин.

Установлен отдельный опциональный короб, в который помещается модуль воздушного термоэлектрического охлаждения на элементах Пельтье. Короб имеет рециркуляционную систему воздухооборота с возможностью подпитки воздухом из окружающей среды. Модуль может работать в реверсивном режиме и вместо охлаждения нагревать воздух.

Также при необходимости в данный короб устанавливается система увлажнения и клапан углекислого газа. Охлаждение воздуха в камере обеспечивается при помощи модуля, состоящего из термоэлектрической сборки с воздушным охлаждением и блока реверсивного управления. Контроллер управления и датчики температуры гарантируют устойчивую работу установки. Доступны другие методы охлаждения, например центральное кондиционирование помещения, где установлены фитотроны. При таком методе охлаждения при помощи контроллера управления происходит регистрация температуры внутри камеры.

Модуль контроллера построен на базе программируемого панельного контроллера Segnetics 2G-4222-01-2. Точность измерений 0,05%. Циклический опрос датчиков каждые 15 секунд.

Программируемая пользователем аварийная система сигнализации обеспечивает исключительно точное отслеживание параметров без необходимости их регулярной проверки. При отклонении параметров от установленных значений система сигнализации подает визуальный и звуковой сигналы (если включен режим аварийного оповещения).

Технические характеристики и принципиальная схема установки Фитотрон представлены в Приложении.

На рисунках 2.2 и 2.3 представлен внешний вид аэропонной установки, на рисунке 2.4 – показана эксплуатация установки.

Таким образом, фитотрон оснащен следующими функциональными опциями:

- возможностью компактного выращивания до 96 кустов растений, до максимальной высоты 610 мм;
- автоматическим орошением корней растений питательным раствором с заданными параметрами (рН, электропроводность (Ес) и определенного химического состава);
- подачей питательного раствора непосредственно в корневую зону, в виде мелкодисперсного аэрозоля с диаметром частиц от 50 до 125 микрон;
- цикличностью подачи питательного раствора в зависимости от фазы роста и фотопериода;
- автоматической корректировки химического состава питательного раствора;
- поддержания заданных температурных характеристик питательного раствора;
- автоматического поддержания температуры в вегетационной части камеры и в корневой зоне;
- поддержания влажности в камере от 25 до 85%;
- поддержания концентрации углекислого газа (CO_2) в камере роста в зависимости от фотопериода;
- непрерывного взвешивания растений в ходе вегетации и передачи информации в компьютер;
- регулирования спектрального состава света во время вегетации;
- управления в течение фотопериода интенсивностью и длительностью излучения каждого участка спектра от нуля до максимальной мощности.

Функциональные возможности системы управления позволяют создать «стратегию управления» в зависимости от фазы роста растений и/или целесообразности выбора приоритетного пути направленного биосинтеза целевых вторичных метаболитов (Мартиросян и др., 2020).

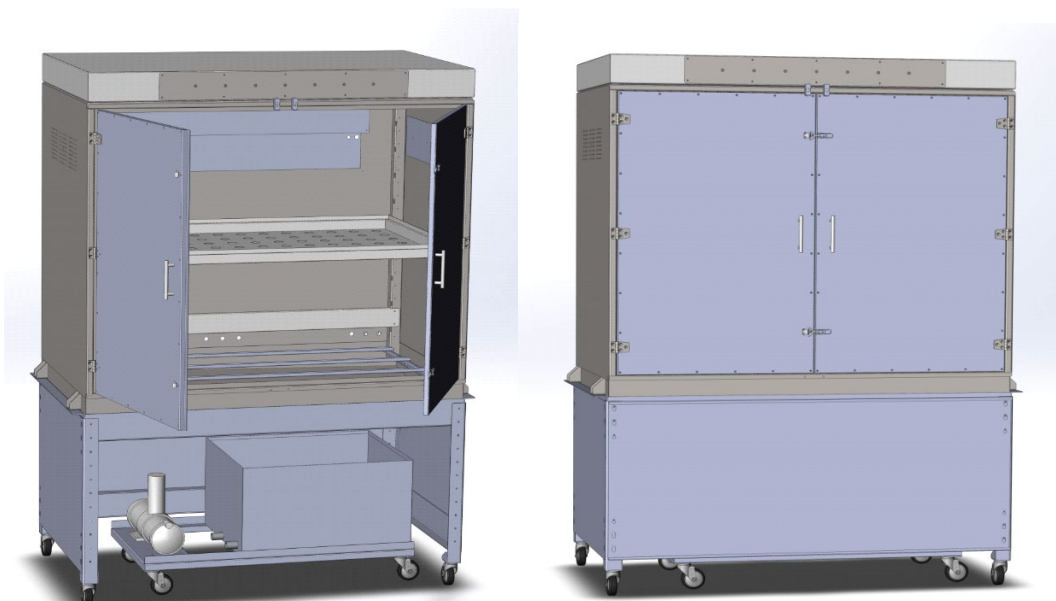


Рисунок 2.2 – Внешний вид установки с открытыми дверцами и снятой заслонкой, на подвижной подставке

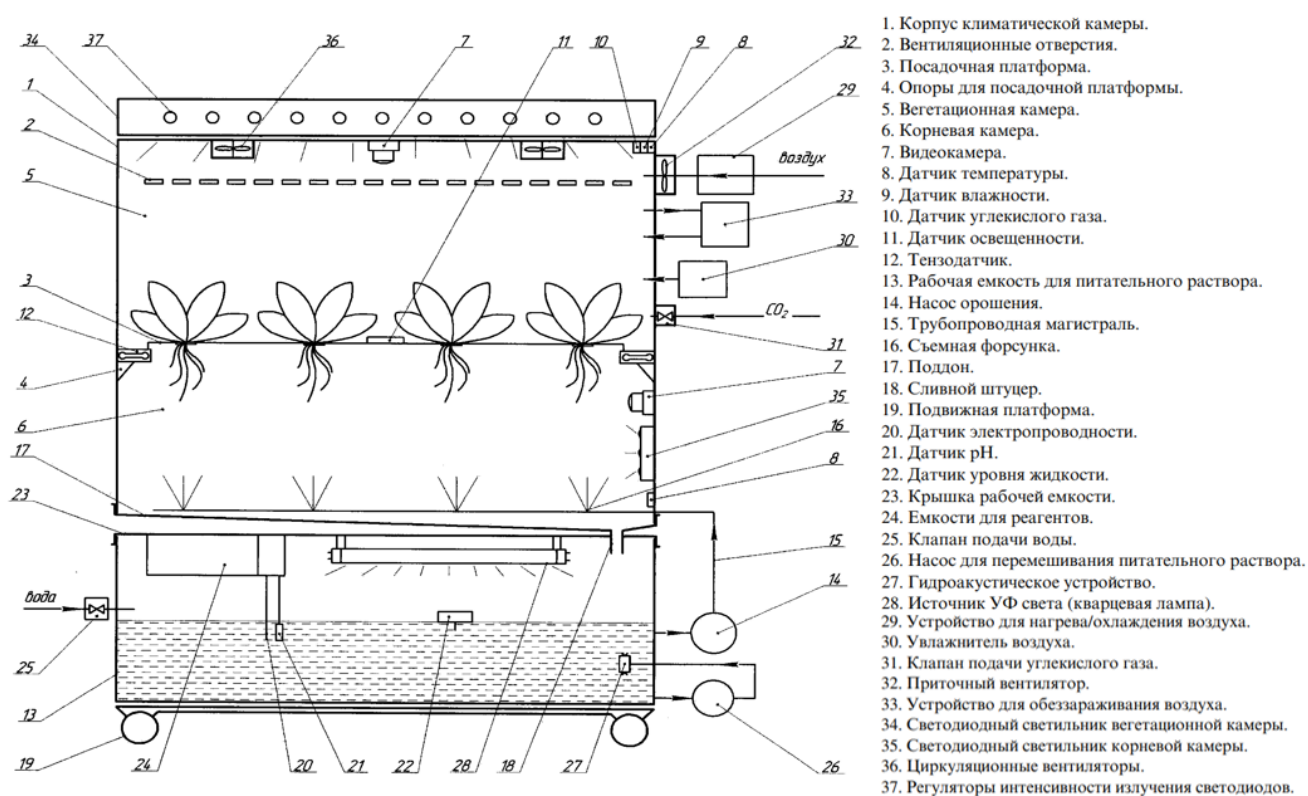


Рисунок 2.3 – Схематическое изображение внутреннего устройства фитотрона (вид спереди) и элементов систем его жизнеобеспечения



Рисунок 2.4 – Растения кок-сагыза в аэропонном фитотроне

2.2.2. Подбор питательного раствора для выращивания *T. kok-saghyz* R. в условиях аэропонного фитотрона

Подбор питательного раствора для выращивания кок-сагыза в условиях аэропонного фитотрона начали с анализа содержания химических элементов в почве, взятой из мест естественного произрастания растений кок-сагыза. Также был проанализирован химический состав корней кок-сагыза. Анализы проводили в ФГБНУ ФИЦ Почвенном институте им. В. В. Докучаева по стандартным методикам (Александрова, Найденова, 1986; Аринушкина, 1970).

Дополнительно изучали влияние отдельных элементов минерального питания на динамику роста и развития растений кок-сагыза и на накопление в них каучука и инулина. С помощью программы «PhytoMath» измеряли длину растений, массу растений измеряли с использованием устройства, описанного в разделе 2.2.3, а содержание целевых веществ определяли согласно методикам, описанным в разделе 2.7.

Исходя из полученных данных анализа элементов, мы составили питательный раствор для выращивания кок-сагыза методом аэропоники в условиях фитотрона. Для поддержания pH питательного раствора на разных

этапах мы использовали калий-фосфатные буферы. На первом этапе использовали 0,01 М фосфатный буфер с рН 6,0. Раствор с такими параметрами способствовал ускорению ростовых процессов. Буферный раствор готовили из 0,01 М раствора KH_2PO_4 (870 мл) и 0,01 М раствора K_2HPO_4 (130 мл). На втором этапе, для стабилизации рН питательного раствора на уровне 7,0–7,5, использовали 0,03 М калий-фосфатный буфер, что позволяло поддерживать баланс в заданных параметрах. В итоге экспериментально подобранный состав питательного раствора позволил защитить корни от потемнения и стимулировать активный рост здоровой корневой системы в условиях аэропоники.

2.2.3. Разработка устройства для измерения массы растений в фитотроне в режиме реального времени

Разработанное нами устройство, патент № RU212577U1.2022, относится к средствам для взвешивания, а именно к устройствам для неразрушающего определения в режиме реального времени веса растений, выращиваемых в условиях фитотрона. Устройство может быть использовано для онлайн-мониторинга изменения веса растений, выращиваемых в фитотронах различного типа, с целью оптимизации условий выращивания и проведения других биологических и биотехнологических исследований. Состоит из тензодатчика, аналого-цифрового преобразователя, и системы крепления растений. Тензодатчик регистрирует вес растения и через (АЦП) посылает сигнал на микроконтроллер, который управляет частотой взвешивания и количеством опросов АЦП. Результаты взвешивания через USB интерфейс передаются в расположенный снаружи фитотрона компьютер для обработки и анализа данных (Гольдберг и др., 2022).

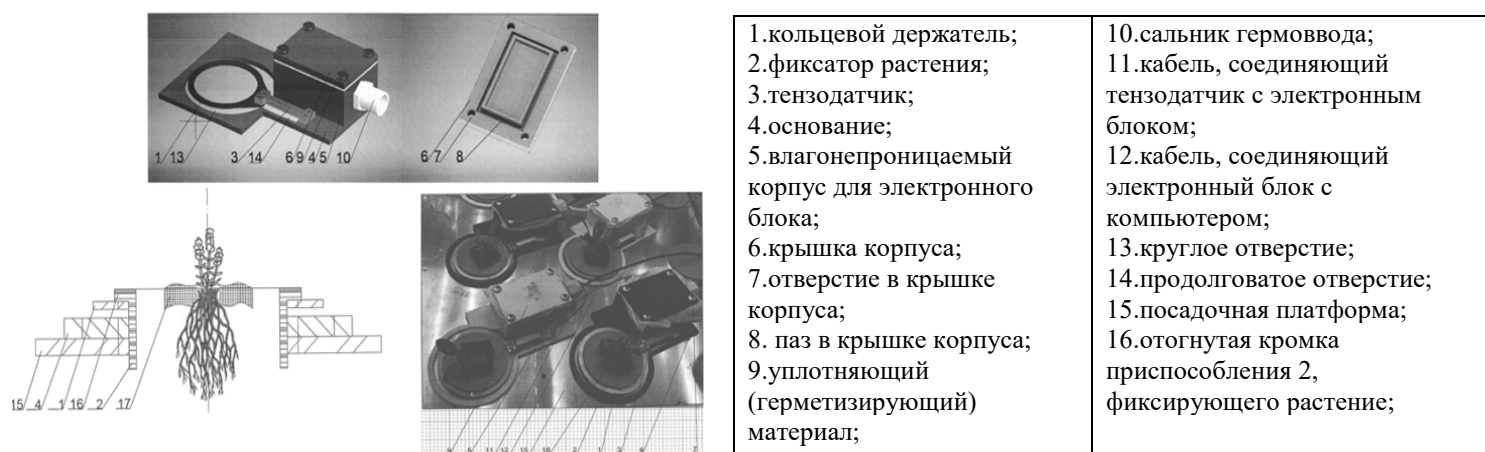


Рисунок 2.5 – Схематическое изображение устройства для измерения массы растений в фитотроне в режиме реального времени, включая крышку корпуса электронного блока, схематического изображения (в разрезе) крепления взвешиваемого растения в кольцевом держателе и фрагмент посадочной платформы аэропонного фитотрона с размещенными на ней устройствами для одновременного онлайн измерения веса нескольких вегетирующих растений (Гольдберг и др., 2022)

2.2.4. Исследование влияния спектрального состава света на физиолого-биохимические процессы и биосинтез каучука и инулина у растений *T. kok-saghyz* R. в условиях аэропонного фитотрона

Растения кок-сагыза в фазе 3–4 настоящих листьев высаживали в аэропонные фитотроны, в две камеры, с полноспектральным в области ФАР светодиодным облучением и различным соотношением СС/КС. В одной – с преимущественным облучением растений светодиодами синего ($\lambda_{\text{max}} = 470$ нм, СД СС), в другой – красного света ($\lambda_{\text{max}} = 660$ нм, СД КС) в области ФАР.

Измерения проводили на растениях, длительно выращиваемых в условиях полного спектрального облучения в области фотосинтетически активной радиации (ФАР) с преобладающим синим (ФАР+СС) или красным облучением (ФАР+КС) (Рисунок 2.6), а также исследовали динамику изменения фотосинтетических показателей при изменении светового режима

с ФАР+КС на ФАР+СС или с ФАР+СС на ФАР+КС облучение, моделирующее дневной ход солнечной радиации.

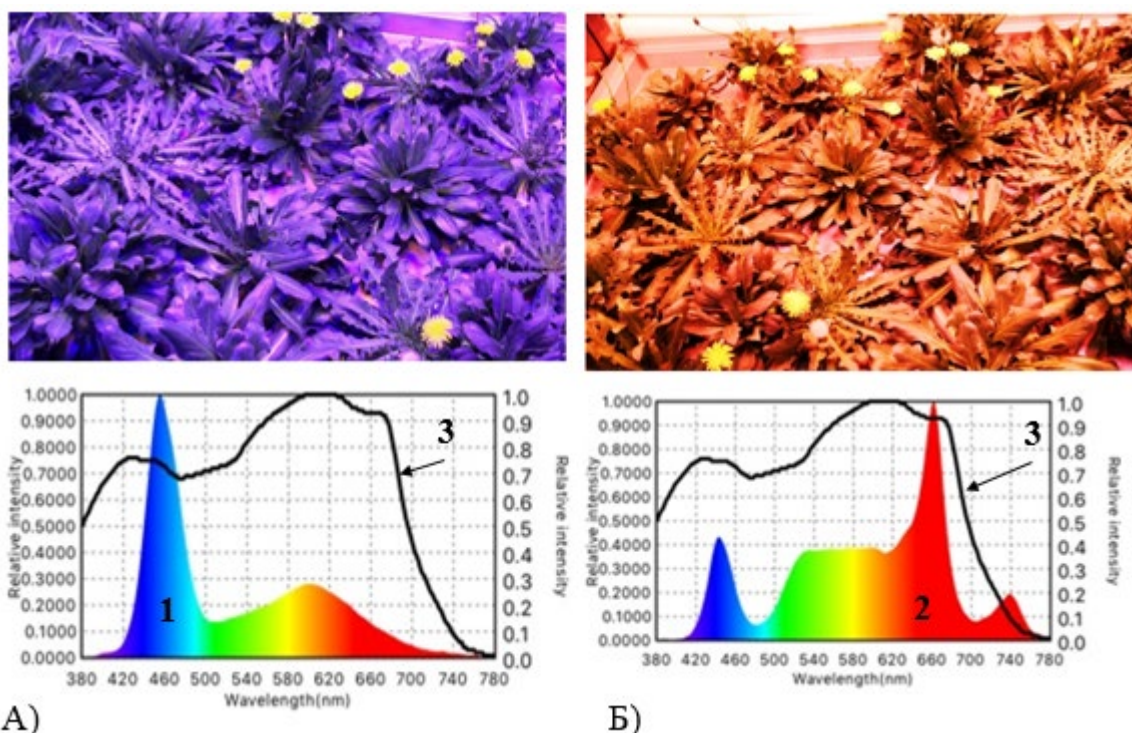


Рисунок 2.6 – Спектральные характеристики светодиодных облучателей при длительном выращивании растений кок-сагыза методом аэропоники в камерах аэропонного фитотрона А), Б): 1 – область ФАР₄₀₀₋₅₀₀ нм синего спектра, 2 – область ФАР₆₀₀₋₇₀₀ нм красного спектра, 3 – кривая зависимости интенсивности фотосинтеза от длины волны падающего света (спектр действия фотосинтеза по К. J. McCree).

В первой камере облучение в области ФАР₄₀₀₋₅₀₀ нм синего спектра ($\lambda_{\text{max}} = 460$ нм, СД СС) составляло $255,6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, в области ФАР₆₀₀₋₇₀₀ нм красного спектра ($\lambda_{\text{max}} = 660$ нм, СД КС) – $75,6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, соотношение КС/СС – 0,3 (Рисунок 2.6. А). Во второй камере интенсивность облучения КС в области ФАР₆₀₀₋₇₀₀ нм составляла $259,6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, интенсивность облучения в области ФАР₄₀₀₋₅₀₀ нм СС – $71,8 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, соотношение КС/СС 3,6 (Рисунок 2.6. Б).

При планировании эксперимента исходили из следующих условий. Согласно литературным данным, в дневные часы распределение энергии в области 400–480 нм составляет $239 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, а в области 600–700 нм – $187 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. В утренние и вечерние часы повышается доля красной и дальней красной составляющей спектра по сравнению с синей и распределение энергии в области 400–480 нм составляет $80 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; в те же часы в области 600–700 нм – $260 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. В результате соотношение энергии СС/КС составляет $80/260=0,3$. Исходя из вышеприведенного соотношения энергий при преобладании СС или КС следует, что при 16-часовом фотопериоде, примерно 8 часов в середине дня, больше синей составляющей в спектре облучения, остальное время, утром и вечером – красной составляющей в спектре облучения (Мартиросян и др., 2023).

Таким образом, при постановке эксперимента мы моделировали соотношение КС и СС в соответствии с естественными условиями в различные периоды светового дня, а также возможные динамические процессы при изменении соотношения КС/СС в течение дня.

2.2.5. Исследование влияния CO_2 -газообмена на физиолого-биохимические процессы и биосинтез каучука и инулина у растений *T. koksaghyz* R. в условиях аэропонного фитотрона

Температуру, относительную влажность, концентрацию CO_2 контролировали с помощью беспроводного датчика E+E EE244 («E+E Elektronik», Австрия), который был интегрирован в систему управления технологическими процессами в фитотроне. Концентрация CO_2 в воздухе в обеих камерах составляла $420 \pm 15 \text{ мкмоль/моль}$, влажность воздуха – 60–80%, температура – $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Спектральные режимы облучения растений определяли с помощью спектрометра ASEnSEtek PG100N («UPRtek Corp.», Тайвань). Измерения проводили в динамике (0, 1, 2, 3 ч) при стационарном световом режиме с преобладающим синим или красным светом, а также после смены

одного преобладающего света на другой. Скорость фотосинтеза исследовали с помощью инфракрасного газоанализатора CPro+ («ADC BioScientific Ltd.», Великобритания), что позволяло измерять и анализировать CO₂-газообмен непосредственно в камерах при заданных световых условиях выращивания растений. Зависимость скорости CO₂-газообмена от интенсивности света определяли в диапазоне от 0 до 1600 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ при концентрации CO₂ в воздухе 420±15 мкмоль/моль, последовательно повышая интенсивность света. Для описания световой кривой фотосинтеза использовали уравнение нерегулярной гиперболы (Prioul, Chartier, 1977).

2.2.6. Исследование влияния переменной флуоресценции на физиолого-биохимические процессы и биосинтез каучука и инулина у растений *T. kok-saghyz* R. в условиях аэропонного фитотрона

Активность фотосистемы II (ФС II) определяли методом переменной флуоресценции с помощью компактного минифлуориметра JUNIORPAM («Heinz Walz GmbH», Германия). Листья растений кок-сагыза оставляли в темноте на 15 мин, затем освещали вспышками света (Гольцев и др., 2014). Определяли функциональное состояние ФС II, максимальный квантовый выход ФС II, эффективный квантовый выход ФС II (при интенсивности измерения флуоресценции), нефотохимическое тушение флуоресценции (оценивает часть энергии, которая используется растением для нефотохимических реакций), относительную скорость транспорта электронов (косвенный показатель скорости фотосинтеза). Параметры флуоресценции рассчитывали, используя программу «WinControl».

2.2.7. Количественный анализ глюкозы и сахарозы в листьях *T. kok-saghyz* R.

Для количественного анализа глюкозы и сахарозы средние части (0,5 г) полностью развитых листьев кок-сагыза (без центральной жилки) гомогенизировали вручную в ступке с 4,5 мл воды, после чего

центрифугировали в течение 20 мин при 6000 об/мин (FC5718, «ОНАUS Corporation», США). Полученный экстракт использовали для оценки содержания водорастворимых низкомолекулярных сахаров. Предварительно было показано, что в осадке отсутствуют низкомолекулярные углеводы. При количественном определении концентрации глюкозы в качестве реактивов использовали стандартный набор Глюкоза-Ново («ВекторБест», Россия), предназначенный для анализа жидких субстратов. После добавления в экстракт реактивов смесь инкубировали в течение 20 мин при 50°C. Измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda = 508$ нм и $\lambda = 343$ нм с использованием спектрофотометра (UV2600, «Shimadzu», Япония) и рассчитывали концентрацию глюкозы. Использовали метод GOPOD (glucose oxidase peroxidase) с измерением интенсивности окраски раствора, возникающей в результате реакции хромогена с перекисью водорода, которая, в свою очередь, служит продуктом окисления глюкозы кислородом воздуха в присутствии глюкопероксидазы (Воробьев и др., 2013). При определении количества сахарозы в образце в экстракт добавляли фермент инвертазу (Available Carbohydrates Assay Kit, Megazyme cat. no. K-AVCHO, «Megazyme, Ltd.», Ирландия) для гидролиза сахарозы на глюкозу и фруктозу, затем инкубировали в течение 30 мин при 30°C и pH 6,5. После завершения реакции гидролиза проводили специфическое окрашивание глюкозы в растворе. Интенсивность окрашивания была обусловлена суммарным окрашиванием свободной глюкозы и глюкозы, образовавшейся при ферментативном гидролизе сахарозы. Для определения концентрации сахарозы вычисляли разницу между полученной концентрацией и определенной ранее концентрацией свободной глюкозы (McCleary, McLoughlin, 2021).

2.3. Оздоровление растений *T. kok-saghyz* R. от фитопатогенов

2.3.1. Выделение и идентификация патогенов *T. kok-saghyz* R.

При выращивании кок-сагыза как в условиях *in vitro*, так и при фитотронном выращивании мы столкнулись с проблемой заболевания растений. Оно характеризовалось потемнением корней и их быстрым отмиранием, потерей тургора листьями, что после микробиологических исследований было идентифицировано как симптомы бактериоза (Рисунок 2.7).

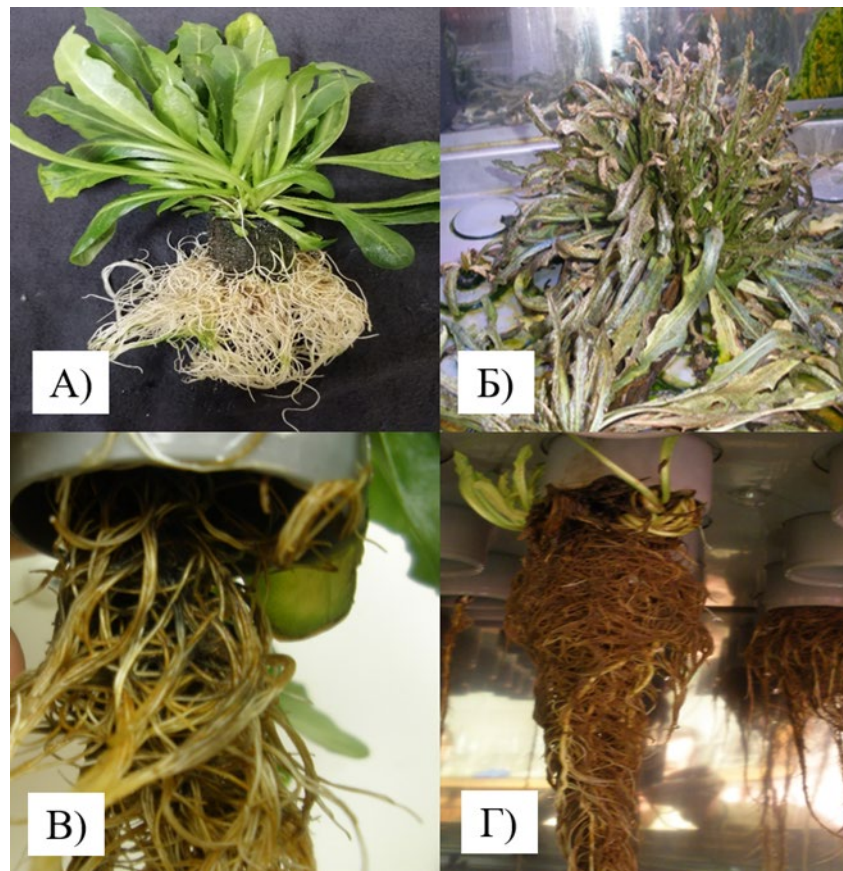


Рисунок 2.7 – Растения кок-сагыза с симптомами бактериоза, выращенные в условиях аэропонного фитотрона: А) контроль – оздоровленное растение; Б), В), Г) пораженные бактериями растения, растущие в аэропонном фитотроне

И в культуре *in vitro*, и при выращивании в фитотроне, растения с описанными симптомами быстро погибали. Обработка монопрепаратами антибиотиков и/или фунгицидов была малоэффективна, что

свидетельствовало о наличии резистентности у патогена, либо о наличии нескольких разных патогенов.

2.3.1.1. Выделение бактериальных патогенов *T. kok-saghyz* R.

Асептизацию поверхности корней растений и выделение бактерий из тканей корней проводили следующим образом. Инфицированные растения промывали стерильной водой и просушивали на воздухе. Далее на месте соединения корневой шейки с каудексом, где симптомы некроза были наиболее выражены, делали продольные срезы (толщиной 3–5 мм) стерильным скальпелем. Для поверхностной асептизации фрагменты корней кок-сагыза помещали в стерильные конические колбы 100 мл, содержащие 70% этанол, встряхивали на роторном шейкере 120 с. Для удаления остатков этанола растительный материал промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой. Далее его переносили в стерильные колбы, содержащие раствор гипохлорита натрия 5% (NaClO) на 60 с. Для удаления остатков NaClO растительный материал промывали 10 раз стерильной дистиллированной водой. Затем растительный материал снова помещали в раствор 6% H₂O₂ на 60 с. Для удаления остатков H₂O₂ растительный материал снова промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой. Процедуры асептизации и переноса проводили в ламинарном боксе II класса («TISSA-CR» МЧП-TCR-C-22, Беларусь).

Примерно 100 мг асептизированных корней каждого образца разрезали на мелкие части, помещали в стерильные микропробирки объемом 2 мл, со стерильными нержавеющей металлическими шариками диаметром 5 мм, для дальнейшей гомогенизации в TissueLyser LT («Qiagen», Нидерланды).

Далее измельченные в кашицу корни центрифугировали и с помощью автоклавированного автоматического дозатора 1 мл супернатанта переносили в стерильные пробирки 15 мл, добавляли 10 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки герметично закрывали и помещали на роторный шейкер (150 об/мин) при 25°C на 2 ч. Далее 100 мкл материала в трех повторностях

инокулировали на чашки Петри со средой и инкубировали при 28°C 120 часов. Колониеобразующие единицы выбирали из каждой чашки на основе их цвета, текстуры и морфологии.

Для оценки эффективности поверхностной асептизации около 100 мкл жидкости после последней промывки (для каждого анализируемого образца) высевали на питательную агаровую среду (Luria nutrient agar) и контролировали рост микроорганизмов.

Далее отобранные бактерии пересевали. Использовали богатую (г/л: пептон 10; дрожжевой экстракт 5; NaCl 10; агар 20) или солевую среду с пектином как единственным источником углерода, (г/л: яблочный пектин 10; K₂HPO₄ 1,15; NH₄NO₃ 1,0; KH₂PO₄ 0,625; MgSO₄•7H₂O 0,02; агар 20,0; pH 6,5). Чашки инкубировали при температуре 28°C в течение 72 ч. Для выделения отдельных клонов бактерии высевали на чашки Петри как с богатой, так и с минимальной средой.

2.3.1.2. Идентификация бактериальных патогенов *T. kok-saghyz* R.

При высеве на питательную среду LB (lysogeny broth) («Serva», США) пробы из гомогенизированной ткани, взятой из растений с внешними признаками бактериоза, были выделены потенциальные патогены. Им были даны условные обозначения – Ksz-1 и Ksz-2.

Бактерии были окрашены по Граму: фиксированный мазок покрывали кусочком фильтровальной бумаги и наносили карболовый раствор генцианового фиолетового на 1–2 мин, затем бумагу снимали, краситель сливали и, не промывая препарат водой, обрабатывали его раствором Люголя до потемнения (1 – 2 мин), раствор Люголя сливали, окрашенный мазок обесцвечивали 96% этиловым спиртом не более 30 с (препарат несколько раз помещали в стакан со спиртом до прекращения отхождения фиолетовых струек) и промывали дистиллированной водой; мазок дополнительно окрашивали водным раствором фуксина на протяжении 1–2 мин, далее краситель сливали, препарат промывали дистиллированной водой и

высушивали фильтровальной бумагой. Микроскопирование проводили с помощью Levenhuk 720B (Levenhuk, США). Грамположительные бактерии окрашиваются в фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый.

Для выяснения возможной патогенности проводили анализ на пектиназную активность (Таблица 2.2)

Таблица 2.2 – Состав среды для проверки бактерий на пектиназную активность

Компонент	Содержание, г/л
Источник углерода*	10
K ₂ HPO ₄	1,15
NH ₄ NO ₃	1,0
KH ₂ PO ₄	0,625
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,02
Агар	6,3

*Все эксперименты проводились на плотных минимальных питательных средах, содержащих яблочный или цитрусовый пектин («Sisco Research Laboratories», India) или натриевую соль полигалактуроновой кислоты («Sigma-Aldrich», США) в качестве единственного источника углерода.

2.3.1.2.1. Биохимическая идентификация бактериальных патогенов *T. kok-saghyz* R.

Согласно рекомендациям производителя, была проведена биохимическая идентификация патогенов с использованием аналитических тестов API 20NE и 10S («Biomerieux», Франция). Они облегчают идентификацию грамотрицательных палочковидных бактерий, не принадлежащих к *Enterobacteriaceae*. Полоска API 20 NE состоит из микропробирок, содержащих обезвоженную среду и субстраты. Если бактерии способны использовать соответствующий субстрат, то они будут расти на нем, изменяя цвет и оптическую плотность среды. Микропробирки инокулируются бактериальной суспензией, которая восстанавливает среду. После инкубации конечные продукты метаболизма обнаруживаются с

помощью индикаторных систем или путем добавления реагентов. 1–4 колонии одинаковой морфологии ресуспендировали в 2 мл API 0,85% физиологического раствора, в стерильной пробирке. Все тесты (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG, NO₃, TRP и т. д.) проводили, согласно описанию в руководстве производителя. Для идентификации организмов использовали программное обеспечение APIWEB™. API 10 S («Biomérieux», Франция) – это качественная стандартизированная система, предназначенная для идентификации *Enterobacteriaceae* и других грамотрицательных палочковидных бактерий. Протокол API 10 S аналогичен протоколу, описанный выше. Все тесты так же проводились в соответствии с руководством производителя.

2.3.1.2.2. Молекулярно-генетическая идентификация бактериальных патогенов *T. kok-saghyz* R.

Для более глубокой идентификации вида Ksz-1 и Ksz-2 были выполнены ПЦР-амплификация и секвенирование варибельной области 16S рДНК (Yamamoto, Narayama, 1998), с использованием консервативных праймеров 8f – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG и 926r – CCGTCAATTCCTTTAGAGTTT. Амплификацию проводили следующим образом: денатурация при 95°C в течение 3 мин, затем 35 циклов при 95°C в течение 30 с, отжиг при 57°C в течение 30 с и элонгация при 72°C в течение 1 мин 30 с финальным удлинением при 72°C в течение 5 мин. Частичные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК определяли непосредственно из фрагментов ПЦР по методу Эдвардса и др. (Edwards et al., 1989).

Для дальнейшей характеристики видов *Pseudomonas* (Ksz-1) была проведена ПЦР-амплификация фрагментов варибельных генов *gyrB* и *rpoD* (Yamamoto, Narayama, 1998; Yamamoto et al., 2000) с использованием консервативных пар праймеров. Идентификация по 16S рДНК (как и результаты API-теста) не дали однозначного ответа относительно видовой принадлежности изолята Ksz-1, хотя и указали на то, что это род *Pseudomonas*,

и пришлось использовать дополнительные дифференцирующие молекулярные маркеры для этого рода. GGAGCAGTACATCAAGGACGA/GGGTCCATGGTGGTTTCCCACA для *gyrB*. CCTCCGAAGGTGGCCGTCTGTC/ ACATGCGCAGGAAGTCGGCACG для *rpoD*.

GyrB кодирует субъединицу В ДНК-гиразы, *rpoD* – сигма-фактор РНК-полимеразы. Амплификация проводилась аналогично описанной выше. Амплифицированные фрагменты ДНК очищали в геле с помощью набора для экстракции из геля QIAquick («Qiagen», Нидерланды) и клонировали в плазмиду pAL2_T («Евроген», Россия). Нуклеотидные последовательности клонированных ДНК определяли с использованием плазмидоспецифичных праймеров SP6 – ATTTAGGTGACACTATAGAATACT и T7 – GTAATACGACTCACTATAGGG. Идентификацию вида *Raoultella* (Ksz-2) проводили аналогичным образом. Для сравнения определенных последовательностей с данными GenBank использовалось программное обеспечение BLASTn.

ДНК из бактериальных колоний выделяли с помощью набора EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit («TransGen Biotech», Китай). ПЦР-анализ проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США) и набора 5X ScreenMix-HS («Евроген», Россия), а визуализацию продуктов ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в электрофорезной камере SE-1 («Helicon», Россия) в 1×TAE буфере с использованием трансиллюминатора (TCP-20.MC, «Vilber», Германия). Ампликоны выделяли и очищали с помощью набора Cleanup Mini («Евроген», Россия). Секвенирование полученных участков проводили в коммерческой компании (ООО «НПФ Синтол», Россия).

2.3.1.3. Подтверждение патогенности выделенных бактерий способом искусственного заражения

Для подтверждения факта патогенности проводили инокуляцию выделенными бактериями следующих объектов: культуры изолированных корней с фенотипом «*hairy roots*», растений кок-сагыза *in vitro*, оздоровленных и выращенных из семян без предварительного оздоровления, растений в вегетационных сосудах. Инокулят готовили из бактерий, выращенных на чашках Петри со средой LB («Serva», США) в течение 24 часов. Далее из выращенных бактерий готовили инокуляционную среду. После ресуспендирования бактерий в 10 мМ MgCl_2 добавляли Silwet L-77 («PhytoTechnology Laboratories», США) в конечной концентрации 200 мкл $\times$ л $^{-1}$. В конечном счете концентрация бактерий в инокуляционной жидкости составляла $\text{OD}_{600}=0,05$ (приблизительно $2,5\times 10^7$ колониеобразующих единиц на мл (КОЕ мл $^{-1}$)).

Фрагменты оздоровленных корней «*hairy roots*» и интактные *in vitro* растения были помещены в конические колбы объемом 100 мл, содержащие 50 мл 10 мМ раствора MgCl_2 и суспензию бактерий. Колбы помещали в вакуумную систему, состоящую из вакуумной камеры (Микроаназростат МИ, 752) и вакуумного насоса (Millipore, XX5522050), и проводили вакуумирование в режиме 0,8 атм., 120 с. Далее корни и растения трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Промытые инфицированные корни помещали в чашки Петри, а растения в фитоконтейнеры на агаризованную среду прописи Мурасиге-Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962), не содержащую углеводов (единственным источником углерода являлись корни кок-сагыза). Инкубацию чашек проводили в термостате при 28°C, в течение 10 суток, фитоконтейнеров – 3 суток. Количество повторностей – 10.

Далее чашки извлекали, размещали на световых стеллажах при интенсивности света 100 мкмоль $\cdot$ м $^{-2}\cdot$ с $^{-1}$ на 25 суток. Фитоконтейнеры размещали на световых стеллажах на 32 суток. В качестве контроля использовали чашки с неинфицированными изолированными корнями «*hairy*

roots» на среде MS и с культурами бактерий на безуглеродной среде MS, фитоконтейнеры – с оздоровленными растениями соответствующего возраста на полной среде MS.

В вегетационных экспериментах растения выращивали в почвогрунте, в вегетационных сосудах, на открытом воздухе, в условиях окружающей среды (условия указаны в таблице 2.1). В варианте №1 (контроль) оздоровленные растения в процессе роста суспензией выделенных бактерий не обрабатывались. В варианте № 2 оздоровленные растения в процессе роста обрабатывались суспензией выделенных бактерий, однократным поливом под корень и опрыскиванием листьев. В варианте № 3 для экспериментов использовали интактные растения, полученные из семян, не подвергавшихся химиотерапии (обработке антибиотиками и фунгицидами). Эти растения обрабатывались так же, как в варианте № 2. Концентрация инокулята – как указано выше. Обработка экспериментальных растений инокулятами бактерий была проведена в первой декаде июня.

2.3.2. Способы оздоровления растений *T. kok-saghyz* R. от идентифицированных патогенов

2.3.2.1. Подбор антибиотиков и исследование их активности в отношении выделенных патогенов *T. kok-saghyz* R.

Стратегия получения оздоровленного растительного материала кок-сагыза включала в себя исследование эффективности антибиотиков. Так как было выявлено несколько патогенов кок-сагыза, то было предположено, что для оздоровления растений необходимо комбинирование антибиотиков различного механизма действия. Перед исследованием воздействия антибиотиков на растениях был проведен ряд исследований их эффективности и активности против конкретных патогенов кок-сагыза.

Для установления эффективности антибиотиков применяли метод спектрофотометрии. В работе использовали спектрофотометр (xMark, «Bio-

Rad», США) и 96-луночный планшет («Corning», США). В лунки вносили суспензии бактерий по 50 мкл с $OD_{600}=0,2$. Далее в верхний ряд в каждую из 12 лунок добавляли исследуемые антибиотики в максимальной концентрации. После этого из первого ряда лунок брали по 50 мкл бактериальной суспензии, переносили в следующий ряд и ресуспендировали, таким образом, в каждой следующей лунке концентрация антибиотика уменьшалась в два раза. Перечень и концентрации исследуемых антибиотиков описаны в таблице 2.3. В качестве положительного контроля использовали бактериальную суспензию без добавления антибиотиков. Далее планшет переносили на шейкер (Innova 44/44R, «New Brunswick Scientific», США) и культивировали бактерии в течение 12 часов при 27°C. Наличие бактерий определяли по оптической плотности раствора при длине волны 600 нм.

Таблица 2.3 – Подбор минимальных действующих концентраций антибиотиков на выделенные бактериальные патогены кок-сагыза

	Цефотаксим	Стрептомицин	Цефазолин	Сульбактам	Карбенициллин	Хлорамфеникол	Канамицин	Меропенем	Тиментин	Рифампицин	Гентамицин	Гигромицин
Конц. в сток. р-ре	100 мг/мл	100 мг/мл	100 мг/мл	100 мг/мл	25 мг/мл	50 мг/мл	100 мг/мл	100 мг/мл	100 мг/мл	50 мг/мл	25 мг/мл	10 мг/мл
Макс. конц., мг/л	1000	1000	1000	1000	250	250	500	500	500	250	500	250
Разбавление 1	500	500	500	500	125	125	250	250	250	125	250	125
Разбавление 2	250	250	250	250	62,5	62,5	125	125	125	62,5	125	62,5
Разбавление 3	125	125	125	125	31,25	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25
Разбавление 4	62,5	62,5	62,5	62,5	15,6	15,6	31,3	31,3	31,3	15,6	31,3	15,6
Разбавление 5	31,3	31,3	31,3	31,3	7,8	7,8	15,6	15,6	15,6	7,8	15,6	7,8
Разбавление 6	15,6	15,6	15,6	15,6	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	3,9	7,8	3,9

Далее эффективные антибиотики и их сочетание проверяли на растениях с признаками бактериальной инфекции с помощью культивирования растений *in vitro* на питательной среде, содержащей антибиотики, в течение 3 суток, а также обработкой растений в фитотронах.

2.3.2.2. Получение бактериофагов против выделенных патогенов *T. kok-saghyz* R.

Для чистых культур выделенных патогенов был проведен поиск бактериофагов с использованием накопительных культур. В качестве источника были взяты сточные воды из очистных сооружений поселка Горки Ленинские, Ленинский район, Московская область (55.494032404583166, 37.76598392711509).

Получение и тестирование бактериофагов проводили согласно протоколу, описанному в статье Mazzocco A. и соавторов. Для удаления бактериальной фракции их центрифугировали при 4000 rpm в течение 10 минут, затем супернатант пропускали через шприцевые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Merk Millipore; США) и использовали для приготовления среды LB в объеме 100 мл. Затем в данную среду инокулировали 10 мл ночной чистой культуры выделенного патогена с $OD_{600} = 0,5$ и инкубировали в шейкере-инкубаторе при 37°C в течение 12 часов. Далее суспензию центрифугировали 10 минут при 4000 rpm, после фильтровали с использованием шприцевых фильтров с диаметром пор 0,22 мкм (Mazzocco et al., 2009).

Спектр литической активности бактериофагов устанавливали методом спот-тестирования, для этого в 5 мл агаризованной среды LB (0,75% агара) добавляли 100 мкл ночной культуры исследуемого патогена с $OD_{600}=0,5-0,6$ и наносили на чашки Петри, содержащие тонкий слой агаризованной среды LB (1,5% агара). После просыхания на данные чашки Петри наносили по 5 мкл серийных разведений растворов бактериофагов для их тестирования. Чашки инкубировали в термостате течение 12 часов при 37°C.

Литическую активность бактериофага определяли по наличию негативных колоний. Наличие полупрозрачного ареола вокруг зоны лизиса или единичной колонии бактериофага интерпретировали как полисахарид-деполимеразную активность бактериофага (Mazzocco et al., 2009).

Для дальнейшего использования подготавливали суспензию фаговых частиц. В 500 мкл стерильного SM-буфера (sodium chloride/magnesium sulfate buffer) вносили 50 мкл хлороформа и часть верхнего агара, взятую стерильной бактериальной петлей с чашки Петри в зоне негативной колонии, и ресуспендировали. Полученную суспензию хранили в холодильнике при +4°C.

2.3.2.3 Анализ оздоровленных растений *T. kok-saghyz* R. на наличие идентифицированных патогенов

Для подтверждения факта оздоровления растений кок-сагыза от идентифицированных патогенов применяли ПЦР-анализ с использованием специфических праймеров: 5'-AGATTGCTGGGGCCGCTTTGCG-3' и 5'-TTTТАСААААСАААСGATAGGCCCG-3' для Ksz-1, 5'-CCGGTGCGT TATCGATCTGGTC-3' и 5'-ATGACAACGAGCCGTTTGCTGC-3' для Ksz-2. Режимы амплификации: 95°C – 5 мин (горячий старт – денатурация), 95°C – 30 сек (денатурация), 60°C – 30 сек (отжиг), 72°C – 2 мин (элонгация) × 35, 72°C – 5 мин.

ПЦР-анализ проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США) и набора 5X ScreenMix-HS («Евроген», Россия), а визуализацию продуктов ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в электрофорезной камере SE-1 («Helicon», Россия) в 1× TAE буфере с использованием системы гель-документирования Gel Doc XR+ («Bio-Rad», Германия) и программного обеспечения «Image Lab» («Bio-Rad», Германия).

2.4. Введение *T. kok-saghyz* R. в культуру *in vitro* и дальнейшее микрклональное размножение

2.4.1. Введение *T. kok-saghyz* R. в культуру *in vitro*

Для введения кок-сагыза в культуру *in vitro* использовали листовые и корневые экспланты. Поверхностную асептизацию эксплантов проводили в

условиях ламинарного бокса («TISSA-CR» МЧП-TCR-C-22, Беларусь) погружением в 70% этанол на 2 мин и в 10% раствор перекиси водорода на 10 мин. После асептизации материал трижды промывали стерильной дистиллированной водой и помещали в чашки Петри на питательную среду MS. Для подавления эндогенных патогенов в культуральную среду MS добавляли антибиотики, показавшие эффективность, согласно данным таблиц 3.9 и 3.10.

2.4.2. Получение каллуса и регенерантов *T. kok-saghyz* R.

Для изучения влияния гормонального состава питательной среды на эффективность каллусогенеза у кок-сагыза экспланты пересаживали на среду MS с добавлением комбинации фитогормонов и регуляторов роста в разных концентрациях – α -нафталинуксусной кислоты (НУК) («Serva», США) в качестве ауксина и 6-бензиламинопурина (6-БАП) («Serva», США) в качестве цитокинина.

Культивирование проводили при температуре 25–26°C, 16-часовом световом периоде, интенсивности освещения 100–120 мкмоль·м⁻²·с⁻¹. Каждые 2 недели экспланты пересаживали на свежую среду, результаты оценивали через 6 недель.

Через 6 недель каллусы, разделенные на фрагменты массой 50±10 мг, были пересажены на среду MS с добавлением 6-БАП, тидиазурина (ТДЗ) («Serva», США) и кинетина (КИН) («Serva», США) в разных концентрациях. Далее, через 30 суток культивирования, образовавшиеся побеги отделяли от каллусов и пересаживали для доращивания.

Для последующего укоренения регенеранты пересаживали на питательную среду ½MS с добавлением НУК, индол-3-уксусной кислоты (ИУК) («Serva», США) и индол-3-масляной кислоты (ИМК) («Serva», США) в различных концентрациях. Через 30 суток определяли количество укоренившихся растений на данных средах.

2.4.3. Исследование влияния антиоксидантного свойства глутатиона на физиологическое состояние каллусных масс *T. kok-saghyz* R. в культуре *in vitro*

Для исследования влияния пептида с антиоксидантными свойствами глутатиона (GSH), на рост каллусной ткани экспланты пересаживали на среду MS с 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л НУК, дополненную GSH в различной концентрации (Мартиросян и др., 2022).

Растворы GSH («Sigma-Aldrich», Германия) стерилизовали с помощью стерильного фильтра 0,22 μ («Millipore», Германия) и добавляли в питательную среду MS в концентрации 1 мМ, 2 мМ и 4 мМ GSH. В контейнеры со средой высаживали фрагменты каллуса кок-сагыза около 5 мм в диаметре. Анализ приготовленных образцов проводили через 3, 7 и 10 суток после помещения каллуса на среды, содержащие GSH (Мартиросян и др., 2022).

Для приготовления вытяжек растений и проб среды выращивания образец каллуса, либо образец культивационной среды, массой 220 мг, в течение 5 минут растирали в ступке совместно с 4 мл фосфатного буфера («МиниМед», Россия), pH 6,8. Инкубировали в течение 5 минут при 22°C, при перемешивании, и центрифугировали («Eppendorf 5702R», Германия) в течение 20 мин при 3000 об./мин. В супернатанте (экстракте) спектрофотометрически определяли содержание GSH и гидроксикоричных кислот (ГК) (Мартиросян и др., 2022).

Для определения концентрации GSH, 0,5 мл полученного экстракта добавляли к 2,5 мл 0,1 мМ раствора реактива Эльмана в фосфатном-солевом буферном растворе PBS, pH 7,4 («Sigma-Aldrich», Германия). Оптическую плотность полученной смеси измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» (ООО «ОКБ Спектр», Россия) при 412 нм относительно раствора PBS (2,5 мл). Концентрацию GSH (в моль/г) рассчитывали с учетом разбавления и коэффициента экстинкции 2-нитро-5-тиобензойной кислоты (ϵ): $\epsilon = 0,14 \times 10^5 \text{ л} \times (\text{моль} \times \text{см})^{-1}$ (Мартиросян и др., 2022).

Оценку содержания ГК (кофейная, кафтаровая, хлорогеновая) проводили на основании поглощения при 330 нм в УФ спектре поглощения экстракта по методике (Куркин, Азнагулова, 2017). К 0,5 мл экстракта добавляли 2,5 мл воды и измеряли оптическую плотность при 330 нм относительно воды. Концентрацию ГК (в моль/г) рассчитывали с учетом разбавления в пересчете на кофейную кислоту, для которой $\varepsilon = 0,16 \times 10^5 \text{ л} \times (\text{моль} \times \text{см})^{-1}$ (Мартиросян и др., 2022).

2.5. Агробактериальная трансформация *T. kok-saghyz* R.

2.5.1. Получение культуры «*hairy roots*» *T. kok-saghyz* R.

Трансформацию кок-сагыза проводили, основываясь на протоколе, описанном в статье Zhang Y. и соавторов. Для трансформации был использован штамм агробактерий *R. rhizogenes* 15834 SWISS. Бактериальная культура выращивалась 12 часов в среде YEB (yeast extract broth) при 23°C в темноте в шейкере-инкубаторе («New Brunswick», США) при 90 об/мин. Далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием 10 мин. при 10 000 об/мин, затем осажденные бактерии ресуспендировали в среде MS с добавлением 100 мкМ ацетосирингона («HiMedia Laboratories», Индия).

Полученную суспензию разливали в чашки Петри, куда для кокультивации помещали листовые пластинки кок-сагыза с предварительно нанесенными на внешнюю сторону стерильным скальпелем небольшими механическими повреждениями, в количестве 10 эксплантов на чашку. Чашки с листовыми пластинками инкубировали при 23°C в темноте, на шейкере (50 об/мин) в течение 12 ч (Zhang et al., 2015, Мартиросян Л. Ю. и др. 2022).

После кокультивации листовые пластинки промакивали стерильной фильтровальной бумагой и переносили на чашки Петри с агаризованной средой MS с добавлением НУК (0,5 мг/л) и 6-БАП (0,5 мг/л) и 1000 мг/л цефотаксима для элиминирования агробактерий. Помимо цефотаксима в среду добавляли селективный антибиотик канамицин в начальной

концентрации 100 мг/л, т. к. штамм 15834 SWISS имеет к нему устойчивость. Чашки размещали на световых стеллажах, освещенность составляла 80 ммоль/м²с, фотопериод – 16 ч/сут., температура 24 ± 1°C. Каждые 7 суток культивирования экспланты переносили на среду того же состава, но с сокращенной на 20% концентрацией антибиотиков. На 35-е сутки культивирования экспланты пересаживали на среду без цефотаксима и канамицина (Мартиросян Л. Ю. и др. 2022).

Подтверждение факта успешной трансформации проводили с помощью ПЦР-анализа. Для выделения и очищения ДНК из корней трансформированных растений массой 150 ± 20 мг использовали набор «GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit» («Thermo Fisher Scientific», США). В качестве отрицательного контроля брали корни интактных растений кок-сагыза.

ПЦР-анализ проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler, Bio-Rad (США) и набора «5X ScreenMix-HS» («Евроген», Россия). Для ПЦР-анализа на наличие генов *rolA* и *rolC* использовали праймеры 5'-CAGACCTTCGGAGTATTATCGC-3' и 5'-AATCCCGTAGGTTTGTTCG-3' для *rolA*, 5'-ATGGCTGAAGACGACCTGTGTTCTC-3' и 5'-TTAGCCGATTGCAAACCTTGCACTCGC-3' для *rolC*. Для доказательства отсутствия агробактериальной контаминации проводили дополнительный ПЦР-анализ на наличие *vir*-генов *R. rhizogenes* при помощи праймеров 5'-CCAAGATGTCTCGTCGACGGATCAGAC-3' и 5'-GAATAATTCCAAGCGCAGCCTGCG-3' для *virA* и праймеров 5'-GGTCTATCTACCCTACGTCGGGC-3' и 5'-CACGGAAGTTGGAGAAGCCCTGC-3' для *virB*. Режимы амплификации: 95°C – 5 мин (горячий старт – денатурация), 95°C – 30 сек (денатурация), 60°C – 30 сек (отжиг *rolA*, *virA*, *virB*) / 55°C – 30 сек (отжиг *rolC*), 72°C – 60 сек (элонгация) × 35, 72°C – 5 мин. Визуализацию результатов ПЦР-анализа проводили аналогично протоколу, описанному в разделе 2.2.4. с использованием (ТСР-20.МС, «Vilber», Германия). На основании результатов

ПЦР были отобраны трансформированные образцы корней, с которыми и продолжилась дальнейшая работа.

На 35-е сутки полученные на чашках Петри корни стерильно изолировали и переносили в колбы объемом 100 мл с 20 мл жидкой среды MS, дополненной 30 г/л сахарозы, без антибиотика и регуляторов роста и культивировали при $24 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте на шейкере (90 об/мин) (Рисунок 2.8. А). Для изучения ростовых характеристик полученных трансформированных корней полный цикл культивирования составлял 70 суток. Сначала корни с начальной массой 0,5 г помещали в колбу объемом 100 мл, содержащую 20 мл среды MS, дополненной 30 г/л сахарозы, и культивировали 14 суток (Рисунок 2.8. Б).

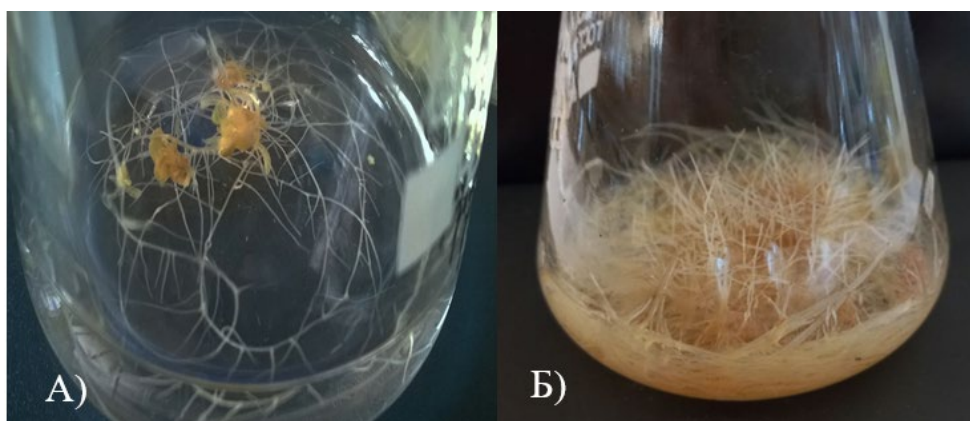


Рисунок 2.8 – Рост трансформированных корней кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*» в жидкой среде: А) инициация роста и развития корней из эксплантов; Б) корни спустя 2 недели культивации

Затем корни переносили в колбу объемом 300 мл, содержащую 80 мл среды, через 7 суток доводили объем стерильной среды в той же колбе до объема 120 мл и культивировали еще 7 суток. После этого подросшие корни переносили в колбу объемом 500 мл, содержащую 150 мл среды и культивировали 7 суток. Затем корни снова переносили в колбу объемом 750 мл с 200 мл питательной среды MS, а еще через неделю в колбу на 1000 мл, содержащую 300 мл среды MS.

2.5.2. Изучение ростовых характеристик «hairy roots» *T. kok-saghyz* R. и содержания в них каучука и инулина

Для изучения ростовых характеристик полученных трансформированных корней цикл культивирования составлял 70 суток.

Рост культуры косматых корней характеризовали по показателю индекса роста (I) по следующей формуле:

$$I = (X_{\text{кон}} - X_0) / X_0,$$

где $X_{\text{кон}}$ – масса конечная (г),

X_0 – масса начальная (г).

Индекс роста оценивали раз в 7 суток (Рисунок 2.9). Перед взвешиванием корни подсушивали в течение 10 мин на фильтровальной бумаге (Мартиросян и др., 2023).

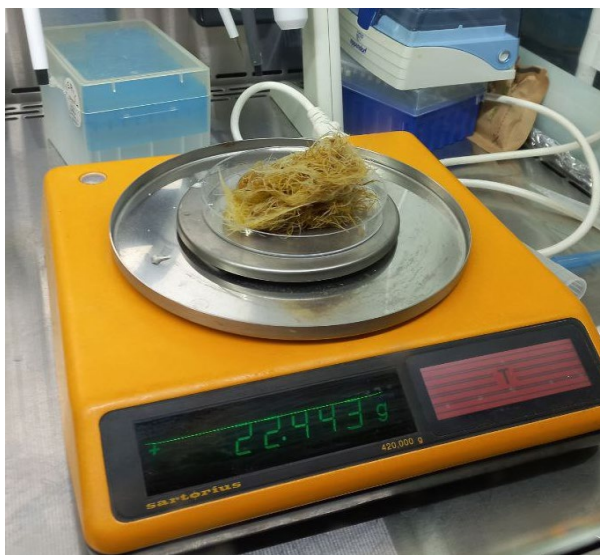


Рисунок 2.9 – Процесс взвешивания корней кок-сагыза в стерильных условиях ламинар-бокса

2.5.3. Получение регенерантов из «hairy roots» *T. kok-saghyz* R.

Для получения растений-регенерантов из «hairy roots» корни массой порядка 1–1,5 г из жидкой среды стерильно извлекали и сажали на

агаризованную среду MS, не содержащую фитогормоны и регуляторы роста. Для стимуляции регенерации на корни наносили небольшие порезы стерильным скальпелем. Культивирование проводили при 23 ± 1 °C с фотопериодом 16/8 часов и интенсивности света $80 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ в течение двух месяцев. Пересадку на среду аналогичного состава проводили каждые 7 суток в течение 2 месяцев.

2.6. Полиплоидизация *T. kok-saghyz* R.

2.6.1. Полиплоидизация семян *T. kok-saghyz* R.

В качестве антимитотика использовали колхицин («Duchefa Biochemie», Нидерланды). Колхицинирование семенного материала кок-сагыза проводили согласно протоколу, описанному в статье Luo Z. с соавторами. Семянки кок-сагыза асептизировали согласно методике, описанной в разделе 2.4.1, а затем замачивали в растворе колхицина с концентрацией 0,001%, 0,01% и 0,1% и оставляли в темноте. Через 12–72 часов семена пересаживали на среду MS и каждые 2 недели переносили на свежую среду (Luo et al., 2018).

2.6.2. Полиплоидизация каллусных масс *T. kok-saghyz* R.

Фрагменты каллусных масс кок-сагыза размером около 50 мг, по аналогии с протоколом Głowacka K. и соавторов, высаживали на среду MS, дополненную колхицином в различных концентрациях (0,001%, 0,01% и 0,1%) и содержащую 0,5 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л НУК. После 12–72 часов в темноте каллус пересаживали на свежую среду с фитогормонами и регуляторами роста, но без колхицина. Каждые 2 недели каллус переносили на свежую среду, а через месяц получали регенеранты (Głowacka et al., 2010).

2.6.3. Определение пloidности *T. kok-saghyz* R.

2.6.3.1. Метод проточной цитометрии

После колхицинирования определяли жизнеспособность растений и их плоидность. Плоидность растений определяли с помощью проточного цитометра CyFlow Space («Sysmex», Япония), для окрашивания ядер использовали набор для выделения и окрашивания ядер CyStain UV Precise T («Sysmex», Япония), согласно рекомендации производителя.

Размер генома растений определяли путем измерения количества ядерной ДНК. Образцы свежих листьев, примерно по 1 см², полиплоидного и контрольного (диплоидного, как принято считать) растения кок-сагыза измельчали в 1 мл буфера для экстракции (0,1 М лимонной кислоты («Lach-Ner», Ltd. Чехия), 0,5% Твин-20 («Serva», Германия)). Далее фильтровали через фильтр 50 мкм (CellTrics, «PARTEC», Германия) и добавляли в экстракт 1 мл раствора флуоресцентного красителя DAPI (0,4 М динатрийфосфата, 0,2 М NaCl и 5 мг л⁻¹ DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) («Thermo Fisher Scientific», США). Далее проводили измерения на приборе CyFlow Space («Sysmex», Япония).

Плоидность определяли по индексу разницы между пиками диплоидного стандарта и исследуемого образца. Индекс плоидности считали по формуле: индекс плоидности = среднее пиковое значение образца/стандартное пиковое значение (диплоидного образца) (Domblides et al., 2022)

Полиплоидные саженцы сохраняли и повторно тестировали через 4 месяца, аналогично описанной методике. Те саженцы, которые дважды оценивались как полиплоидные, выращивали в течение нескольких месяцев и оценивали по морфологическим и биохимическим характеристикам.

2.6.3.2. Метод подсчета хромосом на давленных препаратах

Для приготовления препаратов методом давленных хромосом с помощью скальпеля от молодых растений отрезали кончики корней (приблизительно 3 мм). Далее кончики корней на 20 часов погружали в

ледяную воду, чтобы увеличить частоту образования метафазных клеток. Затем корни перемещали в смесь этанола и уксусной кислоты (3:1) при 22°C на 2 суток.

Спустя 48 часов корни промывали в ледяной воде в течение 5 минут и переносили в 0,01 М цитратный буфер (0,01 М лимонной кислоты + 0,01 М цитрата натрия, pH 4,8), промывая корни встряхиванием в течение 5 минут. Затем корни высушивали на фильтровальной бумаге.

После кончики корней выдерживали в ферментной смеси (целлюлаза R10 0,7% целлюлаза 0,7%, пектолиаза 1% и цитохеликаза 1%, разведенные в 0,01 М цитратном буфере) при температуре 37°C в течение примерно 50 минут. Далее корни промывали 0,01 М цитратным буфером на льду.

Перед фиксацией корни дважды промывали 96% этиловым спиртом, затем свежеприготовленным фиксатором (75% уксусной кислоты, 25% этилового спирта). Использовали 10–15 мкл фиксатора на один кончик корня. Корни вместе с фиксатором переносили в пробирку объемом 2 мл и разделяли корневые меристемы с помощью препаровальной иглы. Для получения суспензии по пробирке постукивали около 20 раз.

Несколько слоев пропитанной водой бумажной салфетки помещали на разогретую до 50°C плиту. Предметные стекла опускали в холодную проточную воду и ставили в холодильник на 30 минут. Затем предметные стекла клали поверх влажной бумажной салфетки. С помощью механического дозатора 7–10 мкл полученной суспензии наносили на охлажденное предметное стекло, установленное на нагревательной плите. Затем к суспензии добавляли 10 мкл смеси уксусной кислоты и этанола и держали предметное стекло на горячей поверхности еще 2 минуты. Далее стекло убрали с салфетки и просушивали (Aliyeva-Schnorr et al., 2015). Полученные препараты исследовали под микроскопом Axio Imager A2 с использованием объектива 20×, подсчет хромосом и их фотофиксацию – с объективом 100× с масляной иммерсией («Carl Zeiss», Германия).

2.6.3.3. Метод подсчета хлоропластов в замыкающих клетках устьиц

Листья колхицинированных растений кок-сагыза возрастом 4 недели отделяли и извлекали из условий *in vitro*, а затем промывали дистиллированной водой. С помощью скальпеля снимали тонкий слой с абаксиальной поверхности листьев, который помещали на предметное стекло в каплю воды и закрепляли красителем (йодид калия в соотношении 1:3 с дистиллированной водой). Далее препарат накрывали покровным стеклом и просматривали под флуоресцентным микроскопом Axio Imager A2 набором фильтров 14: EX BP 510/560, BS FT 580, EM LP 590 («Carl Zeiss», Германия), с использованием объективов 20× и 100× (с масляной иммерсией). Подсчитывали хлоропласты, демонстрирующие сильную автофлуоресценцию в красном цвете с пиком примерно 680 нм.

С помощью объектива 20× подсчитывали количество устьиц в поле зрения микроскопа (не менее пятикратной повторности). С помощью объектива 100× с масляной иммерсией подсчитывали количество хлоропластов, расположенных в двух замыкающих клетках устьиц (10-кратная повторность для каждого растения) (Монахос и др., 2014; Domblides et al., 2022).

2.7. Метод периодической срезки корней *T. kok-saghyz* R.

С целью увеличения сбора биомассы корней нами была разработана методика периодической срезки корней кок-сагыза, растущего в условиях аэропонного фитотрона. Корни растений возрастом 6–8 недель срезали на расстоянии 60–70 мм от корневой шейки. Срезы обрабатывали путем орошения (через систему полива) растворами, содержащим антисептические компоненты. Первый раствор – перекись водорода (0,5–1%) или надуксусная кислота (0,05–0,15%). Второй раствор – перманганат калия (0,05–0,1 %). Третий раствор применяли для восстановления регенерационной способности

корней, он содержал ИМК (0,1–3 мг/литр) и культуральную жидкость дрожжей *Nadsoniella nigra* (0,05–0,2 мл/литр). Длительность обработки колебалась от 3 до 30 минут.

Далее растения помещали в темноту, выключая свет на 1 сутки, влажность поддерживали на уровне 85–90% с помощью автоматического периодического увлажнения стеблевой зоны растворами, содержащими источники азота в амидной форме («AMIDAS», «Yara», Норвегия), комплекс микроэлементов в хелатной форме («REXOLIN APN», «Yara», Норвегия). С восстановлением роста корневой системы растения переводили в прежний режим выращивания, описан в разделе 3.8. Через 30–35 суток, когда длина корней достигает 500–700 мм, проводили очередную срезку корней. Была проанализирована скорость отрастания корней и содержание в них целевых веществ (НК и инулина).

2.8. Выделение инулина и натурального каучука из корней *T. koksaghyz* R.

2.8.1. Выделение инулина методом кислотного гидролиза

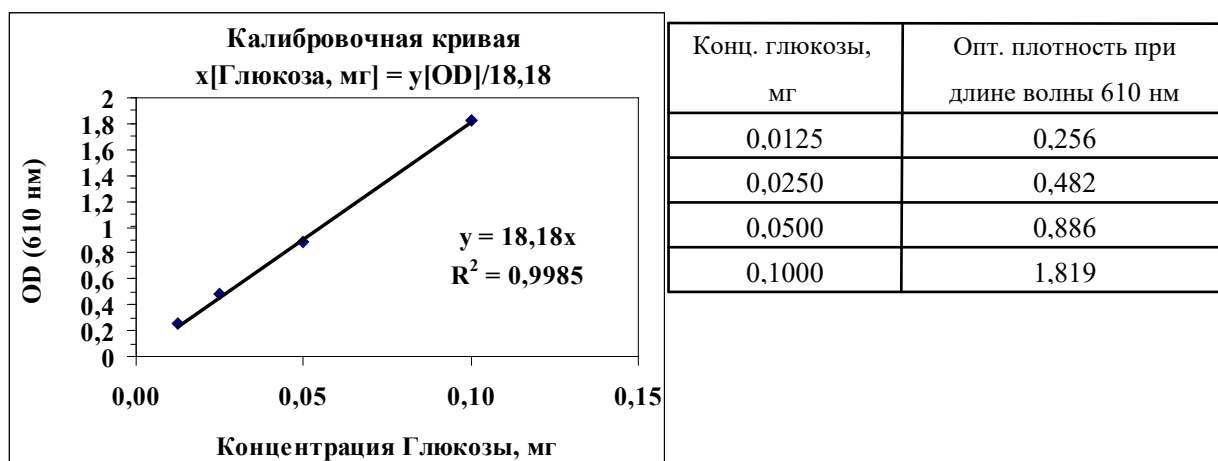
Корни высушивали в течение 15–16 часов в сушильном шкафу (Binder FD 115) при температуре 105°C и перемалывали блендером (Элмаз ЭКМУ-50, СССР) в течение 3 минут до размера частиц от 0,3 до 0,25 мм. Экстракцию порошкообразного инулина из точно взвешенной навески измельченных корней проводили в водном растворе на водяной бане при температуре 85–90°C в течение 60 мин. Затем полученную суспензию центрифугировали («ST 16R», Thermo Scientific, США) при 14 500 об/мин в течение 5 минут. Проведение кислотного гидролиза инулина в супернатанте осуществляли 10% HCl в соотношении 1:1 в течение 60 мин. на кипящей водяной бане.

Для определения редуцирующих сахаров (глюкозы и фруктозы) до и после гидролиза использовали метод Шомоди-Нельсона (ГОСТ Р 54905-2012. М., 2013), основанный на способности оксикарбонильной формы

редуцирующих сахаров выступать восстановителями в медь-арсеномолибдатной реакции.

В градуированную пробирку объемом 5–25 мл вносили 0,5 мл аликвоты и 0,5 мл реактива Шомоди. Пробирку помещали в кипящую баню на 40 минут, затем охлаждали и добавляли 0,5 мл реактива Нельсона, пробирку встряхивали и доводили объем до 5 мл дистиллированной водой. Определяли оптическую плотность в 1 см кювете объемом 3 мл при длине волны 610 нм против раствора сравнения, приготовленного таким же образом, но не содержащего моносахаридов.

Количество образовавшихся моносахаридов рассчитывали по предварительно составленному калибровочному графику в диапазоне концентраций 5×10^{-5} – $1,2 \times 10^{-3}$ М, используя раствор глюкозы (Рисунок 2.10).



Где: OD – оптическая плотность при заданной длине волны

R^2 – величина достоверности аппроксимации

Рисунок 2.10 – Калибровочная кривая стандартного раствора глюкозы в диапазоне концентраций 5×10^{-5} – $1,2 \times 10^{-3}$ М

Содержание инулина в корнях кок-сагыза (и калибровочном растворе глюкозы) рассчитывали по формуле:

$$И = (PC2 - PC1) \times 0,9,$$

где И – масса инулина, мг на 1 г сухого вещества корней;

РС1 и РС2 – сумма редуцирующих веществ, содержащихся в водной вытяжке до и после процесса гидролиза, соответственно, мг на 1 г сухого вещества корней;

0,9 – коэффициент пересчета редуцирующих веществ на инулин.

2.8.2. Выделение и количественный анализ НК *T. kok-saghyz* R.

2.8.2.1. Гравиметрический метод выделения НК

Растения кок-сагыза выращивали 70 суток в условиях *in vitro* и 35 суток в аэропонном фитотроне. Образцы корней кок-сагыза высушивали в течение 15–16 часов в сушильном шкафу (ED 53, «Binder», Германия) при температуре 105°C и подвергали диспергированию на шаровой мельнице («MLW КМ-1», ГДР) в течение 10 минут. Основная часть массы сухого корня превращалась в частицы размером около 20 мкм. Как выяснилось экспериментальным путем, такая степень дисперсии субстрата необходима и для полноты экстракции, и для оптимальной адсорбции стабильного радикала на частицах корня кок-сагыза.

Для проведения гравиметрического анализа каучук экстрагировали из диспергированного сухого корня. В качестве экстрагента использовали хлороформ. Экстракцию проводили в аппарате Сокслета в течение 3 часов при темп. 60°C. Каучук высаживали из экстракта трехкратным избытком этилового спирта, промывали водой, ацетонитрилом и этиловым спиртом. Сушили в течение суток при температуре 60°C до постоянного веса.

Процентное содержание каучука ($W_{\text{каучук}}, \%$) в сухом корне определяли по следующей формуле:

$$W_{\text{кауч.}} = \left(\frac{\frac{V_{\text{общ.}}}{V_{\text{аликв.}}} \times M_{\text{кауч.}}}{M_{\text{корня}}} \right) \times 100\%,$$

где $V_{\text{общ.}}$ – общий объем сконцентрированного хлороформенного экстракта (мл),

$V_{\text{аликв.}}$ – объем аликвоты хлороформенного экстракта (мл),

$M_{\text{кауч.}}$ – масса каучука в пробирке (г),

$M_{\text{корня}}$ – вес образца сухого корня, взятого на экстракцию (г).

Величины, полученные этим методом, служили опорными данными для построения градуировочной зависимости при разработке метода ЭПР спинового зонда, в котором измерения проводились непосредственно в сухом, диспергированном порошке корня кок-сагыза.

2.8.2.2. Разработка метода количественного определения содержания НК в растениях *T. kok-saghyz* R. с помощью ЭПР спинового зонда

Для измерения сигнала ЭПР использовалась навески порошка корня кок-сагыза массой 7 мг. Стабильный нитроксильный радикал 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО) («Sigma-Aldrich», США) был использован в качестве спинового зонда. Перед введением радикала образцы кок-сагыза взвешивали и помещали в стеклянные ампулы. ТЕМПО вводился в исследуемые образцы из газовой фазы при комнатной температуре. Образцы выдерживались в эксикаторе вместе с нитроксильным радикалом в течение 5–10 минут. При введении радикала все образцы находились в одинаковых условиях. После введения ампулы с образцами запаивались и помещались в резонатор ЭПР спектрометра. Концентрация ТЕМПО в образце не превышала 1×10^{-5} М (Мартиросян и др., 2023).

ЭПР спектры X-диапазона нитроксильного радикала регистрировали на спектрометре Bruker EMX (Германия) в центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН. Значение микроволновой мощности в резонаторе, во избежание эффектов насыщения, не превышало 2 мВт. При записи спектров амплитуда модуляции всегда была существенно

меньше ширины резонансной линии и не превышала 1 Гс. Для определения магнитно-резонансных параметров ЭПР линий использовались программы «WINEPR» и «SIMPHONIA» (Bruker, Германия). Времена корреляции вращения (τ) зонда определяли по формуле:

$$\tau = 6,65 \times 10^{-10} \Delta H^+ (\sqrt{I^+/I^-} - 1),$$

где ΔH^+ – ширина низкочастотной компоненты спектра,

I^+/I^- – отношение интенсивностей низкочастотной и высокочастотной компонент, соответственно (Тихонов, 1998)

Ширины линий и константы сверхтонкого взаимодействия (СТВ) определяли непосредственно из ЭПР спектров радикала согласно патенту № RU2805229C1.2023 (Мартиросян и др., 2023).

Таким образом, в предложенной методике необходимо учитывать следующие условия проведения эксперимента:

1. Образцы должны быть одинаково диспергированы. Это необходимо, чтобы площади поверхности при их сравнении были равными.
2. Должен быть обеспечен размер образцов в среднем не более 20 мкм.
3. Время выдержки в эксикаторе должно быть небольшим для того, чтобы избежать сильного обменного взаимодействия нитроксильных радикалов в каучуковых доменах.
4. Данным способом определяется изменение содержания каучука по сравнению с образцом, содержание каучука в котором уже определено независимым способом (Мартиросян и др., 2023).

2.8.2.3. Исследования образцов НК, выделенных из корней *T. koksaghyz* R.

2.8.2.3.1. Исследования образцов НК, выделенных из корней *T. kok-saghyz* R. методом ИК-спектроскопии

Образец НК из гевеи (марка SIR Estate Brown Crepes, сорт LX), а также полученные образцы каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, анализировали методом ИК-спектроскопии по стандартной методике. Все образцы в количестве 10–15 мг каучука растворяли в 1 мл тетрагидрофурана (ТГФ) в герметично закрываемые пробирки объемом 1,5 см³. Закрытые пробирки с содержимым оставляли при комнатной температуре на 48 ч для набухания и затем растворения каучука. Пробирки время от времени переворачивали и встряхивали для гомогенизации постепенно образующегося раствора каучука. В итоге получали рассеивающие свет, мутноватые растворы каучука в ТГФ. Образцы для измерений готовили, нанося каплю (5–10 мкл) раствора полимера в ТГФ на поверхность оптических окон из ZnSe (10 мм в диаметре и 2 мм толщиной). После удаления растворителя высушиванием при комнатной температуре получали в центральной части пластины ZnSe полупрозрачное пятно (пленку) сухого материала пробы, диаметром 4–6 мм и толщиной несколько мкм. ИК-спектры образцов полимеров регистрировали на Фурье-ИК-спектрометре Spectrum Two («Perkin-Elmer», США), усредняя 16–25 аккумулярованных сканов с оптическим разрешением 4 см⁻¹ (цифровое разрешение 1 см⁻¹) под управлением ПО «Spectrum v.10.3». Для записи ИК-спектров в режиме «на пропускание» использовали двухлинзовую (MgF₂) фокусирующую приставку Microfocus («Perkin-Elmer», Англия), установленную в стандартном слайдовом держателе образцов в измерительном отсеке прибора.

2.8.2.3.2. Определение молекулярной массы НК, выделенного из корней *T. kok-saghyz* R. методом гель-проникающей хроматографии

Молекулярную массу образцов каучука определяли методом гель-проникающей хроматографии по протоколу, описанному в работах Spano D. с соавторами и Xin S. с соавторами и ГОСТ 33402—2015, при этом

использовали три колонки, подключенные последовательно (ID 8 мм 3 300 мм), заполненные стирол-дивинилбензольным сополимером (5 мкм, 102, 103 и 105 Å) с тетрагидрофураном в качестве элюента. Хроматограмму регистрировали при 238°C, контролируя рефрактометрическим детектором. Образцы (3 г/л) растворяли в тетрагидрофуране (ТГФ) при комнатной температуре в течение 12 часов. Прозрачный раствор образца фильтровали через фильтровальную установку с диаметром пор 1,0 мкм («Schleicher & Schuell», Германия). 50 мкл раствора вводилось в прибор с помощью автоматического дозатора. Для приготовления калибровочной кривой использовались стандартизированный полиизопрен от 1 до 1000 кДа (Spano et al., 2012; Xin et al., 2021).

2.9. Статистическая обработка данных

Результаты экспериментов представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистический анализ выполняли с использованием следующих методов. Проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). При выявлении значимых различий выполняли пост-хок тест Дункана, для всевозможных попарных сравнений между группами. Использовали тест Даннета для сравнения всех групп с контрольной группой. Все расчеты выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel (Microsoft, США). Величина $p < 0,05$ считалась статистически значимой, если не указано иное.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подбор линии *T. kok-saghyz* R. для дальнейших исследований

Первым этапом работы являлся выбор коллекционного образца кок-сагыза для проведения дальнейших исследований. У имеющихся образцов, полученных из коллекции ВИР и из мест естественного произрастания, оценивали такие ключевые параметры, как содержание целевых веществ – НК и инулина (Таблица 3.1). Исходные растения выращивали в почвогрунте, в вегетационных сосудах. Образцы п/п 1–8 из коллекции ВИР, образцы п/п с 9–18 из Р. Казахстан.

Таблица 3.1 – Характеристика образцов кок-сагыза разных популяций по содержанию целевых веществ в корнях

п/п	№	Происхождение	НК, %	Инулин, %
1	В-242	Сумская популяция	7,42±0,1 (С)	15,0±0,3 (с)
2	В-247	Сумская популяция	7,6±0,1 (С)	14,4±0,1 (с)
3	В-391	Харьковская популяция	10,8±0,3 (В)	23,0±1,0 (b)
4	В-427	Харьковская популяция	3,4±0,2 (JK)	6,5±0,2 (i)
5	В-445	Черниговская популяция	5,7±0,1 (DEF)	11,3±0,4 (eg)
6	В-460	Черниговская популяция	4,3±0,1 (H)	8,0±0,1 (h)
7	В-479	Полтавская популяция	5,4±0,2 (EG)	11,7±0,9 (ef)
8	В-564	Полтавская популяция	2,6±0,1 (L)	8,1±0,3 (h)
9	К-21	озеро Тузколь	5,9±0,3 (DE)	10,2±0,4 (g)
10	К-22	озеро Тузколь	6,2±0,2 (D)	10,4±0,2 (g)
11	К-23	озеро Тузколь	5,6±0,3 (EF)	8,2±0,4 (h)
12	К-24	озеро Тузколь	3,1±0,1 (KF)	11,1±0,3 (eg)

Продолжение Таблицы 3.1

п/п	№	Происхождение	НК, %	Инулин, %
13	К-25	озеро Тузколь	5,3±0,1 (FG)	10,8±0,8 (fg)
14	К-31	Сарыжас	11,9±0,2 (A)	24,3±1,1 (a)
15	К-32	Сарыжас	3,7±0,2 (IJ)	11,3±0,5 (eg)
16	К-33	Сарыжас	5,2±0,4 (FG)	12,0±0,5 (def)
17	К-34	Сарыжас	5,0±0,6 (G)	12,0±1,2 (d)
18	К-35	Сарыжас	4,1±0,5 (HI)	11,3±0,8 (de)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Исходя из полученных результатов, оптимальными по содержанию целевых веществ являются коллекционные образцы кок-сагыза В-242, В-247, В-391 и К-31, которые мы использовали в дальнейших исследованиях.

3.2. Исследование влияния регуляторов роста на каллусогенез и морфогенез *T. kok-saghyz R. in vitro*

3.2.1. Исследование влияния регуляторов роста на каллусогенез *T. kok-saghyz R. in vitro*

Для получения каллуса из листовых и корневых эксплантов кок-сагыза использовали среду MS с различными вариантами соотношения регуляторов роста (НУК и 6-БАП). Эффективность каллусогенеза (%), указанную на графике (Рисунок 3.1), рассчитывали, как процент эксплантов с признаками каллусогенеза от общего количества эксплантов. Ранее отобранные коллекционные образцы не показали достоверных различий по параметрам каллусогенеза, поэтому на рисунках и таблицах раздела 3.2 представлены усредненные результаты по всем четырем используемым в исследовании образцам.

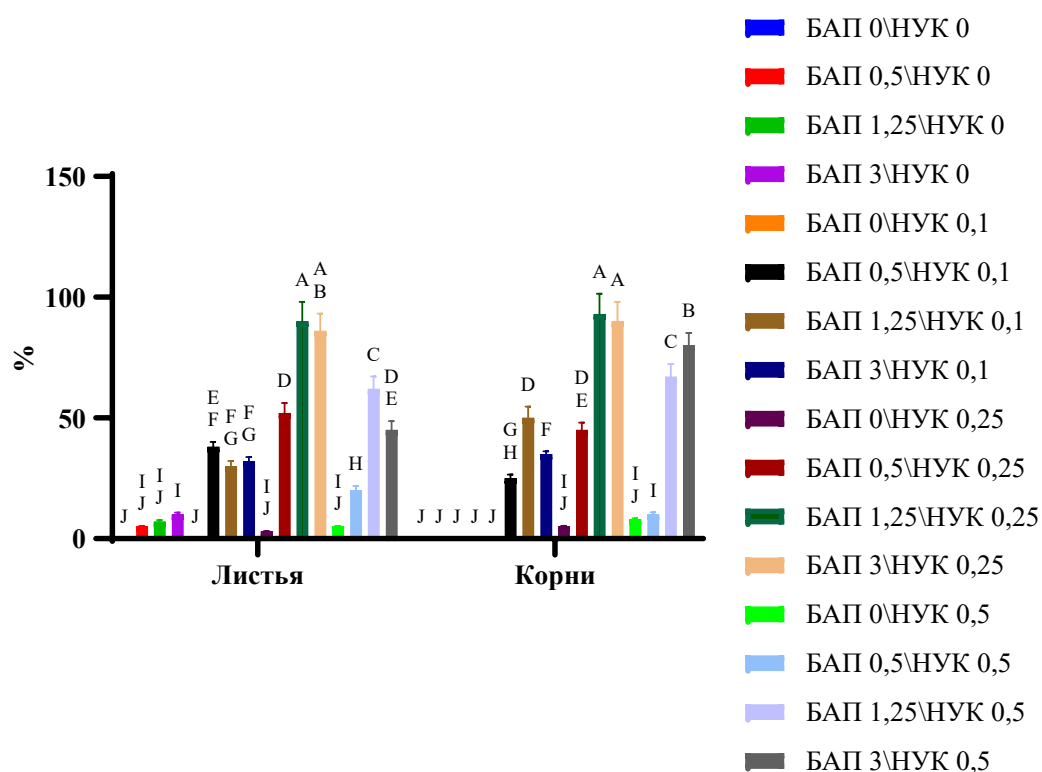


Рисунок 3.1 – Эффективность каллусогенеза (%) у листовых эксплантов кок-сагыза в зависимости от концентрации и соотношения регуляторов роста

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Анализируя полученные экспериментальные данные, мы пришли к заключению, что при использовании корневых эксплантов оптимальными являлись варианты с добавлением 1,25 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК и 3,0 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК. При этих сочетаниях фитогормонов и регуляторов роста мы наблюдали образование светлого полурыхлого первичного каллуса (Рисунок 3.2 А) от 80 до 90% случаев. В дальнейшем эти каллусы на свету приобретали желто-зеленый цвет и более плотную структуру. При использовании листовых эксплантов самыми эффективными также были 1,25 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК и 3,0 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК. Листовой каллус имел светло-желтый цвет и полурыхлую структуру (Рисунок 3.2 Б).

Похожие данные были получены при клональном микроразмножении *T. officinale* (Martinez et al., 2021; Muhammed et al., 2018). Также до этого публиковались данные о более высокой эффективности каллусообразования с использованием корневых эксплантов кок-сагыза (Verbitskaya et al., 2021; Uteulin et al., 2015).

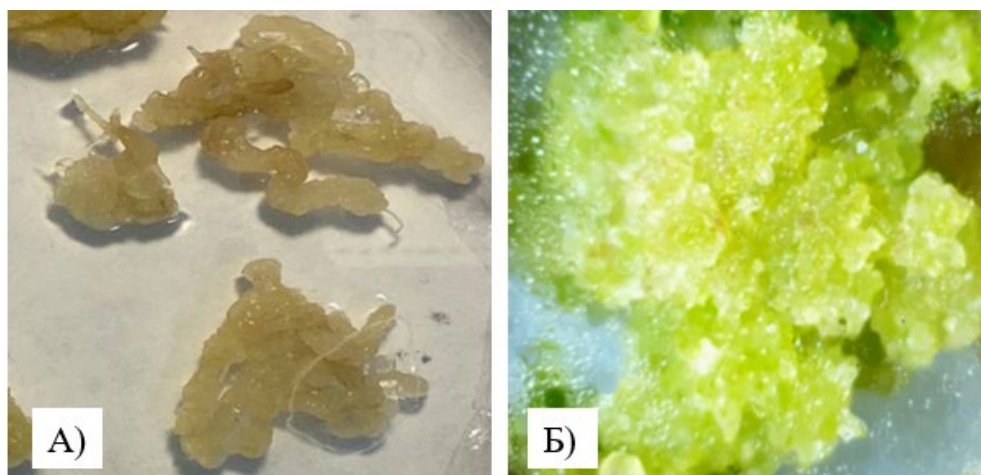


Рисунок 3.2 – Каллус кок-сагыза: А) корневой; Б) листовой

3.2.2. Исследование влияния регуляторов роста на морфогенез *T. kok-saghyz* *R. in vitro*

Для индукции побегообразования из каллуса кок-сагыза использовали 6-БАП, ТДЗ и КИН в различных концентрациях. В этом случае эффективность рассчитывали, как процент каллусов с признаками листового органогенеза (Рисунок 3.3) от общего количества каллусов, высаженных на среду для морфогенеза (Рисунок 3.4).



Рисунок 3.3 – Регенерация и побегообразование кок-сагыза из каллуса на среде MS, содержащей цитокины: А) каллус перед пересадкой на среду для морфогенеза; Б) регенерация листовых пластинок спустя 2 недели культивирования; В) множественное побегообразование

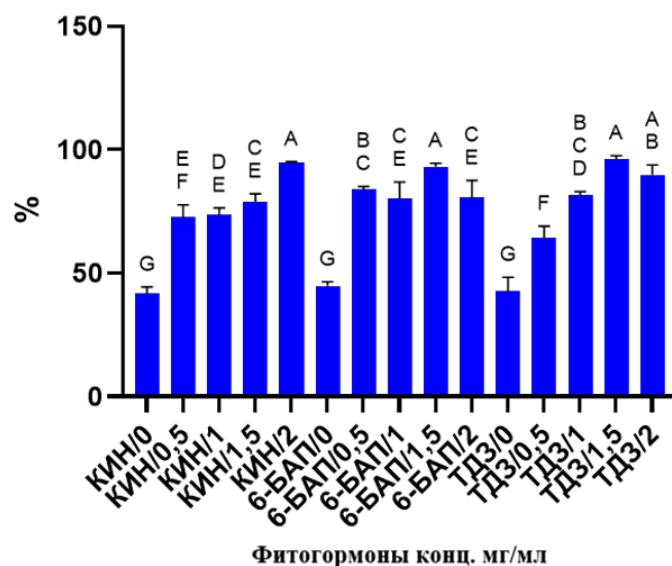


Рисунок 3.4 – Эффективность органогенеза (%) кок-сагыза из каллуса при использовании цитокининов в различных концентрациях

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Высокая эффективность побегообразования, 92–95%, наблюдалась у каллусных масс, культивируемых на средах с добавлением КИН в концентрации 2 мг/л, 6-БАП в концентрациях 1 мг/л и 1,5 мг/л, ТДЗ в концентрациях 1,5 и 2 мг/л. Другими авторами отмечается, что использование 6-БАП в концентрации до 4 мг/л способствует прямому органогенезу из листовых эксплантов (Рахимбаев и др., 2013).

Полученные регенеранты были пересажены на среду для ризогенеза, содержащую ауксины в различных концентрациях. После 4 недель культивирования на средах для укоренения было подсчитано количество

укоренившихся растений (Рисунок 3.5); эффективность рассчитывали, как процентное количество укоренившихся эксплантов (Рисунок 3.6).



Рисунок 3.5 – Укоренённые регенеранты кок-сагыза на среде MS, содержащей ауксины

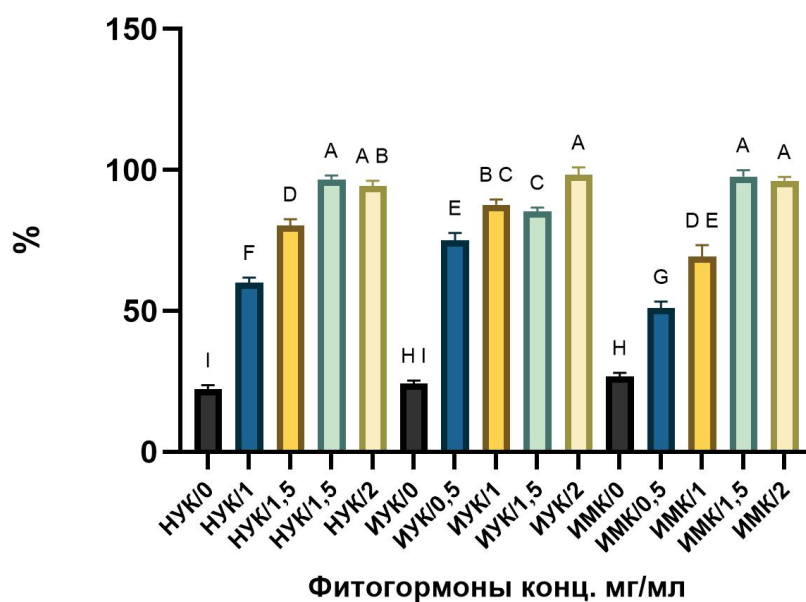


Рисунок 3.6 – Эффективность ризогенеза (%) кок-сагыза при использовании ауксинов в различных концентрациях

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Максимальную эффективность ризогенеза, до 96–98%, наблюдали при использовании НУК в концентрациях 1, 1,5 и 2 мг/л, ИУК в концентрации 2 мг/л и ИМК в концентрации 1,5 и 2 мг/мл.

В более ранних исследованиях, связанных с культивированием *in vitro* одуванчика лекарственного, а также кок-сагыза, прослеживается высокая эффективность каллусогенеза и морфогенеза, что является подтверждением факта того, что кок-сагыз хорошо поддается клональному микроразмножению (Утеулин и др., 2013; Chandrasekera et al., 2017), и данный способ может являться частью технологии промышленного выращивания данной культуры. Для популяционных образцов кок-сагыза, использованных в наших исследованиях, разработана методика регенерации оздоровленных от фитопатогенов растений *in vitro* как из корневых, так и из листовых эксплантов. Эти результаты мы в дальнейшем использовали для последующей агробактериальной трансформации, в частности при получении культуры трансформированных корней с фенотипом «*hairy roots*».

3.2.3. Влияние антиоксидантного свойства глутатиона на физиологическое состояние каллусных масс *T. kok-saghyz* R. в культуре *in vitro*

Представители рода одуванчик синтезируют и накапливают большое количество вторичных метаболитов, например, сесквитерпеновые лактоны, фенольные соединения и производные хлорогеновой кислоты и др. (Lee et al., 2021). В частности, из-за этого они имеют свойство выделять эти вещества в среду при культивировании *in vitro*, снижая эффективность получения растений-регенерантов (Martinez et al., 2021; Мартиросян и др., 2022).

Глутатион (GSH) – трипептид (γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин), является биоантиоксидантом, участвующим в регуляции большинства окислительных процессов в клетках, в том числе в поддержании клеточного цикла в меристемах растений и защите белков во время обезвоживания семян (Koramutla et al., 2021). Была выдвинута гипотеза о том, что GSH способен положительно сказываться на приросте массы каллусных тканей и, соответственно, на увеличении регенерационного потенциала кок-сагыза (Мартиросян и др., 2022).

В таблице 3.2 и на рисунке 3.7 представлены данные, которые показывают влияние GSH на развитие каллуса в зависимости от концентрации. Имеет место оптимальная концентрация добавленного GSH (1 мМ), выше которой не наблюдается ускорения роста и приращения размеров и массы. На рисунке 3.7 сопоставлены диаметры каллусов кок-сагыза при различном содержании GSH в среде выращивания. Измерения проводили через 3, 7 и 10 суток культивирования (Мартиросян и др., 2022).

Наибольший прирост наблюдается при концентрации 1 мМ GSH. Аналогичные результаты были получены в работе Nomura K. с соавторами, где GSH использовали для обработки эксплантов яблони с целью предотвратить потемнение меристемных зон главного стебля (Nomura et al., 1998). Согласно данным исследователей Исследовательского центра финиковой пальмы университета Басры, 1 мМ GSH в среде выращивания каллуса пальмы стимулировал рост и подавлял потемнение каллусов, а большие и меньшие дозы не проявляли эффекта стимуляции (Al-Mayahi et al., 2020; Мартиросян и др., 2022).

Добавление GSH в питательную среду стимулирует образование ГК (метаболитов биосинтеза лигнина) в растении и, возможно, способствует увеличению его биомассы. Однако концентрация эндогенного GSH в зеленой части образцов увеличивается на 33% при оптимальной добавке 1 мМ, а при более высоких концентрациях GSH остается на уровне контрольных образцов (Мартиросян и др., 2022).

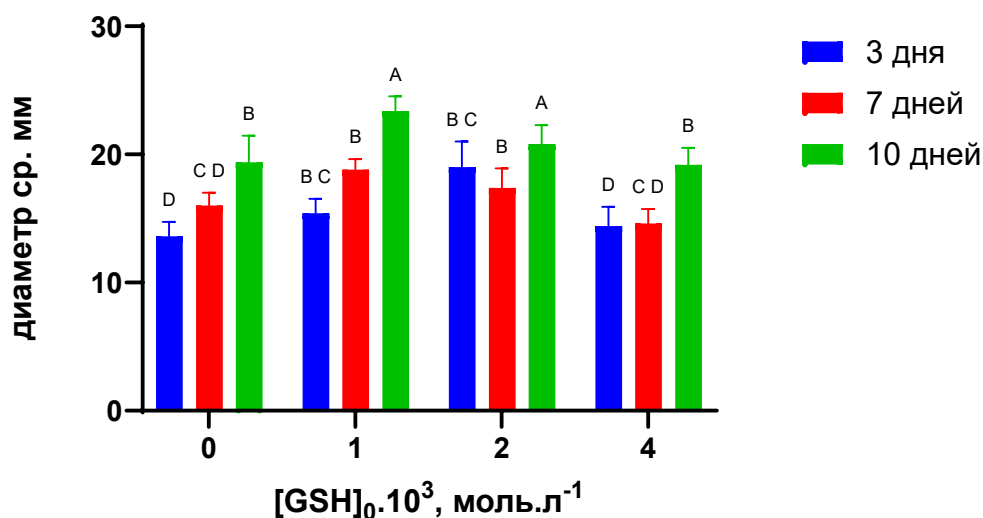


Рисунок 3.7 – Диаметры каллусов кок-сагыза при различном начальном содержании экзогенного глутатиона $[GSH]_0$ в питательной среде

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Образование корней свидетельствует о благоприятных условиях развития каллусной культуры и наступлении условий для дифференцировки каллусных клеток. Потемнение каллусных тканей указывает на наличие неблагоприятных для дальнейшего развития факторов. Это может быть ответом клеток на активацию латентной бактериальной инфекции – происходит выделение фенольных соединений, которые должны приостанавливать дальнейшее развитие фитопатогенов. Из таблицы 3.2 видно, что при оптимальной концентрации 1мМ в питательной среде стимулируется образование корней и уменьшается число потемневших каллусов (Мартиросян и др., 2022).

Таблица 3.2 – Влияние концентрации GSH в питательной среде MS на содержание ГК и GSH в зеленой части каллусов и морфологические характеристики (количество корней и потемневшие каллусы) растений,

выращенных на средах с GSH, к 10-му дню выращивания (Мартиросян и др., 2022)

Концентрация GSH в среде	0	$1 \cdot 10^{-3}$, моль/л	$2 \cdot 10^{-3}$, моль/л	$4 \cdot 10^{-3}$, моль/л
Содержание ГК, 10^{-7} моль/г	$0,2 \pm 0,02$ (C)	$0,6 \pm 0,1$ (B)	$1,0 \pm 0,1$ (A)	$1,1 \pm 0,15$ (A)
Концентрация GSH, 10^{-7} моль/г	$1,6 \pm 0,4$ (B)	$2,4 \pm 0,4$ (A)	$1,5 \pm 0,3$ (B)	$1,6 \pm 0,4$ (B)
Корни, шт. на один каллус	0	3 ± 1 (A)	$2,3 \pm 0,6$ (B)	$1,3 \pm 0,6$ (C)
Доля потемневших каллусов	$0,4 \pm 0,2$ (A)	0 (B)	0 (B)	$0,4 \pm 0,2$ (A)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Даннета.

На рисунке 3.8 представлено изменение концентрации GSH в среде для выращивания, а именно, его содержание в образцах проб среды на 3-и, 7-е и 10-е сутки культивирования, в зависимости от исходной концентрации в среде. Заметно, что концентрация GSH в среде уменьшается со временем (Мартиросян и др., 2022).

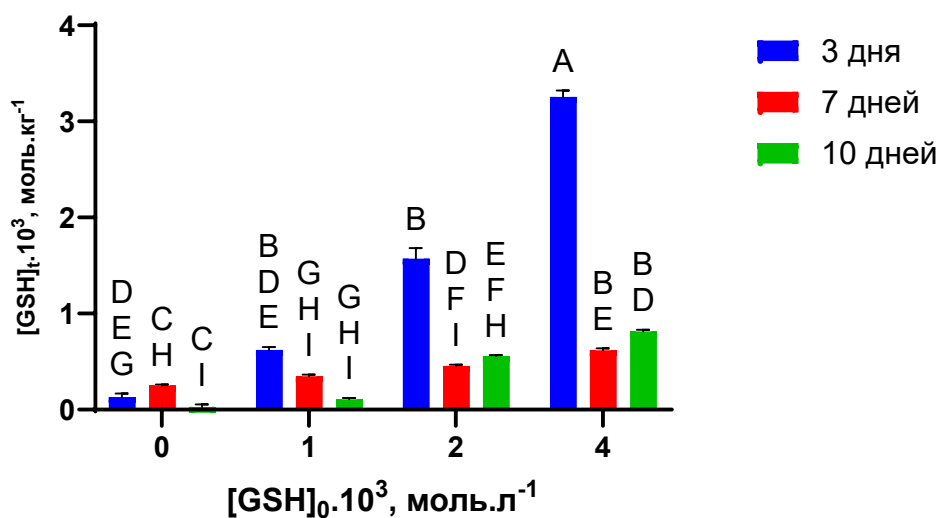


Рисунок 3.8 – Содержание GSH в образцах проб питательной среды на 3-й, 7-й и 10-й дни, в зависимости от исходной концентрации $[GSH]_0$ в среде

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Однако на 10-е сутки при начальных концентрациях 2 мМ и 4 мМ концентрация GSH в среде больше, чем на 7-е сутки. По-видимому, это связано с саморегуляцией содержания GSH в растущем каллусе. Примечательно, что концентрация GSH, определяемая методом Элмана, в зеленой части растений, выращенных на средах с добавками 2 мМ и 4 мМ GSH, близка к его концентрации в контрольных образцах. Возможно, избыточный по сравнению с нормой, GSH выделяется в среду (Мартиросян и др., 2022).

3.3. Оздоровление растений *T. kok-saghyz* R.

При работе *in vitro* с культурой растительных тканей проявление бактериальной контаминации, конечно, в первую очередь зависело от качества асептизации растительных эксплантов. Однако, как показали последующие опыты, ни эффективная асептизация растительных эксплантов, ни соблюдение правил асептики не гарантировали отсутствия в культурах *in vitro* латентных бактериальных инфекций. Корневые бактериальные патогены проявили себя во всех вариантах культивирования кок-сагыза. Они проявились в условиях *in vitro*, в аэропонном фитотроне, в культуре трансформированных корней с фенотипом «*hairy roots*», а также при выращивании в почве в вегетационных сосудах.

3.3.1. Идентификация бактериальных патогенов *T. kok-saghyz* R.

При получении единичных колоний из тканей кок-сагыза с признаками инфекции, были выделены два потенциальных патогена — Ksz-1 и Ksz-2. Окраска по Граму показала, что данные бактерии являются грамотрицательными (Рисунок 3.9).

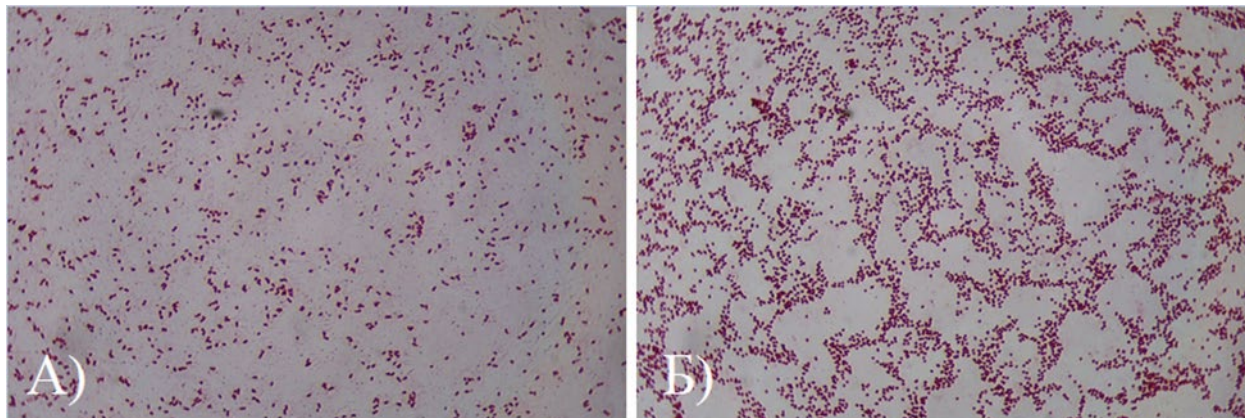


Рисунок 3.9 – Окрашивание по Граму: А) Ksz-1; Б) Ksz-2

Для подтверждения патогенности использовался анализ на пектиназную активность, где - — отсутствие видимого роста бактерий, + — интенсивный рост бактерий ± — низкоинтенсивный рост бактерий (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Анализ выделенных бактерий на пектиназную активность

Источник углерода	Рост Ksz-1	Рост Ksz-2
Натриевая соль полигалактуроновой кислоты	- - -	+ + +
Na-карбоксиметилцеллюлоза	- - -	- - -
Метилловый эфир поли-D-галактуроновой кислоты (яблочный пектин)	± ± ±	+++
Метилловый эфир поли-D-галактуроновой кислоты (цитрусовый пектин)	- - -	+++

Продолжение Таблицы 3.3

Источник углерода	Рост Ksz-1	Рост Ksz-2
D-глюкоза	+++	± ± ±

Исследование методом повторного заражения подтвердило тот факт, что бактерии могут являться патогенами растений: внесение монокультур Ksz-1 и Ksz-2 к визуально здоровым растительным культурам кок-сагыза свидетельствует о том, что выделенные бактерии способны приводить их к гибели (Рисунок 3.10).

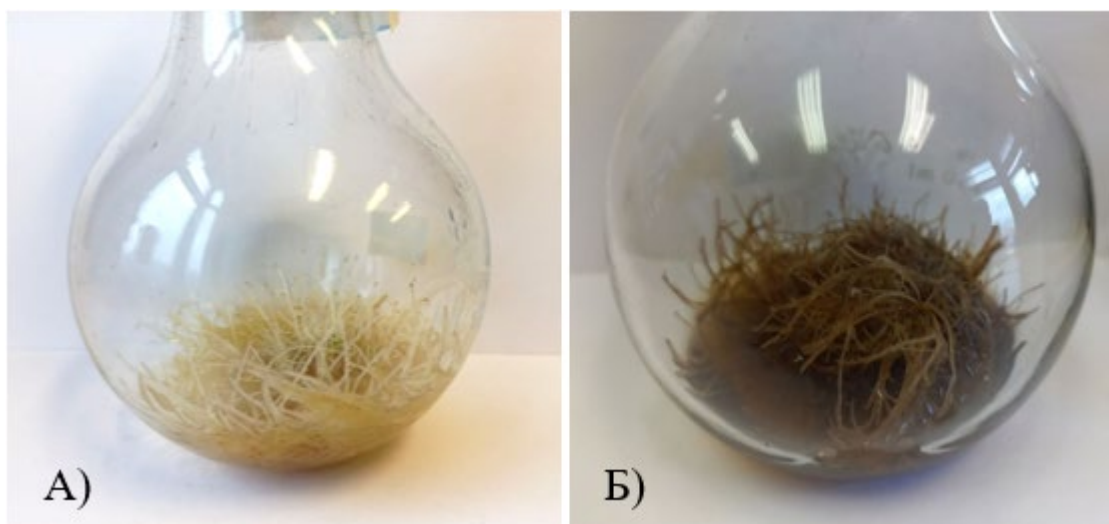


Рисунок 3.10 – Культура корней кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*»: А) до внесения выделенных патогенов; Б) через 72 часа после внесения патогенов

По таким биохимическим признакам, как способность расти на манните, маннозе, ацетилглюкозамине и цитрате как единственных источниках углерода, и наличию активности аргининдигидролазы, первый патоген может быть отнесен к роду *Pseudomonas* (Таблица 3.4), а второй, по способности расти на орнитиндекарбоксилазе и отсутствию способности к утилизации аминокислоты, – к роду *Raoultella* (Таблица 3.5).

Далее использовали методы молекулярной диагностики, такие как ПЦР и секвенирование, что позволило нам определить видовой состав микробиоты из потемневших корней. Культуры, обозначенные как Ksz-1 и Ksz-2, были выделены на L-агаре и минимальной среде с пектином, соответственно.

Таблица 3.4 – Результат биохимического теста патогена Ksz-1

Виды бактерий Субстрат	<i>P.</i> <i>pectoglossicida</i>	<i>P.</i> <i>entomophila</i>	<i>P.</i> <i>fulva</i>	<i>P.</i> <i>monteilii</i>	<i>P.</i> <i>benzenivorans</i>	Ksz-1
NO ₃ ⁻	+	+	-	-	+	
MNE (манноза)	-	+	var	-	+	+
MAN (маннит)	-	+	var	-	-	+
NAG (ацетилглюкозамин)	-	+	-	-	-	+
PAC (фенилацетат)	+	+	-	+	-	+
ArgDH (аргининдигидролаза)	+	+	+	+	-	+

Таблица 3.5 – Результат биохимического теста патогена Ksz-2

Виды бактерий Субстрат	<i>R. planticola</i>	<i>R.</i> <i>terrigena</i>	<i>R.</i> <i>ornithinolytica</i>	Ksz-2 (API test)
Кетоглюканат	+	+	+	+
3-Метилглюкозид	+	+	+	+
Рост при 10°C	+	+	+	+
Рост при 41°C	+/-	-	+	+/-
Утилизация бензоата	+	+	-	+
Утилизация гистамина	+	+	+	+
Утилизация мелицитозы	+	+	+	+
Утилизация фенилацетата	+	+	+	+
Утилизация сорбозы	+	+	+	+
Образование индола	+/-	-	+	-
ODC	-	+/-	+	+

Продолжение Таблицы 3.5

Виды бактерий Субстрат	<i>R. planticola</i>	<i>R. terrigena</i>	<i>R. ornithinolytica</i>	Ksz-2 (API test)
Утилизация аминобутирата	+	-	+	-

ПЦР-амплификация и анализ последовательности (сравнение с базой данных GenBank) варьируемых фрагментов 16S рДНК показали, что Ksz-1 относится к систематическим группам: *Bacteria*; *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Pseudomonadales*; *Pseudomonadaceae*; *Pseudomonas*. Пять видов *Pseudomonas* показывают наивысшие уровни идентичности с фрагментом 16S рДНК Ksz-1. Эти виды: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas taiwanensis*, *Pseudomonas monteilii* и *Pseudomonas fluorescens*.

Аналогичным образом последовательность 16S рДНК Ksz-2 сравнивалась с базой данных GenBank. Было показано, что Ksz-2 принадлежит к систематическим группам: *Bacteria*; *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Enterobacteriales*; *Enterobacteriaceae*; группа *Klebsiella/Raoultella*; *Raoultella*. Анализ последовательности показал, что Ksz-2, вероятно, является *Raoultella terrigena* – это грамотрицательный вид бактерий рода *Raoultella*, ранее классифицированный как род *Klebsiella*, *Raoultella ornithinolytica*, или *Klebsiella aerogenes*.

Для увеличения точности идентификации мы также полагались на биохимическое тестирование, т. к. специфические биохимические реакции, характерные для каждого организма, могут являться своеобразным «отпечатком пальца» при его идентификации (Brenner et al., 2005). Для биохимической характеристики штамма мы использовали тесты API 20 NE и API 10 S. Ksz-1 продемонстрировал близкое сходство с видом *P. putida* (способность расти на манните, мальтозе, маннозе и ацетилглюкозамине в

качестве единственных источников углерода), но, с другой стороны, в отличие от *P. putida*, Ksz-1 продуцировал индол из триптофана, не имел аргининдигидролазы и усваивал арабинозу (Таблица 3.4). Несколько особенностей Ksz-2, таких, как отсутствие активности желатиназы, образование индола во время роста на среде, содержащей триптофан, отсутствие активности уреазы и высокая активность орнитиндекарбоксилазы, а также способность расти при 10°C и при 41°C, позволили предположить, что этот вид является *R. terrigena*. Однако ранее считалось, что все виды *Raoultella* не обладали пектиназной активностью (Hansen et al., 2004; Sękowska, 2019), тогда как соответствующая активность штамма Ksz-2 была относительно высокой. Штамм Ksz-2 рос одинаково эффективно на средах, содержащих яблочный и цитрусовый пектин, и на среде с полигалактуроновой кислотой в качестве единственного источника углерода. Фактически, штамм Ksz-1 был способен расти только на последней указанной среде. Возможно, у этого изолята отсутствуют эстеразы – пектинметилэстераза и пектинацетилэстераза, что предполагает отсутствие у него пектинэстеразной активности. Таким образом, биохимические подходы, а также анализ последовательностей 16S рДНК не позволили достоверно идентифицировать патогенные виды бактерий, выделенных из кок-сагыза.

Чтобы различить эти виды, мы ПЦР-амплифицировали и секвенировали фрагменты генов *gyrB* и *rpoD*, которые были успешно использованы для анализа *Pseudomonas spp.* (Yamamoto, Narayama, 1998; Yamamoto et al., 2000). Сравнение с базой данных GeneBank убедительно показало, что Ksz-1 – это *P. putida* (Kivisaar, 2020) (99,79 % и 98,79 % идентичности для фрагментов *gyrB* и *rpoD* соответственно). Последовательности генов *gyrB* и *rpoD* *P. putida* доступны в базе данных GenBank (номера доступа CP046872 и LR135071). Праймеры, соответствующие консервативным областям *P. putida* гена *gyrB*, были успешно использованы и для амплификации фрагмента Ksz-2. Уровень идентичности этого фрагмента с *R. terrigena*, ген *gyrB* составил 99,07 %. Интересно, что праймеры *rpoD* не смогли амплифицировать ген *R. terrigena*,

но неспецифическая ПЦР привела к амплификации гена *era*, кодирующего белок, связывающий ГТФ (March, 1992). Очень высокий уровень идентичности гена *era* Ksz-2 (99,53 %) в сочетании с данными *gyrB* ясно показывают, что Ksz-2 – это *R. terrigena* (Appel et al., 2021). Последовательности генов *gyrB* и *era* *R. terrigena* доступны в базе данных GenBank (номера доступа LR134253.1 и LR13127.1).

Таким образом, мы пришли к выводу, что Ksz-1 – *P. putida*, а Ksz-2 – *R. terrigena*. Первая является сапротрофной почвенной бактерией (Volke et al., 2020), а вторая ранее относилась к роду *Klebsiella* и в основном также обнаруживается в почве (Schicklberger et al., 2015).

Патогенность бактерий *P. putida* и *R. terrigena* была протестирована *in vitro* на культуре изолированных корней кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*» и на растениях *in vitro*. Оба вида бактерий при проведении искусственного заражения культуры изолированных корней и растений кок-сагыза *in vitro* вызывали характерные симптомы, такие как появление черных некротических областей, вначале поражавших кончики корней, а в течение месяца приводящих к полному потемнению корневой массы.

Инфицированные *P. putida* и *R. terrigena in vitro* растения демонстрировали постепенно усиливающиеся симптомы бактериоза. На 6–7 сутки после инокуляции бактерии поражали корни и полностью развитые листья, расположенные у основания растения, примерно на 14 сутки после инокуляции системно распространялись на верхние ярусы растения. Гибель растения происходила на 30–35 сутки после инокуляции (Рисунок 3.11).

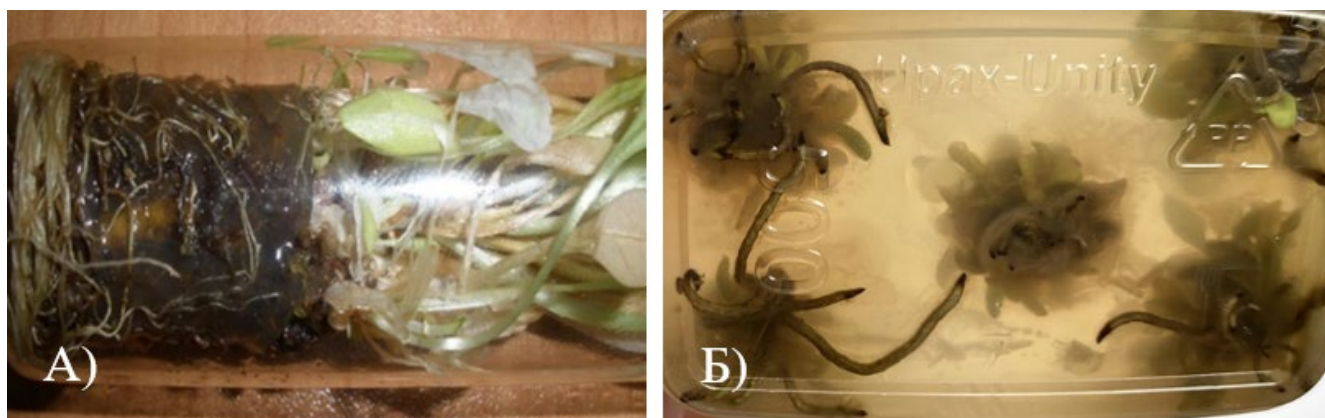


Рисунок 3.11 – Растения кок-сагыза после инокуляции *P. putida* и *R. terrigena* в условиях *in vitro*: А) общий план – увядание листьев, потемнение корней и питательной среды; Б) потемнение корней (в частности, корневого чехлика) и питательной среды в прикорневой зоне

При этом симптоматика патогенеза и ее интенсивность не отличалась у растений с отрезанными кончиками корней и интактными корнями, несмотря на то, что бактериальным фитопатогенам обычно требуется поранение или другое механическое повреждение для проникновения в ткани растений.

В дополнение к исследованиям *in vitro* мы проверили способность чистых культур бактерий *P. putida* и *R. terrigena* инфицировать растения кок-сагыза, выращенные в почве в вегетационных сосудах. Оба изолята бактерий вызвали обширное повреждение надземной ткани, что приводило к гибели растений примерно через 27–30 дней после инокуляции при проникновении через почву, непосредственно окружающую корневую систему (Рисунок 3.12). Такие же результаты получали после поверхностной обработки нижнего яруса листовой розетки.

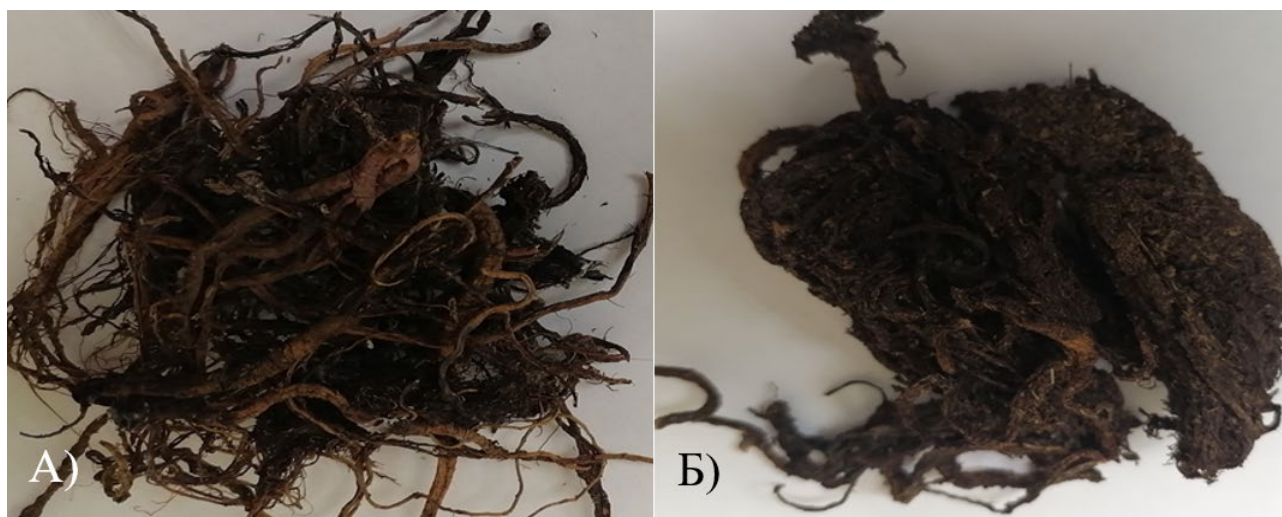


Рисунок 3.12 – Корни растений кок-сагыза после инокуляции *P. putida* и *R. terrigena*: А) выращенных в условиях аэропного фитотрона; Б) выращенных в почвогрунте в вегетационных сосудах

3.3.2. *P. putida* и *R. terrigena* как фитопатогены

3.3.2.1. Ранние исследования взаимодействия *P. putida* и *R. terrigena* с растениями

Взаимодействие *P. putida* и *R. terrigena* с растениями других видов были ранее описаны в литературе (Kivisaar, 2020; Mengistu, 2020; Martínez-García, Lorenzo, 2024). Примечательно, что есть большое количество исследований, где бактерии группы *P. putida* изучаются на предмет широкого спектра свойств, начиная от стимуляции роста растений и биоремедиации и заканчивая их фитопатогенностью (Kivisaar, 2020).

В работах других авторов было показано, что некоторые эндофитные штаммы *P. putida* и *R. terrigena* обладают способностью стимулировать рост растений в естественной экосистеме (Costa-Gutierrez et al., 2022; Zakharchenko et al., 2024). Также есть исследования, где показано, что несколько штаммов *P. putida* оказывали ингибирующее воздействие на посевной горох в различных условиях окружающей среды. Было отмечено отрицательное воздействие данных штаммов на морфологию корней, что сопровождалось снижением их

биомассы. (Berggren, et al., 2001). А некоторые бактериальные изоляты, ранее идентифицированные как ростостимулирующие, могут оказывать пагубное воздействие на рост растений, если их титр слишком велик (Glick et al. 1998; Reed et al., 2005; Alhasawi et al. 2015; Premachandra et al. 2016;).

Однако наши данные свидетельствуют о том, что при определенных условиях, ранее хорошо охарактеризованные как эндофитные, бактерии могут действовать как фитопатогены.

Для доказательства патогенности нами было применено обратное инфицирование предварительно оздоровленных от этих бактерий растений кок-сагыза *in vitro* – микрорастений и культуру корней «*hairy roots*». Согласно литературным источникам, взаимодействие бактерий *P. putida* и *R. terrigena* с растениями обычно описывается как симбиоз, что может быть обусловлено их высокой генетической пластичностью и широкой метаболической, транспортной, сигнальной и регуляторной способностью (Nikel, Lorenzo, 2018).

Эти бактерии в зависимости от условий жизнедеятельности могут использовать как единственный определенный источник углерода, так и различные химические соединения, простые и сложные (Xue et al., 2015). Например, штамм *P. Putida* mt-2 был выделен из почв в Японии и охарактеризован, как способный расти на мета-толуате как единственном источнике углерода. Секвенирование его генома показало, что он обладает множеством генов, кодирующих белки, участвующие в деградации химических веществ растительного происхождения, включая разные метоксилированные ароматические кислоты, гидроксильированные ароматические кислоты и другие соединения (Duque et al., 2007; Castillo et al., 2008). Было также обнаружено, что на генетическом уровне штамм обладает способностью к деградации фруктозы (Velázquez et al., 2004) и глюкозы (Velázquez et al., 2004; Castillo, Ramos, 2007; Castillo et al., 2007), двух из наиболее распространенных сахаров, присутствующих в экссудатах корней растений (Kamilova et al., 2006).

3.3.2.2. Влияние условий окружающей среды на развитие патогенеза у *T. kok-saghyz* R.

Ранее были описаны некоторые болезни кок-сагыза, культивируемого плантационным способом. Эти заболевания обычно вызываются почвенными бактериями, грибами и оомицетами, которые проникают в растительную систему через корни и попадают в проводящие воду сосуды ксилемы, где размножаются и препятствуют транспортировке воды и минералов. Среди них был отмечен сосудистый бактериоз корней, возбудителем которого является бактерия *Pseudomonas campestris* (Pammel) F. Smith (Черемисинов, 1951). Заболевание приводит к гибели всходов и молодых растений.

Сосудистые заболевания чаще встречаются на почвах с повышенной влажностью. Характерным внешним симптомом является увядание растений, не связанное с продолжительным дефицитом воды, и потемнение главного корня при разрезе. Как следствие, листья увядают и отмирают, что может привести к повреждению всего растения и его гибели (Черемисинов, 1951).

Аналогичные действия могут вызвать повышенная температура и засуха, которые приводят к изменениям в составе, численности или активности микробных сообществ, связанных с растениями. Согласно нашим наблюдениям, похожие симптомы могут проявляться у растений, несмотря на наличие достаточного количества воды в почве. Подобные явления мы наблюдали при проведении вегетационных опытов, на открытом воздухе, в условиях окружающей среды.

В середине апреля – начале мая погода была умеренная, средняя дневная температура воздуха колебалась от 15°C до 21°C. Растения бурно развивались без каких-либо признаков бактериальной инфекции.

В июне-июле дневная температура поднималась до 30°C, а в определенные дни и до 33°C. Выраженный период высокой дневной температуры воздуха установился и длился 8–10 дней. В варианте №1 (контроль, Рисунок 3.13) растения, которые были выращены из

оздоровленного материала *in vitro*, не пострадали от повышенной температуры, продолжали активно расти и развиваться.



Рисунок 3.13 – Оздоровленные растения кок-сагыза, вариант №1, контрольный: кок-сагыз, не обработанный изолятом бактерий *P. putida* и *R. terrigena*

Контрольные растения выдерживают высокие дневные температуры, $T_{\text{днев.}} = 30\text{--}33^{\circ}\text{C}$, продолжают рост и развитие. В экспериментальных вариантах №2 (Рисунок 3.14) и №3 (Рисунок 3.15) растения постепенно увядают, сбрасывают листья, переходят в фазу «летнего покоя». Процессы дефолиации у растений кок-сагыза таким же образом происходят в местах естественного произрастания (Утеулин, 2023). Опадение листьев при повышенных температурах также свойственно гевее бразильской. (Florence et al., 2018; Azizan et al., 2023).



Рисунок 3.14 – Растения кок-сагыза, вариант №2, с симптомами бактериоза, после инокуляции изолятами бактерий *P. putida* и *R. terrigena*



Рисунок 3.15 – Растения кок-сагыза, вариант №3, с симптомами бактериоза, после инокуляции изолятами бактерий *P. putida* и *R. terrigena*

В процесс вегетации растения кок-сагыза в контрольном варианте развивались равномерно (Рисунок 3.13), не переходя в фазу «летнего покоя», далее обильно цвели и завязывали семена. Дефолиация у кок-сагыза в этом случае не наблюдалась. Отсутствие стрессовой реакции на повышенную температуру, а также отсутствие дефолиации косвенно указывает на хорошее физиологическое состояние растений, что может быть связано с оздоровлением от фитопатогенов.

В период по сентябрь-октябрь, после установления относительно низкой дневной температуры, благоприятной для роста кок-сагыза (15–20°C), растения варианта №2 начали восстанавливаться: у них появились новые листья без признаков бактериальной инфекции. В варианте № 3 растения,

обработанные суспензией изолятов бактерий, сначала проявляли признаки восстановления, но далее их рост полностью прекратился, и они погибли. Предполагаем, что в варианте №3 такая реакция на инфицирование бактериальными изолятами *P. putida* и *R. terrigena* может быть связана с прочими эндогенными бактериями растений, их синергизмом в патогенезе, что привело к гибели растений через 27–30 дней после инокуляции. В конце вегетации средняя биомасса оздоровленных растений варианта №1 была примерно в 3 раза выше, чем у растений варианта №2. Соответственно, содержание целевых продуктов было выше: НК в 3,7 раза, инулина примерно в 5 раз. В таблице 3.6, где показано накопление биомассы и продуктивность растений кок-сагыза, в варианте №1 растения стадию «летнего покоя» не проходили, в варианте №2 – проходили.

Таким образом, мы предварительно установили, что причиной «летнего покоя» (дефолиации) растений кок-сагыза, не прошедших цикла оздоровления, является эндогенная микрофлора. У оздоровленных растений в течение вегетации, как в условиях почвы, так и при аэропонном выращивании, дефолиация не наступает.

Таблица 3.6 – Биомасса, содержание НК и инулина в корнях контрольных и экспериментальных растений кок-сагыза за 210 дней вегетации

Варианты		Сырая масса растений, г	Масса сырого корня, г	Содержание НК		Содержание инулина	
				%	мг/растение	%	мг/растение
1.	Кок-сагыз, оздоровленные растения без обработки	106,2±17,8	62,5±11,8	13,5±0,1	1012,5±8,5	28,1±0,1	2107,5±4,5
2.	Кок-сагыз, оздоровленные растения после инокуляции изолятами бактерий	35,7±12,5	21,3±6,1	10,7±0,2	273,5±2,3	16,5±0,1	421,7±3,1

Примечание: Содержание сухого вещества в растениях, выращенных в почве – 20±1 %.

Устранение фазы «летнего покоя» для кок-сагыза имеет большое практическое значение, так как рост, развитие, а также биосинтез целевых продуктов будет происходить непрерывно. В промышленном культивировании от таких растений можно ожидать высокой продуктивности, что ускорит внедрение культуры в практику.

Причины и механизмы, а также факторы запуска процессов патогенеза условно патогенными эндофитами еще предстоит выяснить. Наиболее важным фактором из них является микробиота, содержащая эндофиты и микробы ризосферы (Mortier et al., 2012; Brader et al., 2017). Известно, что *P. putida* является метаболически универсальной почвенной бактерией (Santos et al., 2004). Высокое разнообразие семейств белков, кодируемых её геномом, большое количество и разнообразие инсерционных элементов, повторяющихся палиндромных последовательностей, а также мозаичная структура генома (со многими областями «нетипичного» состава) и множественность мобильных элементов отражают высокое функциональное разнообразие *P. putida* и указывают на её эволюционную траекторию и адаптацию к разнообразным местообитаниям, в которых она обитает (Santos et al., 2004).

Очевидно, что оптимальные условия роста в большинстве экологических сред недостижимы, и поэтому растения, претерпевающие многочисленные абиотические и биотические стрессы, подвержены болезням. Например, ауксин-секретирующий штамм *P. putida* отрицательно влияет на устойчивость *Arabidopsis thaliana* к водному стрессу, при этом способствуя росту растения в условиях хорошего полива. Растения, подвергшиеся водному стрессу с одновременной инокуляцией *P. putida*, демонстрировали признаки увядания и пониженное содержание влаги по сравнению с растениями, испытывающими водный стресс без инокуляции. Конечно, выраженность реакции зависела и от количества инокулята. (Shah et al., 2017).

В естественной среде бактерии вынуждены сталкиваться с различными стрессовыми условиями, такими как углеродное голодание, неоптимальный баланс питательных веществ (например, нехватка источников N или P), изменения в условиях гидратации, высыхание, отсутствие подходящих конечных акцепторов электронов и неоптимальные pH и температура (Ramos et al., 2015). В большинстве случаев при этих изменениях эндофитные микроорганизмы оказывали благотворное влияние на растения. Однако на некоторые изменения факторов окружающей среды, ассоциированные с растениями эндофитные бактерии реагируют весьма своеобразно – происходит активизация катаболических процессов, в результате чего во взаимоотношениях растение – бактерии запускаются процессы патогенеза. Проявление патогенности условно патогенных эндофитов зависит от запуска каскада регуляторных реакций в процессе метаболизма. Патогенные бактерии используют ряд генетических инструментов, чтобы вызвать инфекцию у своих хозяев; в последнее время были достигнуты значительные успехи в идентификации факторов вирулентности условно патогенных бактерий (Kremer et al., 2024). В условиях стресса (например, во время воздействия высоких температур или света высокой интенсивности или голодания, нехватки питательных веществ) активность катаболических процессов может увеличиваться, что позволяет бактериальным клеткам мобилизовать необходимые ресурсы для выживания и восстановления (Mortier et al., 2012; Brader et al., 2017).

В условиях аэропного выращивания метаболизм растений существенно изменяется. Колебания уровня влажности в корневой зоне и на поверхности листьев имеют существенное значение для концентрации, осмолярности и других характеристик компонентов питательного раствора, которые, в свою очередь, влияют на их доступность для адсорбции и усвоения корневыми волосками (Chiaranunt., White, 2023). В период роста и развития кок-сагыза физические и химические параметры среды постоянно изменяются по мере роста корневой системы и листьев, перехода от стадии ювенильной к

стадии старения. Морфология и анатомические особенности тканей и органов также изменяются (Kremer et al., 2024). Одни вещества накапливаются, а биосинтез других веществ замедляется или вовсе прекращается. Эти изменения, безусловно, отражаются на физиологии и биохимии консорциума бактерий, которые всегда присутствуют как на поверхности растений, так и в межклеточном пространстве растительных тканей (Parkinson, Kofoed, 1992). Результаты антагонистических взаимоотношений между условно-патогенными эндофитными бактериями и их хозяевами-растениями зависят от факторов вирулентности индуцированных бактерий, т. е. бактерий, вышедших из состояния «покоя», в ответ на изменения продуктов метаболизма хозяина.

Характерной особенностью развития эндофитных бактерий при фитотронном выращивании растений является то, что они живут в растениях, вынужденных существовать в постоянно меняющейся физической и химической среде. Жизнь и активность эндофитов зависят от типа и количества ассимилятов растений, и эти параметры – важное условие для их стабильной жизнедеятельности. Точно так же количество и состав этих видоспецифичных ассимилятов растений могут контролировать структуру эндофитных сообществ и регулировать их активность (Görke, Stülke, 2008). Под воздействием среды и искусственного света органы растений, а следовательно, и живущие в них бактерии, претерпевают различные преобразования. Это приводит к соответствующим изменениям в метаболизме бактерий (Kremer et al., 2024). Большинство бактерий могут избирательно использовать субстраты из смеси различных источников углерода. Наличие предпочтительных источников углерода предотвращает экспрессию генов и соответствующую активность катаболических систем, которые позволяют использовать альтернативные, более сложно утилизируемые субстраты. Наличие доступных субстратов чаще не провоцирует активизации развития патогенеза, напротив, недостаток доступного субстрата заставляет эндофитных бактерий коренным образом перестраивать взаимодействие с клетками растения-хозяина.

Принимая во внимание, что многочисленные штаммы *P. putida* демонстрируют различные поведенческие характеристики и учитывая, что род *Pseudomonas* с точки зрения патогенности, имеет широко распространенные патогенные виды, такие как *P. aeruginosa* и *P. syringae*, можно предположить, что между этими видами существуют промежуточные формы, обладающие, в зависимости от условий роста, и признаками патогенности, и ростостимулирующими функциями.

3.3.3. Оздоровление растений *T. kok-saghyz* R. с помощью антибиотиков

Антибиотики, которые могут быть эффективны против *P.putida* и *R. terrigena*: бета-лактамы антибиотики, цефалоспорины 3-го и 4-го поколений, карбапенемы (меропенем), аминогликозиды (гентамицин), тетрациклины, полимиксины (колистин). Так как *R. terrigena* может проявлять устойчивость к некоторым антибиотикам, особенно к бета-лактамам, включая цефалоспорины, в анализ был включен хлорамфеникол – антибиотик широкого спектра действия, который ингибирует синтез белка у бактерий, связываясь с их рибосомами (50S субъединица) (Егоров и др., 2018), и нитроксолин, ингибирующий бактериальную ДНК-гиразу (топоизомеразу II), нарушая репликацию ДНК и вызывая гибель бактерий (Соловьев, Петров, 2013).

Спектрофотометрический анализ показал, что действенными против конкретных патогенов являются антибиотики и пределы их концентраций, представленные в тепловых картах на таблицах 3.7 и 3.8. Значения оптической плотности менее 0,1, помеченные синим и светло-синим цветом, свидетельствуют об элиминировании роста бактерий при использовании антибиотика в данной концентрации. Значения оптической плотности более 0,1, помеченные красным и светло-красным цветом говорят о наличии ростовой активности бактерий, из чего следует, что данный антибиотик в указанной концентрации неэффективен.

Таблица 3.7 – Результаты спектрального анализа воздействия антибиотиков на *P. putida*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>P. putida</i>	Ампицилин	Спектиномицин	Цефазолин	Цефоперазон + сульбактам	Хлорамфеникол	Канамицин	Меропенем	Тиментин	Колистин	Гентамицин	Гигромицин В	Нитроксолин
A	250	1000	1000	1000	250	500	500	500	500	500	500	1000
B	125	500	500	500	125	250	250	250	250	250	250	500
C	62,5	250	250	250	62,5	125	125	125	125	125	125	250
D	31,25	125	125	125	31,25	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125
E	15,6	62,5	62,5	62,5	15,6	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	62,5
F	7,8	31,3	31,3	31,3	7,8	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	31,3
G	3,9	15,6	15,6	15,6	3,9	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	3,9

Таблица 3.8 – Результаты спектрального анализа воздействия антибиотиков на *R. terrigena*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>R. terrigena</i>	Ампицилин	Спектиномицин	Цефазолин	Цефоперазон + сульбактам	Хлорамфеникол	Канамицин	Меропенем	Тиментин	Колистин	Гентамицин	Гигромицин В	Нитроксолин
A	250	1000	1000	1000	250	500	500	500	500	500	500	1000
B	125	500	500	500	125	250	250	250	250	250	250	500
C	62,5	250	250	250	62,5	125	125	125	125	125	125	250
D	31,25	125	125	125	31,3	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	125
E	15,6	62,5	62,5	62,5	15,6	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	62,5
F	7,8	31,3	31,3	31,3	7,8	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	31,3
G	3,9	15,6	15,6	15,6	3,9	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	3,9

В ходе данного анализа было установлено влияние ряда антибиотиков на рост развитие *P. putida* и *R. terrigena*. Опираясь на данные о фитотоксичности (Brian, 1957; Liu et al., 2009; Carballo et al., 2022) были отобраны антибиотики и определены их концентрации для дальнейшего оздоровления растений с признаками бактериальной инфекции. Оздоровление

проводили путем культивирования растений *in vitro* на питательной среде, содержащей антибиотики, в течение 3 суток (Таблица 3.9), эффективность оздоровления проверяли последующим анализом ПЦР на наличие ДНК *P. putida* и *R. terrigena*. Процент эффективности оздоровления определяли по соотношению выживших растений и растений без бактериальной контаминации к общему числу растений, использовавшихся для оздоровления.

Таблица 3.9 – Эффективность оздоровления кок-сагыза

Антибиотик		Кол-во растений (<i>in vitro</i>)		Кол-во растений, выживших в ходе оздоровления		Кол-во растений, прошедших отбор на отсутствие ДНК <i>P. Putida</i> и <i>R. terrigena</i>		Эффективность оздоровления, %	
Название	Конц., мг/л	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Нитроксолин	3,9	25	100	5	20	5	100	5	20
Меропинем	7,8	25	100	8	32	5	63	5	20
Цефоперазон + сульбактам	125	25	100	23	92	20	87	20	80
Колистин	15,6	25	100	25	100	22	88	22	88
Гентамицин	31,3	25	100	16	64	4	25	4	16
Спектиномицин	500	25	100	20	80	10	50	10	40

ПЦР-анализ для подтверждения факта оздоровления растений кок-сагыза от идентифицированных патогенов показал эффективность использованных антибиотиков (Рисунок 3.16, 3.17).

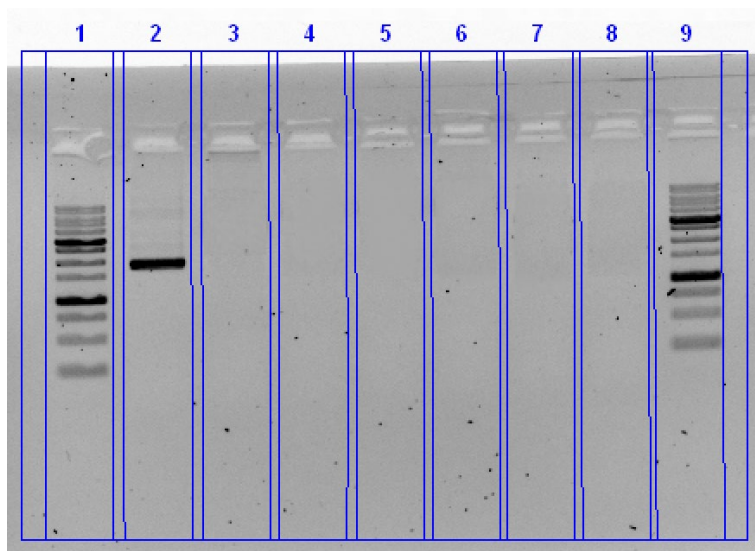


Рисунок 3.16 – Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие бактериальной контаминации, где 1 и 9 – маркер длин ДНК 1 kb (DNA Ladder 1 kb, «Евроген», Россия), 2 – ДНК *P. putida* (положительный контроль), 3 – dH₂O (отрицательный контроль), 4-8 – ДНК оздоровленных растений кок-сагыза

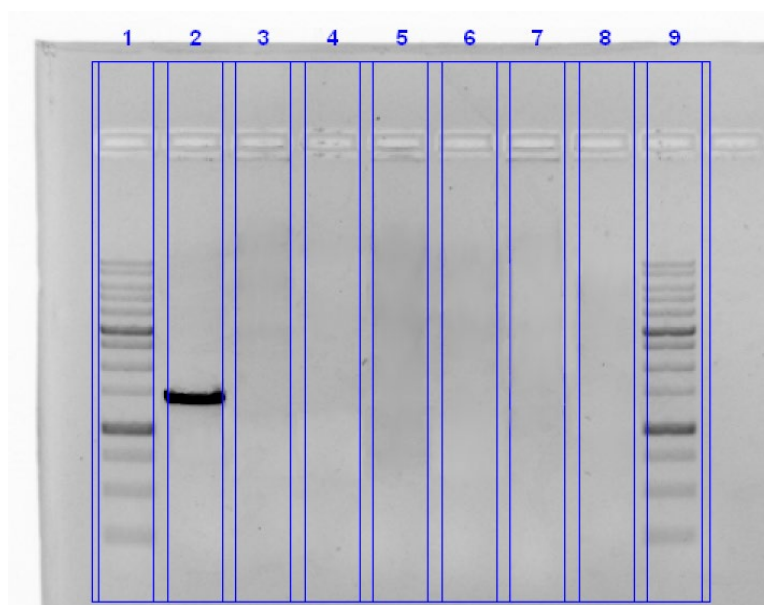


Рисунок 3.17 – Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие бактериальной контаминации, где 1 и 9 – маркер длин ДНК 1 kb (DNA Ladder 1 kb, «Евроген», Россия), 2 – ДНК *R. terrigena* (положительный контроль), 3 – dH₂O (отрицательный контроль), 4-8 – ДНК оздоровленных растений кок-сагыза

Согласно результатам, представленным в таблице 3.18, наибольший процент оздоровленных растений получали при использовании сочетания цефоперазона и сульбактама (88%) и колистина (80%). Необходимо отметить, что несмотря на низкий процент выживших растений после воздействия антибиотика нитроксолина, полученные регенеранты развивались хорошо и в дальнейшем, в процессе роста и развития, в корнях не проявились признаки бактериоза. Эффективность действия нитроксолина объясняется ингибированием ферментов бактериальных топоизомераз, участвующих в репликации и репарации ДНК бактерий. Нитроксолин также способствует образованию активных форм кислорода в бактериальных клетках (Rerac et al., 2022).

Для достоверности наблюдали развитие корней оздоровленных растений с течением времени. Корни инфицированных растений *in vitro* обрезали до каудекса и сажали на среду, содержащую антибиотики. Через 3 суток растения пересаживали на аналогичную среду MS без антибиотиков. На рисунке 3.18 А, Б показано образование новых корней на месте среза спустя 2 недели после оздоровления, на рисунке 3.18 В, Г – спустя месяц. Визуально выросшие корни можно характеризовать, как светлые, без некротических зон, питательная среда в прикорневой зоне также была прозрачной, без помутнений, характерных для бактериальной контаминации.

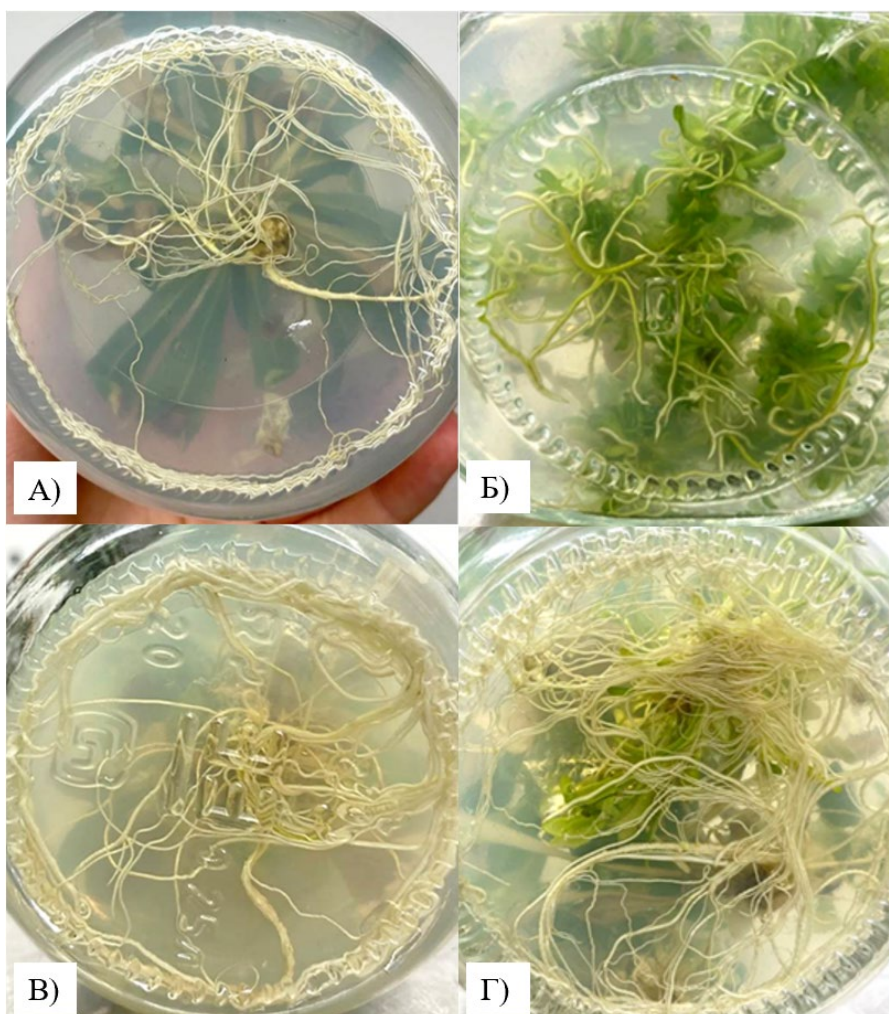


Рисунок 3.18 – Регенерация корней кок-сагыза, после оздоровления на средах, содержащих антибиотики: А), Б) спустя 2 недели после оздоровления; В), Г) спустя месяц после оздоровления

3.3.4. Оздоровление растений *T. kok-saghyz* R. с помощью бактериофагов

Получение и применение бактериофагов для оздоровления растений кок-сагыза от бактериальных патогенов, в частности, от *P. putida* и *R. terrigena*, в литературных источниках ранее не упоминалось.

Бактериофаги специфически инфицируют бактерии, их репликация приводит к лизису их бактериального хозяина и высвобождению вновь образованных вирусных частиц. В последнее время бактериофаги активно используются в качестве агентов биологического контроля против бактериальных патогенов. Применение фагов и фаговых лизинов в борьбе с

болезнями растений является перспективным средством и в ряде случаев показало положительные результаты. Например, такие экономически значимые бактериальные патогены, как *Xanthomonas* spp. и *Pseudomonas syringae*, могут эффективно контролироваться фагами. В настоящее время ведется разработка оптимальных методов доставки и обеспечение более длительного срока хранения фага и его ферментов на растении-хозяине (Pandit et al., 2022).

Чтобы выяснить, способны ли выделенные нами фаги лизировать своего бактериального хозяина в растениях, были проведены исследования на культуре корней кок-сагыза «*hairy roots*» в жидкой и на твердой среде (Рисунок 3.19).

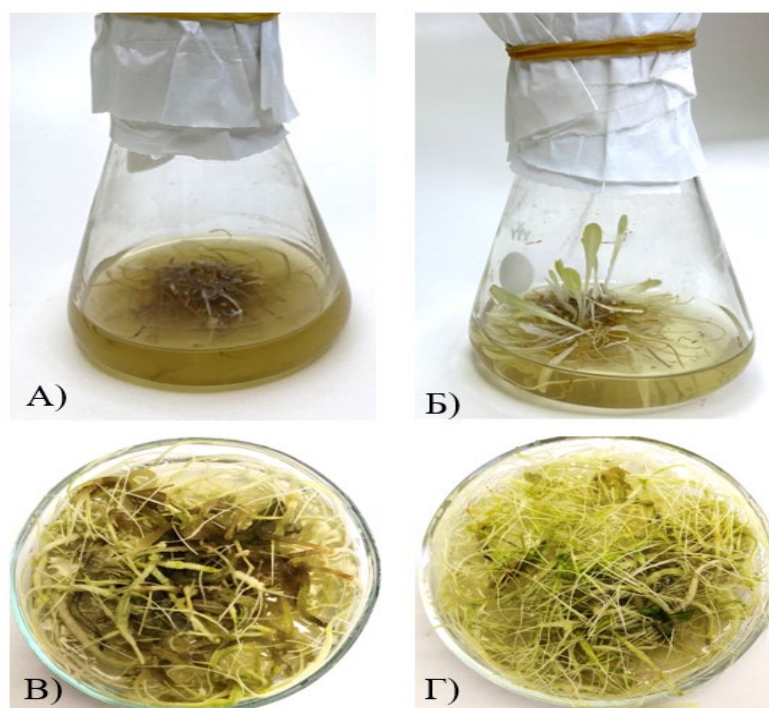


Рисунок 3.19 – Регенерация корней кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*», в процессе оздоровления на среде, содержащей смесь бактериофагов: А), В) пораженные бактериями корни; Б), Г) корни через 25 суток после действия бактериофагов

Для доказательства эффективности выделенных нами фагов в среды добавляли смесь фагов в концентрации 10^9 БОЕ/мл (бляшкообразующая единица). Через 20–25 суток культивирования наблюдали осветление культуральной жидкости, появление вновь образованных корней без признаков бактериальных поражений и образование регенерантов (Рисунок 3.19 Б). Такие же морфологические изменения наблюдаются на твердой среде. Вновь образованные корни белые, видно начало процесса регенерации оздоровленных побегов (Рисунок 3.19 Г). Проведя несколько пассажей на среде, содержащей смесь бактериофагов, мы получили свободную от *P. putida* и *R. terrigena* культуру корней.

Смеси бактериофагов являются возможным вариантом для борьбы с различными болезнями растений, однако для достижения успешного биологического контроля необходимы дальнейшие исследования и решение технических вопросов способов применения. Требуются фундаментальные и практические знания о взаимодействии между растением, фагом и патогеном, поскольку среда обитания каждой растительной системы уникальна и сложна. Этого можно достичь только путем проведения более обширных полевых экспериментов, поскольку тесты *in vitro* и *in vivo* в лабораторных условиях не отражают реальные обстоятельства в полевых условиях. На сегодняшний день уже созданы коммерческие продукты на основе фагов для использования в сельском хозяйстве, предназначенные для борьбы с двумя патогенами томатов, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* и *P. syringae* pv. и против картофельной гнили (Rombouts et al., 2016).

По нашему мнению, одна из причин, которая активно способствовала сохранению кок-сагыза в нынешнем ареале произрастания, может быть связана с наличием специфических бактериофагов, которые успешно защищают корни растений от многочисленных бактериальных фитопатогенов. Поэтому, для обеспечения максимальной защиты от фитопатогенов в аэропонной среде, а также при культивировании плантационным способом, помимо других средств защиты, мы рекомендуем применять фаги.

Предполагаем, что наиболее эффективными были бы бактериофаги, выделенные из среды в местах естественного произрастания кок-сагыза. Разработка и применение биологического препарата на основе специфичных бактериофагов открывает перспективу контроля фитопатогенных бактерий при промышленном культивировании, как с применением аэропонных технологий, так и плантационным способом.

3.4. Исследование отдельных параметров минерального питания *T. kok-saghyz* R. при выращивании в аэропонном фитотроне

Многочисленные исследования показали, что удобрения играют важную роль в росте и урожайности кок-сагыза. Однако имеющаяся информация часто носит фрагментарный характер, и, если анализировать и систематизировать полученные данные, можно сделать вывод, что эффективность удобрений в основном зависит от местных почвенных и климатических условий.

Основным фактором, обеспечивающим сохранность и распределение кок-сагыза на площади его ареала, являются почвы и климатические условия (Утеулин, 2023). Необходимо отметить, что условия на местах естественного произрастания могут быть не самыми благоприятными, и зачастую не позволяют полностью раскрыть генетический потенциал вида. При переносе в другие, более благоприятные почвенные и климатические условия, рост и развитие растений кок-сагыза существенно улучшается (Бари и др., 2021). Для разработки технологии выращивания растений кок-сагыза нам необходимо было подобрать оптимальное соотношение основных макро- и микроэлементов, их общее содержание, электропроводимость (Ес) и рН питательного раствора. Природная популяция кок-сагыза сильно ограничена, он растет только в определенных зонах и является эндемиком межгорных долин Тянь-Шаня. Возможно, что основная причина узкого ареала произрастания кроется в химическом составе, структуре и микробиоме почвы,

а также в климатических условиях этих мест. Исходя из этих предположений, мы проанализировали содержание некоторых химических элементов в почве, взятой из мест естественного произрастания растений кок-сагыза (Казахстан, долина озера Тузколь) (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Содержание химических элементов в почве, взятой из мест естественного произрастания растений кок-сагыза

N, мг/г	P, мг/г	K, мг/г	Ca, мг/г	Mg, мг/г	B, мг/г	I, мг/г	Na, мг/г	Fe, мг/г	Ce, мкг/г	Li, мкг/г	La, мкг/г
60±2	90±1,2	20,5±0,7	75,8±0,7	18±0,8	2,8±0,1	36,3±3,8	10,4±0,4	28±1	38±7	120±30	21±1
Sr, мкг/г	Y, мкг/г	Yb, мкг/г	Zn, мкг/г	Ni, мкг/г	Pb, мкг/г	Sc, мкг/г	Co, мкг/г	Cr, мкг/г	Cu, мкг/г	Ba, мкг/г	Mn, мкг/г
437±6	16,3±0,5	1,94±0,06	70±3	24±1	140±20	8,7±0,2	8,4±0,5	43±2	60±3	543±9	770±10

Также учитывая результаты анализа почвы, полученные другими исследователями (Uteulin et al., 2023), мы разработали питательный раствор для выращивания кок-сагыза в аэропном фитотроне (Таблица 3.11).

Для изучения влияния элементов минерального питания использовали оздоровленные от фитопатогенов и микроклонально размноженные растения коллекционного образца В-391 (ВИР) и образца К-31 популяции «Сарыжас», семена которого любезно были переданы доктором К. Р. Утеулиным. По сравнению с коллекционным образцом В-391, образец К-31 показал высокое содержание НК, до 14%, и инулина, до 24 % (Таблица 3.1). Хотя по другим ростовым параметрам между ними достоверных различий мы не наблюдали.

Первоначальный состав питательного раствора был разработан на основе анализа содержания химических элементов в верхнем слое почвы (20–25 см), взятой в районе озера Тузколь (Соленое озеро). Раствор характеризовался повышенным содержанием ионов кальция, калия, магния, микроэлементов, Ес до 2,5, рН до 8,0. По нашим наблюдениям, растения росли медленно. Был сделан вывод, что хотя эти условия способствуют сохранению вида кок-сагыза, но не способствуют быстрому росту и накоплению большой

биомассы корней и листьев. Поэтому, учитывая особенности химического состава почвы (Uteulin et al., 2023.), такие, как высокое содержание йода и других микроэлементов, высокий pH (8,0–8,5), мы разработали другую рецептуру питательного раствора (Таблица 3.11), что обеспечило более высокие ростовые показатели.

Также изучалось влияние дополнительного внесения, по отдельности, коллоидных растворов серебра (Ag), цинка (Zn) и меди (Cu), а также йодида калия (KI) на морфогенез растений кок-сагыза и накопление ими целевых веществ.

Таблица 3.11 – Питательный раствор для выращивания кок-сагыза в аэропонном фитотроне

Оцениваемые параметры	Показатели в растворе		Пределы колебаний	
	mmol/l	мг/литр	mmol/l	мг/литр
NH_4^+	0,5	9,025	0,4 – 0,5	8,8–9,6
K^+	7,0	273,7	6,0 – 9,0	266,9–290,8
Na^+	2,5	54,475	1,0 – 4,0	53,1–57,9
Ca^{2+}	7,0	280,56	6,0 – 9,0	273,5–298,1
Mg^{2+}	3,0	72,93	2,0 – 4,0	71,1–77,5
NO_3^-	16,0	992,16	12,0 – 20,0	967,4–1054,2
SO_4^{2-}	4,5	432,315	3,0 – 6,0	421,5–459,3
HCO_3^-	1,0	61,02	0,1 – 1,5	59,5–64,8
H_2PO_4^-	1,5	145,485	1,0 – 2,0	141,8–154,6
Fe^{2+}	0,9	34,2	0,7 – 1,5	33,3–36,3
Mn^{2+}	0,7	38,458	0,3 – 1,2	37,5–40,9
Zn^{2+}	0,7	45,773	0,5 – 1,5	44,6–48,6
B	0,5	5,405	0,3 - 1,0	5,3–5,7
Cu^{2+}	0,7	44,485	0,4 – 1,5	43,4–47,3
Ec (mS/cm)	2,2 – 2,5		2,0 – 3,5	
pH	5,8 – 6,2		5,4 – 7,5	

Результаты исследования представлены в таблице 3.12 и 3.13, где $вР$ – высота растения целиком, $дК$ – длина корня, $дЛ$ – длина самого крупного листа, $мР$ – масса растения целиком, $мК$ – масса корня, $мЛ$ – масса листьев

Таблица 3.12 – Влияние микроэлементов в коллоидной форме на морфометрические показатели растений кок-сагыза и на биосинтез каучука и инулина в фитотроне

Элемент	%	вР, см	дК, см	дЛ, см	мР, г	мК, г	мЛ, г	НК, %	Инулин, %
Контр.	0	29,8±0,2	21,3±0,6	7,8±0,7	42,2±1,1	34,5±1,2	7,8±0,6	11,5±0,9	20,7±1,8
Cu	0,0008	34,2±0,3***	20,5±0,6**	7,5±0,7**	37,7±0,9**	31,9±1,1***	6,1±0,5**	9,8±0,8***	17,6±1,5***
	0,0016	33,6±0,3***	19,2±0,6**	7,7±0,7 ns	37,2±0,9***	32,4±1,1*	6,7±0,5**	11,1±0,9 ns	18,6±1,6 ns
	0,0025	34,7±0,3***	22,1±0,7**	7,9±0,7 ns	38,1±0,9***	34,3±1,2 ns	7,2±0,5*	13,3±1,2***	19,6±1,7 ns
	0,0033	35,2±0,3***	23,3±0,7***	8,1±0,8***	38,8±0,9***	33,5±1,2 ns	7,8±0,6 ns	12,5±0,9***	20,6±1,7 ns
Zn	0,0008	32,6±0,3***	21,6±0,6 ns	8,7±0,8***	40,3±1,2***	35,8±1,3***	7,4±0,5*	9,6±0,8***	21,7±1,8 ns
	0,0016	32,5±0,3***	24,2±0,7***	8,1±0,7***	39,9±1,5***	35,7±1,2**	8,4±0,6***	13,1±0,9***	22,7±1,9***
	0,0025	31,5±0,2***	26,4±0,8***	8,5±0,8***	39,8±1,8***	37,2±1,3***	7,9±0,6 ns	12,6±1,1***	23,7±2,1***
	0,0033	32,3±0,4***	22,1±0,7**	8,7±0,7***	40,1±1,5***	34,7±1,2 ns	6,7±0,5**	12,2±1,8***	20,6±1,7 ns
Ag	0,0008	34,2±0,3***	20,5±0,6**	7,5±0,7***	37,7±0,9***	31,9±1,1**	6,1±0,5**	10,7±0,9 ns	20,6±1,7 ns
	0,0016	33,6±0,3***	19,2±0,6**	7,7±0,7 ns	37,2±0,9***	32,4±1,1*	6,7±0,5**	11,2±0,9 ns	23,7±2,3***
	0,0025	34,7±0,3***	22,1±0,7**	7,9±0,7 ns	38,1±0,9***	34,3±1,2 ns	7,2±0,5*	12,5±1,2***	21,7±1,8 ns
	0,0033	36,2±0,3***	25,3±0,8***	8,5±0,8***	40,8±1,1*	39,4±1,4***	9,8±0,7***	11,9±1,5 ns	22,7±1,9***
KI	0,1	29,9±0,2 ns	21,5±0,6 ns	7,7±0,7 ns	42,3±1,4 ns	34,4±1,2 ns	8,1±0,6***	11,2±1,1 ns	23,2±2,1***
	0,25	38,7±0,3***	25,8±0,9***	8,1±0,8***	38,5±1,1*	34,8±1,3 ns	7,6±0,7***	11,3±0,5 ns	23,4±2,5***
	0,5	41,3±0,4***	32,3±1,5***	9,9±0,9***	53,9±1,3***	42,7±1,5***	11,5±0,8**	13,2±1,1***	28,7±2,7***
	1	40,7±0,3***	30,8±0,9***	9,1±0,8***	45,5±1,1***	36,8±1,3***	8,9±0,7***	12,1±1,1***	28,4±2,5***

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с пятью повторами внутри каждого.

Анализ проведен тестом Даннета, ns - >0,9999, * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001

Все коллоидные растворы в качестве дополнения к питательному раствору обеспечили некоторое увеличение сырой биомассы растений кок-сагыза. Наилучшим образом с точки зрения увеличения биомассы до $(53,9 \pm 1,3 \text{ г})$ действовал 0,5 % раствор KI, примечательно, что данная его концентрация также положительно сказалась на увеличении биомассы корней (до $42,7 \pm 1,5 \text{ г}$).

На содержание НК наиболее положительно сказывалось внесение в питательный раствор коллоидного раствора Cu ($0,0025 \%$), Zn ($0,0016 \%$) и 0,5% раствора KI. На содержание инулина наиболее положительно сказывалось внесение в питательный раствор коллоидного раствора Cu ($0,0033 \%$), Zn ($0,0016 \%$) и раствора KI во всех изученных концентрациях. Под влиянием Cu морфология растений и биомасса существенно не изменяются, однако содержание каучука увеличивается до $13,3 \pm 1,2\%$, а инулина до $20,6 \pm 1,7 \%$. Под влиянием Zn содержание каучука увеличивается до $13,1 \pm 0,9\%$, а инулина до $23,7 \pm 2,1\%$, морфобиометрические параметры практически не меняются. Ag положительно влияет на рост растений и содержание инулина, однако его внесение несущественно влияет на содержание НК.

Показано, что данные элементы стимулируют нарастание сырой массы корней и положительно сказываются на накоплении НК корнями кок-сагыза. Наличие этих микроэлементов, особенно KI, в питательном растворе также обуславливает устойчивость растений к бактериальным и грибковым заболеваниям. Наши результаты частично подтверждаются работами других авторов (Ничипорович, 1936; Утеулин, 2023).

Таблица 3.13 – Влияние элементов минерального питания на морфометрические показатели кок-сагыза и на биосинтез НК и инулина при культивировании в фитотроне

Элемент	Конц, ммоль/ литр	вР, см	дК, см	дЛ, см	мР, г	мК, г	мЛ, г	НК, %	Инулин, %
Контр.	0	29,8±0,2	21,3±0,6	7,8±0,7	42,2±1,1	34,5±1,2	7,8±0,6	11,5±0,9	20,7±1,8
N	20	40,1±0,3***	28,2±0,4**	9,1±0,8***	45,1±1,1**	36,5±1,3*	8,8±0,5***	11,8±1,1 ns	22,1±1,9 ns
	24	40,5±0,3***	30,2±0,9***	9,07±0,8***	45,13±1,1**	36,5±1,2*	8,8±0,7***	11,9±1,8 ns	22,5±1,85 ns
	32	42,8±0,3**	32,2±1,5***	9,7±0,9***	51,6±1,3***	41,5±1,4***	10,4±0,8***	13,3±1,1***	20,9±1,8 ns
P	8,8	27,1±0,2*	19,3±0,6*	7,1±0,7*	39,8±1,4**	32,7±1,1**	7,3±0,5**	10,8±0,9 ns	23,1±2,1***
	10,5	27,8±0,2*	19,9±0,6*	7,3±0,7*	40,5±1,7**	33,1±1,1**	7,6±0,6*	10,5±0,9 ns	20,3±1,7 ns
	14	30,1±0,2 ns	21,3±0,6 ns	8,1±0,8***	43,1±1,1 ns	34,4±1,2 ns	8,9±0,7***	12,2±1,5***	17,7±1,5***
K	1,9	30,8±0,3*	21,6±0,6 ns	8,7±0,8***	43,2±1,4**	35,7±1,2 ns	7,4±0,5*	10,6±0,9 ns	18,9±1,6***
	2,3	31,1±0,3 **	24,1±0,7*	8,2±0,7***	44,3±1,1**	35,7±1,2 ns	8,4±0,6***	12,4±1,2***	20,8±1,8 ns
	3	30,1±0,2*	26,2±0,8***	8,1±0,8***	44,7±1,1**	37,4±1,3***	7,9±0,6 ns	13,2±1,1***	23,8±2,3***
Ca(NO₃)₂	3,8	27,4±0,2*	19,3±0,6*	7,1±0,7*	39,8±1,5*	32,7±1,1**	7,3±0,5*	10,8±0,9 ns	23,1±2,5***
	4,5	27,8±0,2**	19,9±0,6*	7,3±0,7*	40,5±1,7*	33,1±1,1**	7,6±0,6**	10,5±0,9 ns	18,9±1,6***
	6	30,1±0,2 ns	21,3±0,6 ns	8,1±0,8***	43,1±1,1**	34,1±0,9 ns	8,9±0,7***	13,2±1,5***	20,7±1,8 ns
Mg(NO₃)₂	8,8	29,8±0,2 ns	21,3±0,6 ns	7,8±0,5 ns	42,2±1,5 ns	34,5±1,2 ns	7,8±0,6 ns	11,1±1,4 ns	22,8±1,9 ns
	10,5	40,1±0,3***	30,2±0,9***	7,1±0,8*	45,1±1,1***	36,5±1,3**	8,8±0,6***	11,8±1,6 ns	24,3±2,4***
	14	42,8±0,3***	32,2±1 ***	9,7±0,9***	51,6±1,3***	41,5±1,4***	10,4±0,8***	12,5±1***	20,9±1,8 ns

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с пятью повторами внутри каждого.

Анализ проведен тестом Даннета ns - >0,9999, * - p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,00

Исходя из результатов, приведенных в таблице 3.13, можно сделать заключение, что повышенные концентрации микроэлементов в питательном растворе, а также в листовых подкормках, в определенной степени стимулируют биосинтез и накопление каучука и инулина. Причины могут быть различные. С одной стороны, эти микроэлементы участвуют в физиологических и биохимических реакциях, с другой стороны, возможно, они подавляют активность внутренних, эндофитных фитопатогенов, таким образом улучшаются ростовые и биосинтетические процессы.

НРК были добавлены в бак в питательный раствор для корневого питания, а $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ использовались в виде листовых подкормок.

Результаты, представленные в таблице 3.13, отражают общую закономерность между нарастанием биомассы и повышением продуктивности растения в отношении целевого вещества, НК. При добавлении N до 32 мМ/л, содержание НК достигало $13,3 \pm 1,1\%$, также отметим положительное влияние добавочного калия (3м М/л), приводящее к увеличению содержания НК до $13,2 \pm 1,1\%$, а также фосфора (14 мМ/л), увеличивавшего содержание НК до $12,2 \pm 1,5\%$. Листовые подкормки $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (6 мМ/л) и $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (14 мМ/л) тоже увеличили содержание каучука до $13,2 \pm 1,5\%$ и $12,5 \pm 1\%$, соответственно.

В условиях аэропонного культивирования важным для продуктивности фактором является количество и правильное соотношение химических элементов в растворе. Также критично важна буферная емкость питательного раствора, так как в течение 14–16 дней из-за активных метаболических процессов в корнях рН раствора может быстро переходить из слабощелочного (рН 7,5–7,8) в кислый (рН 3,5–4). От рН питательного раствора сильно зависит рост растений. При кислотности 3,5–4,0 начинается потемнение, далее отмирание корневых волосков, что приводит к резкому ухудшению ростовых процессов. С одной стороны, необходимо, чтобы в питании не возникал лимитирующий фактор, с другой стороны, необходимо так сочетать состав элементов, чтобы не возникало осадения основных из них, таких, как кальций и сульфат-ионов. Выпадение в

осадок может привести к дефициту этих соединений в растениях, кроме этого, из-за осадка ухудшается работа системы полива растений. Для оптимизации использования удобрений и снижения затрат на культивирование кок-сагыза необходимо выявить критические периоды роста и развития культуры и их соответствующие потребности в минеральных элементах. Это позволит более эффективно управлять метаболизмом растений кок-сагыза, своевременно распределять отток метаболитов из листьев в корни, что может ускорять биосинтез каучука и инулина.

Принимая во внимание среднее содержание каучука в 11% сухой биомассы и нарастание этого показателя до 13%, в приблизительном исчислении, можно утверждать, что прирост НК за счет применения дополнительного минерального питания составил 18%. Максимальный прирост биомассы растений составил 28%, это позволяет заключить, что кок-сагыз в достаточной степени отзывчив на применение минеральных удобрений.

Дополнительное минеральное питание также положительно сказывалось на увеличении концентрации инулина. При дополнительном внесении фосфора в концентрации 8,8 мМ/л содержание инулина достигло $23,1 \pm 2,1\%$. При добавлении калия до 3 мМ, – $23,8 \pm 2,3\%$. Максимальная концентрация инулина ($24,3 \pm 2,4\%$.) была получена при применении $Mg(NO_3)_2$ в качестве листовой подкормки в концентрации 10,5 мМ/л.

Таким образом, наибольшее влияние на рост растений оказывало дополнительное внесение N, $Mg(NO_3)_2$ и йода (KI). Наибольшее влияние на содержание каучука оказывали N, K и Zn. Наибольшее влияние на содержание инулина оказывали йод (KI), Ag и $Mg(NO_3)_2$. Если сравнивать с контрольной группой растений, то дополнительное внесение элементов стимулировало рост и продуктивность растений. Полученные нами результаты сопоставимы с результатами других авторов (Wahler et al., 2012, Чжан и др., 2023), также было

показано, что дополнительное внесение азота и фосфора положительно влияют на ростовые процессы и синтез каучука у растений кок-сагыза.

3.5. Исследование влияния различных участков спектра видимого света на рост и развитие растений *T. kok-saghyz* R. в аэропонном фитотроне

3.5.1. Исследование активности фотосинтетического аппарата ряда различных коллекционных образцов *T. kok-saghyz* R.

На данном этапе работы проводилось изучение интенсивности фотосинтетического аппарата ряда образцов кок-сагыза при выращивании в аэропонных условиях при облучении полносpekтральными СД (светодиодными облучателями) с уровнем интенсивности света 400 ± 6 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ фотонов (табл 3.14) и при насыщающей (теоретической) интенсивности света 1200 ± 10 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ фотонов.

Таблица 3.14 – Уровни интенсивности фотосинтеза листьев кок-сагыза различных коллекционных образцов, выращенных в аэропонном фитотроне, при интенсивности света 400 и 1200 мкмоль·м⁻²·с⁻¹

Коллекционные образцы кок-сагыза	Скорость фотосинтеза при 400 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	Скорость фотосинтеза при 1200 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹
В-242	2,9±0,2 (с)	11,3±1,1 (С)
В-247	3,6±0,1 (b)	12,0±0,9 (BC)
К-31	3,5±0,1(b)	13,8± 0,8 (B)
В-391	4,4± 0,2 (a)	20,6± 1,8 (A)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Большая скорость фотосинтеза при интенсивности света во время выращивания ($400 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) отмечена у растений коллекционных образцов В-391 ($p < 0,0001$). Эти растения характеризуются высокими значениями потенциального фотосинтеза (при $1200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), т. е. могут показать высокую продуктивность при высоких уровнях интенсивности света (Мартиросян и др. 2023).

Далее определены параметры переменной флуоресценции хлорофилла *a* и *b* (Таблица 3.15).

Таблица 3.15 – Параметры переменной флуоресценции листьев кок-сагыза различных коллекционных образцов, выращенных в аэропонном фитотроне, при интенсивности света $400 \pm 6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$

Коллекционные образцы кок-сагыза	Fv/Fm	Y(II)	ETR	NPQ
В-242	$0,85 \pm 0,01$ (AB)	$0,6 \pm 0,01$ (A)	$37,05 \pm 0,48$ (C)	$0,6 \pm 0,01$ (B)
В-247	$0,81 \pm 0,01$ (B)	$0,54 \pm 0,01$ (B)	$42,9 \pm 0,33$ (A)	$0,6 \pm 0,01$ (B)
К-31	$0,83 \pm 0,01$ (B)	$0,56 \pm 0,01$ (B)	$39,24 \pm 0,3$ (B)	$0,54 \pm 0,01$ (C)
В-391	$0,92 \pm 0,01$ (A)	$0,62 \pm 0,01$ (A)	$44,06 \pm 0,57$ (A)	$0,84 \pm 0,01$ (A)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Fv/Fm – показатель функционального состояния фотосинтетического аппарата, в том числе стрессового состояния организма. Y(II) – реальная квантовая эффективность фотосинтеза (при условиях выращивания). NPQ – показатель нефотохимического тушения, который оценивает часть энергии, используемой растением для нефотохимических реакций. ETR – показатель скорости транспорта электронов, косвенный показатель скорости фотосинтеза (Мартиросян и др. 2023).

Оценка активности первичных процессов фотосинтеза с использованием метода переменной флуоресценции показала, что низкая скорость фотосинтеза коллекционного образца В-242 (Таблица 3.15) может быть связана с низкой скоростью транспорта электронов в электрон-транспортной цепи хлоропластов (Таблица 3.15). При этом, однако, высокая скорость потока электронов у растений коллекционных образцов В-247 и высокие значения фотохимической эффективности ФС II не реализуются растениями в накоплении биомассы, возможно, вследствие значительных трат энергии на процессы, не связанные с фотосинтезом, а также низким содержанием хлорофиллов (Таблица 3.16) (Мартиросян и др. 2023).

Таблица 3.16 – Содержание хлорофилла в листьях растений кок-сагыза различных линий, мг/г сырой массы

Коллекционные образцы кок-сагыза	Хлорофил <i>a</i>	Хлорофил <i>b</i>	Каротиноиды	Хлорофил (<i>a+b</i>)	Хлорофил <i>a/b</i>
В-242	0,54±0,01 (A)	0,11±0,01 (B)	0,12±0,01 (A)	0,65±0,01 (A)	4,92±0,06 (A)
В-247	0,3±0,01 (D)	0,1±0,01 (C)	0,08±0,01 (C)	0,4±0,01 (C)	3±0,04 (D)
В-391	0,41±0,01 (C)	0,1±0,01 (C)	0,1±0,01 (B)	0,52±0,01 (B)	4,11±0,05 (B)
К-31	0,5±0,01 (B)	0,13±0,01 (A)	0,12±0,01 (A)	0,63±0,01 (A)	3,84±0,05 (C)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Был изучен CO₂-газообмен интактных листьев растений кок-сагыза. Измерения проводили на листьях в 6–8-кратной повторности (Таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Параметры аппроксимации световых кривых CO_2 -газообмена листьев кок-сагыза различных коллекционных образцов, выращенных в аэропонном фитотроне, при интенсивности света $400 \pm 6 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$

Коллекционные образцы кок-сагыза Параметры	B-242	B-247	K-31	B-391
Максимальная скорость поглощения CO_2 , $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.	$12,72 \pm 0,16$ (D)	$15,82 \pm 0,2$ (C)	$22,13 \pm 0,29$ (B)	$31,14 \pm 0,4$ (A)
Скорость темнового выделения CO_2 , $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	$-2,8 \pm 0,04$ (D)	$-4,31 \pm 0,06$ (C)	$-3,2 \pm 0,04$ (B)	$-1,9 \pm 0,02$ (A)
Эффективный квантовый выход ФС II	$0,3 \pm 0,01$ (C)	$0,3 \pm 0,01$ (B)	$0,3 \pm 0,01$ (B)	$0,5 \pm 0,01$ (A)
Интенсивность света при насыщении световой кривой $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	$537,69 \pm 6,96$ (C)	$578,74 \pm 7,5$ (C)	$730,93 \pm 9,47$ (B)	$832,06 \pm 10,78$ (A)
Световой компенсационный пункт, $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	$97,12 \pm 1,26$ (AB)	$105,13 \pm 1,36$ (A)	$92,12 \pm 1,19$ (C)	$99,13 \pm 1,28$ (BC)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Максимальная скорость фотосинтеза – это максимальная скорость ассимиляции CO_2 при насыщающей интенсивности света, показывает, насколько эффективно растение использует свет для фотосинтеза.; **темновое дыхание** – это скорость выделения CO_2 при отсутствии света (в темноте), отражает дыхательные потери растения; **квантовая эффективность** – это начальный наклон световой кривой при низкой интенсивности света, показывает, насколько эффективно растение использует слабый свет для фотосинтеза; **световая компенсационная точка** – это интенсивность света, при которой фотосинтез и дыхание уравниваются, показывает минимальный уровень света, необходимый для начала фотосинтеза; **световая точка насыщения** – это интенсивность света, при которой фотосинтез достигает максимума, показывает, насколько растение способно использовать высокие уровни света.

Источником углерода для фотосинтеза является углекислый газ. Конечно, в основном в процессе фотосинтеза используется CO_2 атмосферы, но имеются данные, что частично CO_2 может поступать в растения через корневую систему из почвы (Kuzuakov, 2006). Возможно, в случае кок-сагыза это имеет место, так как в

почве в местах природного произрастания повышена концентрация CO_2 (Uteulin, 2023). Увеличение содержания CO_2 в воздухе до 0,15% вызывает повышение скорости фотосинтеза у зерновых культур (Rakhmankulova et al., 2023). Для других растений увеличение скорости фотосинтеза наблюдается при увеличении концентрации углекислоты до 0,1%. Дальнейшее повышение содержания CO_2 до 0,15–0,2% не приводит к увеличению скорости фотосинтеза, и процесс выходит на плато, после чего происходит снижение скорости фотосинтеза (Мартиросян и др. 2023).

Повышение концентрации CO_2 оказывает ингибирующее влияние в силу разных причин. Увеличение содержания CO_2 вызывает закрытие устьиц. Высокие концентрации CO_2 сказываются особенно неблагоприятно при высокой освещенности. Это заставляет полагать, что CO_2 в определенных концентрациях ингибирует отдельные ферментативные реакции цикла Кальвина. В естественных условиях содержание CO_2 настолько мало, что может ограничивать возрастание процесса фотосинтеза, особенно резко это проявляется при достаточно высокой интенсивности света, когда лимитирующими являются темновые реакции. Надо учесть, что в дневные часы содержание CO_2 в воздухе вокруг растений понижается.

Нами было исследовано влияние CO_2 на ростовые параметры растений кок-сагыза на ранних этапах онтогенеза. Изучали активность фотосинтетического аппарата растений кок-сагыза, выращенного в фитотроне в условиях аэропоники при различном содержании CO_2 и различных световых режимах (Мартиросян и др. 2023).

В задачу работы входило определение активности фотосинтетического аппарата растений кок-сагыза, выращиваемого в условиях естественной концентрации углекислоты, при повышении концентрации CO_2 и влияние спектрального состава света на фотосинтез при повышенной концентрации углекислоты. Условия светового облучения приведены раньше: в полном спектре

облучения растений в одной из камер преобладал синий спектр в другой – красный спектр.

В основе реакции растений на повышение концентрации CO_2 в атмосфере лежат сложные физиологические механизмы, изученные еще недостаточно. Хотя эффект обогащения атмосферы углекислым газом на продуктивность C_3 -видов, как правило, положителен, его величина варьирует в широких пределах и определяется степенью детерминированности вегетативного роста, генотипа и условиями внешней среды (световым и температурными режимами, ценотическим взаимодействием растений и т. д.). Часто повышение концентрации CO_2 в атмосфере, особенно при повышенной температуре, может стать лимитирующим фактором для роста растений и влиять на продуктивность (Leisner et al., 2023).

Мы исследовали повышение уровня интенсивности света до насыщающего, $1200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, и повышение концентрации CO_2 до 0,1% в воздухе, что приводило к увеличению скорости фотосинтеза независимо от спектрального состава облучения растений.

В наших опытах (Таблица 3.18) повышение CO_2 в дневное время на протяжении всего времени выращивания растений при низкой интенсивности света ($200 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и одной и той же температуре не приводило к накоплению каучука и инулина в корнях по сравнению с контролем. Дополнительно отмечали, что растения, выращенные в обогащенной углекислым газом атмосфере, имели более крупный габитус (большая корневая масса, более крупные листья).

Полученные результаты отражают ответ растений на повышение концентрации углекислоты. Очевидно, что последующая работа должна включать исследование длительного влияния повышенной концентрации углекислоты, в течение фотопериода и в онтогенезе растений на фотосинтетический аппарат и ростовые показатели.

Таблица 3.18 – Содержание целевых веществ (НК и инулина) в корнях кок-сагыза, выращенного в фитотроне за 4 недели роста при различной интенсивности света и различной концентрации CO₂

Свет (ФАР) \ CO ₂	Содержание целевых веществ, %	400 ppm	800 ppm	1200 ppm	1600 ppm
200 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	Каучук	5,7±0,2 (I)	6,2±0,1 (H)	5,4±0,1 (IJ)	5,2±0,1 (IJ)
	Инулин	11,4±0,4 (JK)	12,1±0,2 (IJ)	11,2±0,2 (IJ)	12,5±0,2 (I)
400 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	Каучук	11,3±0,3 (F)	13,1±0,2 (C)	13,9±0,2 (B)	12±0,4 (E)
	Инулин	24,2±0,5 (EF)	25,7±0,4 (C)	28,2±0,3 (A)	24,5±0,6 (DE)
800 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	Каучук	12,5±0,3 (D)	13,8±0,3 (B)	14,1±0,2 (AB)	11,8±0,2 (E)
	Инулин	25,1±0,4 (CD)	28,3±0,5 (A)	28,4±0,4 (A)	18,2±0,3 (G)
1200 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹	Каучук	12,1±0,2 (DE)	14,5±0,1 (A)	13,8±0,3 (B)	10,8±0,4 (G)
	Инулин	23,4±0,3 (F)	24,4±0,5 (DE)	27,1±0,5 (B)	16,6±0,4 (H)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

3.5.2. Исследование активности фотосинтетического аппарата растений *T. kok-saghyz* R. в зависимости от спектрального состава и интенсивности облучения

Повышение доли синего (Рисунок 3.20 А, В) или красного (Рисунок 3.20 Б, Г) света при выращивании растений кок-сагыза в камерах аэропонного фитотрона приводило к изменению соотношения КС/СС в спектре облучения. В первой культивационной камере соотношение КС/СС составило 0,30, во второй – 3,6. При этом практически не наблюдалось различий в скорости фотосинтеза в расчете на единицу листовой поверхности – соответственно 9,4 мкмоль CO₂·м⁻²·с⁻¹ при

начальном КС (Рисунок 3.20 А, 0 КС) и $10,9 \text{ мкмоль } \text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при начальном СС (Рисунок 3.21 Б, 0 СС) (Мартиросян и др., 2023).

Смена светового режима выращивания с преимущественно красного спектра (КС) на преимущественно синий (СС) в первый час после переключения приводила к снижению скорости фотосинтеза, а во второй и последующие часы – к ее повышению по сравнению с первоначальными значениями (Рисунок 3.20 А). При противоположной перемене светового режима (с СС на КС) характер изменений был другой. Небольшое увеличение скорости фотосинтеза сменялось заметным спадом, но на третий и четвертый часы наблюдалось повышение скорости процесса, хотя и не такое значительное, как при изменении спектрального режима с КС на СС (Рисунок 3.20 Б) (Мартиросян и др., 2023).

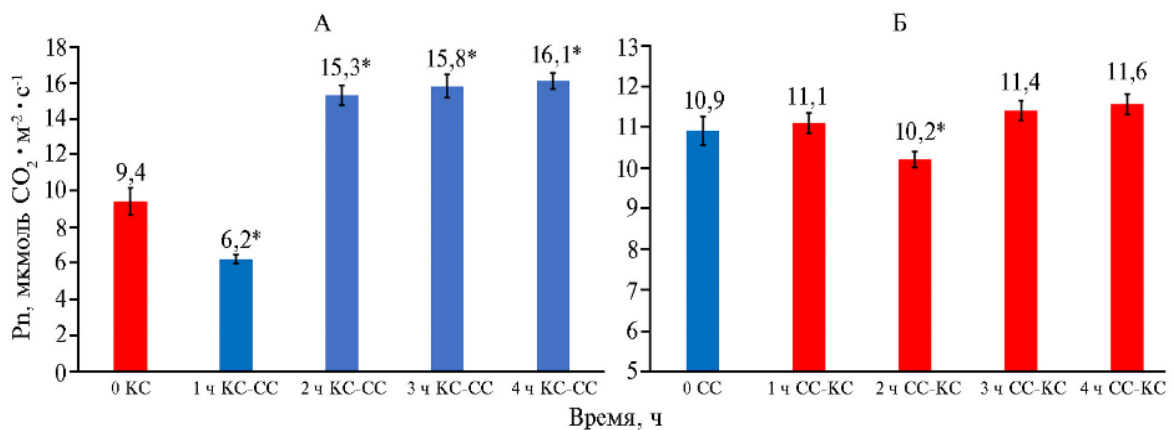


Рисунок 3.20 – Скорость фотосинтеза в листьях растений кок-сагыза при длительном выращивании методом аэропоники, в камерах аэропонного фитотрона при интенсивности света $400 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ с преобладанием красного (КС) (А) или синего (СС) (Б) света в спектре облучения, а также при изменении спектра облучения с КС на СС (А) и с СС на КС (Б) ($M \pm \text{SEM}$, $n = 5$). *Различия с вариантами КС (А) и СС (Б) статистически значимы при $P = 0,95$ в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Для более детального выяснения характера влияния смены спектрального режима на активность фотосинтетического аппарата были получены световые кривые скорости фотосинтеза растений (Мартиросян и др., 2023).

При смене режима облучения с СС на КС наблюдалось снижение скорости фотосинтеза с 26,7 до 15,2 мкмоль $\text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на плато световой кривой (при световом насыщении) (Рисунок 3.21 А). При переходе с СС на КС также происходило снижение скорости темнового дыхания с 2,80 до 2,38 мкмоль $\text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (Рисунок 3.21 Б) и квантового выхода фотосинтеза с 0,066 до 0,055 (Рисунок 3.21 Г). Изменение светового режима с КС на СС приводило к увеличению скорости процесса при насыщении световой кривой фотосинтеза, к повышению скорости темнового дыхания, квантового выхода фотосинтеза, а также светового компенсационного пункта (Мартиросян и др., 2023).

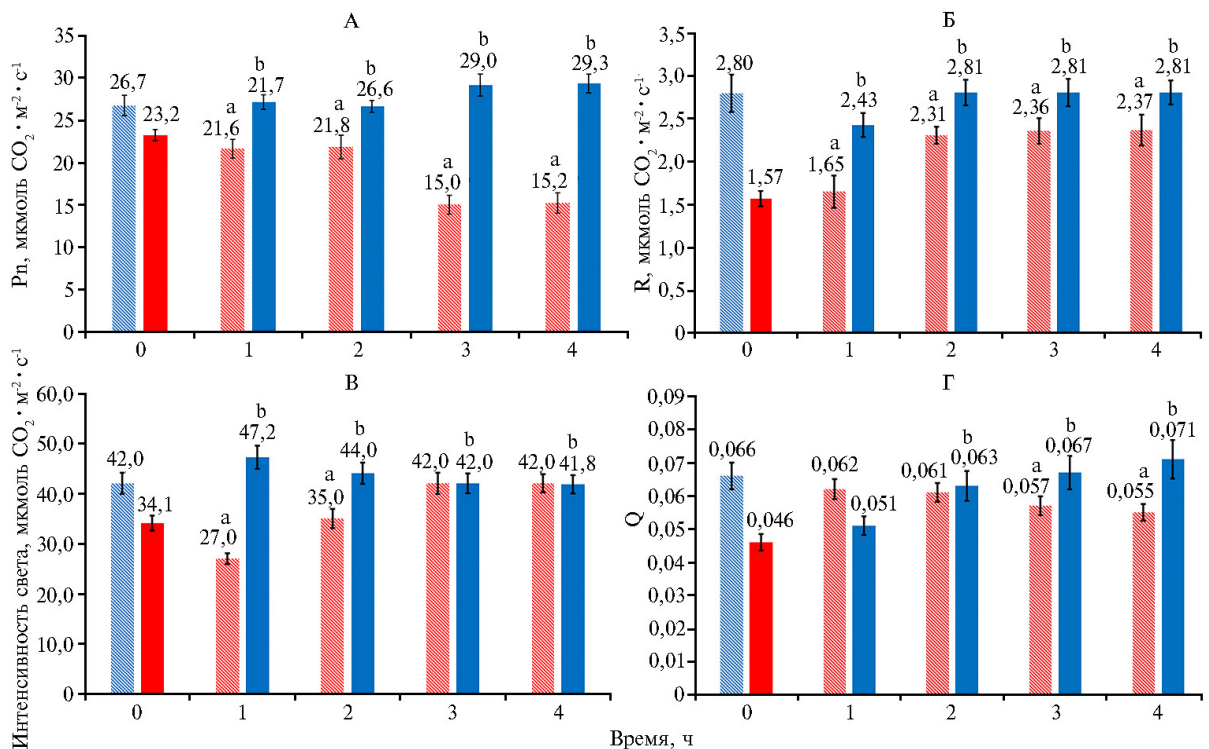


Рисунок 3.21 – Скорость фотосинтеза на плато световой кривой (А), скорость дыхания (Б), световой компенсационный пункт (В) и квантовый выход фотосинтеза (Г) в листьях растений кок-сагыза при длительном выращивании методом

аэропоники в камерах аэропного фитотрона при интенсивности света 400 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ с преобладанием синего (СС, левые столбики крайней левой пары) или красного (КС, правые столбики крайней левой пары) света, а также при изменении спектра облучения с СС на КС (левые столбики остальных пар) и с КС на СС (правые столбики остальных пар) ($M \pm \text{SEM}$, $n = 6$). а, б Различия соответственно с вариантом КС в начальной точке и с вариантом СС в начальной точке статистически значимы при $P = 95 \%$ в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Наблюдаемые изменения активности фотосинтетического аппарата могут быть связаны с активностью световой стадии фотосинтеза. Так, изменение режима с КС на СС первоначально приводило к снижению максимального квантового выхода ФС II, эффективного квантового выхода, снижению скорости электронного транспорта, но повышению нефотохимического тушения флуоресценции (Рисунок 3.21). Через 3 ч показатели были сопоставимы с таковыми у растений, облучаемых преимущественно КС, до смены светового режима (Мартиросян и др., 2023).

Изменение спектрального режима с СС на КС приводило к постепенному повышению максимального квантового выхода ФС II, повышению эффективного квантового выхода и скорости электронного транспорта в течение первых 2 ч и снижению нефотохимического тушения флуоресценции. Через 3 ч показатели были такими же или ниже (для нефотохимического тушения) по сравнению с показателями для растений, облучаемыми преимущественно СС, до смены светового режима (Мартиросян и др., 2023).

Механизмы, с помощью которых определенные участки спектра и световые режимы облучения оказывают влияние на первичный и вторичный метаболизм растений, различаются. Влияние спектра облучения при выращивании растений проявляется как в изменении работы фотосинтетического аппарата, так и направленности реакций вторичного метаболизма. Так, смена спектра облучения растений с СС на КС приводило к увеличению концентрации глюкозы и сахарозы

по сравнению с исходными значениями. Такая зависимость сохранялась в течение 2 ч, после чего концентрация сахарозы оставалась на том же уровне, а содержание глюкозы снижалось. При переключении с КС на СС наблюдали обратный эффект. Сначала концентрация глюкозы и сахарозы снижалась, а потом повышалась (Рисунок 3.22) (Мартиросян и др., 2023).

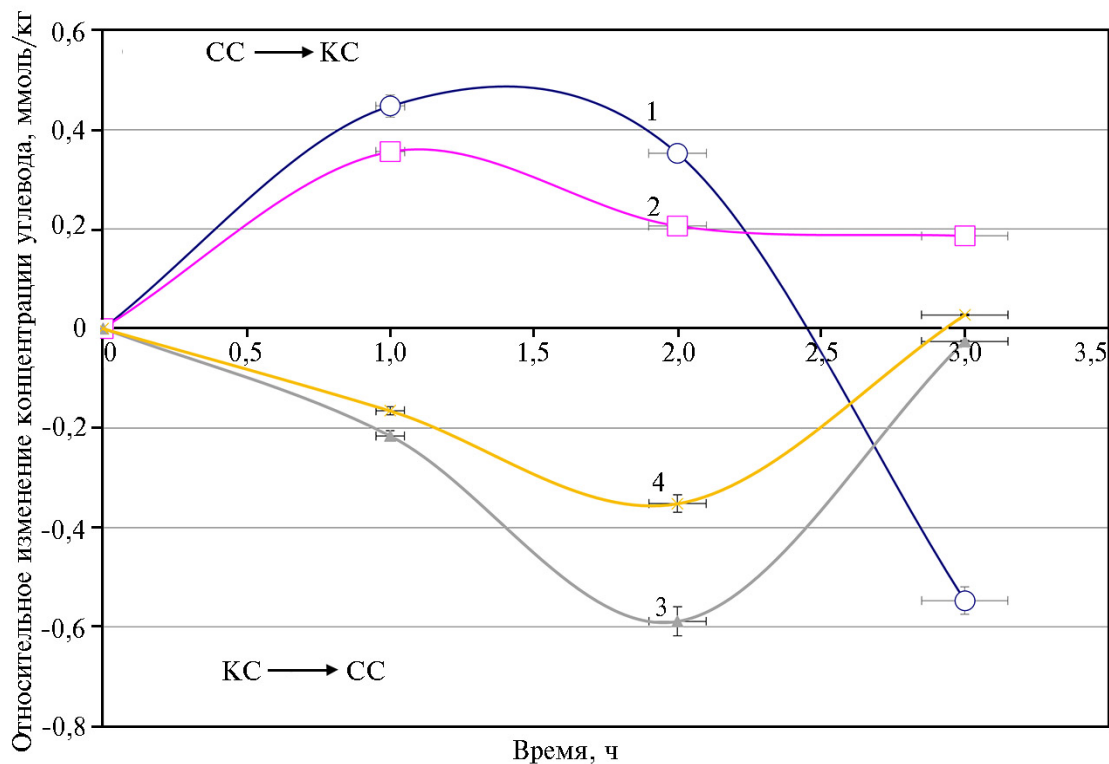


Рисунок 3.22 – Динамика изменения концентрации глюкозы (1, 3) и сахарозы (2, 4) в листьях растений кок-сагыза при длительном выращивании методом аэропоники в камерах аэропонного фитотрона. Интенсивности света $400 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ с преобладанием красного (КС) или синего (СС) света после изменении спектра облучения с СС на КС (1, 2) и с КС на СС (3, 4), ($M \pm \text{SEM}$, $n = 8$)

Растворимые углеводы – важные субстраты в метаболизме растений, участвующие в различных физиологических и биохимических процессах, регулируя транспорт и включение углерода в обмен веществ. В листьях растений около половины связанного углерода транспортируется в виде сахарозы или

глюкозы в стебель и корни, где они превращаются в полисахариды, а у кок-сагыза – в основном в инулин. Наряду с накоплением инулина происходит синтез и накопление изопентенилпирофосфата (IPP) – каучукового мономера. Растения используют два пути биосинтеза IPP: через мевалонат (MVA) и метилэритрит (MER). Мевалонатный путь происходит в цитозоле клетки, метилэритритный – в пластидах. Ферменты биосинтеза изопентенилпирофосфата в обоих путях используют промежуточные продукты, образуемые в результате метаболизма сахарозы через пируват и глицеральдегид-3-фосфат или через ацетил-КоА соответственно для путей MER и MVA (Lange et al. 2015). В цитоплазматическом пути MVA основным субстратом служит цитозольный ацетил-КоА, полученный либо из сахарозы, либо из глюкозы и фруктозы. Изменение биосинтеза этих продуктов (Lastdrager et al. 2014; Ruan et al. 2014) может быть эффективным рычагом регулирования роста и накопления биомассы растениями кок-сагыза, а в итоге – синтеза и накопления инулина и каучука (Мартиросян и др., 2023).

В корнях растений кок-сагыза, выращиваемых в камерах аэропонного фитотрона в течение 28 суток, происходило активное накопление этих соединений (Таблица 3.19). При облучении растений светом с большей долей КС наблюдалось повышение содержания каучука и инулина соответственно в 3,0 и 4,1 раза, при большей доле СС – в 5,4 и 4,6 раза по сравнению с первоначальными значениями перед посадкой в фитотрон. Действие спектрального состава облучения на 28-е сутки достоверно проявлялось в повышении содержания каучука у растений, выращиваемых при большей доле синего света (Мартиросян и др., 2023).

Функциональные возможности фитотронных технологий на основе аэропонного способа выращивания, создание и контроль всех параметров культивирования (температура, влажность, содержание CO₂, интенсивность и спектральный состав света, минеральное питание и др.) позволяют создать стратегию управления метаболизмом растений в зависимости от фазы роста и/или

целесообразности выбора приоритетного пути направленного биосинтеза вторичных метаболитов, каучука и инулина (Мартиросян и др., 2023).

Таблица 3.19 – Содержание каучука и инулина в корнях кок-сагыза, выращенного в фитотроне за 4 недели роста при разных условиях спектрального состава освещения

Интенсивность света в фитотроне	Длительность выращивания	НК, %	Инулин, %
400 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹ ФАР+КС	Начало	2,0 ± 0,1	3,8 ± 0,1
	Через 4 недели	5,9 ± 0,2 (B)	15,6 ± 1,1 (B)
400 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹ ФАР+СС	Начало	1,9 ± 0,1	4,0 ± 0,1
	Через 4 недели	12,3 ± 0,3 (A)	21,3 ± 1,2 (A)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Согласно полученным нами результатам, свет с преобладанием красной или синей составляющей в спектре облучения влияет на биосинтез растворимых сахаров, каучука и инулина в растениях кок-сагыза. Увеличение биосинтеза каучука под воздействием СС может быть связано с корректировкой метаболических путей углеводного обмена в результате специфического действия СС на фотосинтетический аппарат (Мартиросян и др., 2023).

По данным литературы, повышение синтеза растворимых углеводов или белков при облучении растений преимущественно в красной или синей области спектра (Воскресенская, 1982) обуславливает изменение скорости появления и роста новых листьев, а также соотношение биомассы надземной части растений и корневой системы (Spalholz et al., 2018). При облучении растений СС использование продуктов фотосинтеза не связано с необходимостью быстрого нарастания листовой поверхности, поэтому происходит отток сахарозы или

глюкозы в корнях, где в результате ряда биохимических реакций в цитоплазматическом пути MVA синтезируются продукты вторичного метаболизма. В нашем случае при преобладании в спектре облучения СС наблюдалось большее накопление каучука в корнях по сравнению с вариантом, где преобладал КС (Мартиросян и др., 2023).

Наряду с длительным воздействием на растения КС или СС возможно и периодическое изменение спектра облучения (Мартиросян и др., 2019), что влияет на скорость синтеза, а также на накопление и транспорт продуктов фотосинтеза. В нашем случае изменение спектрального режима облучения растений кок-сагыза в течение нескольких часов с СС на КС не вызывало снижения скорости фотосинтеза (Рисунок 3.20), однако происходило повышение скорости электронного транспорта и реального квантового выхода, а также снижение нефотохимического тушения флуоресценции. В условиях более эффективной работы ФС II наблюдалось увеличение концентрации глюкозы и сахарозы в листьях (Мартиросян и др., 2023).

При переходе с КС на СС резко снижалась скорость фотосинтеза в течение 1-го ч, после чего (через 2–3 ч) происходило повышение скорости поглощения CO_2 , снижение квантового выхода ФС II, скорости электронного транспорта. Также усиливалось нефотохимическое тушение в самом начале перехода с КС на СС, после чего этот показатель возвращался к первоначальным значениям. В этих условиях отмечали снижение концентрации глюкозы и сахарозы в листьях в течение первых 2 ч с последующим возвращением к исходным значениям через 3 ч (Рисунок 3.23) (Мартиросян и др., 2023).

Изменение активности фотосинтетического аппарата в ответ на модуляцию спектрального состава облучения развивается в течение нескольких часов, и этот прием может быть использован для регулирования скорости метаболических процессов и выхода конечных продуктов. Подобный подход также может быть применен для повышения накопления продуктов вторичного метаболизма растений кок-сагыза, прежде всего каучука. Однако требуются дальнейшие

исследования для понимания ключевых факторов, влияющих на биосинтез целевых веществ, а также изучение экспрессии генов и синтеза белков, участвующих в биосинтезе каучука.

Таким образом, изменение светового режима при длительном выращивании растений кок-сагыза в контролируемых условиях фитотрона оказывало влияние на активность световых процессов фотосинтетического аппарата — максимальный и эффективный квантовый выход, скорость электронного транспорта, а также на скорость поглощения углекислоты. Увеличение доли красного света (КС) в спектре облучения растений, выращиваемых при преобладании синего света (СС), приводило к повышению скорости электронного транспорта и эффективного квантового выхода, а также к снижению нефотохимического тушения флуоресценции через 3 ч. Полученные данные свидетельствуют о повышении эффективности использования красного света фотосинтетическим аппаратом. При переходе с КС на СС наблюдалось повышение скорости фотосинтеза, дыхания. При смене режима облучения растений с СС на КС, наоборот, скорость фотосинтеза уменьшалась с 26,7 до 15,2 мкмоль $\text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (при световом насыщении), скорость темнового дыхания — с 2,80 до 2,38 мкмоль $\text{CO}_2 \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, квантовый выход фотосинтеза — с 0,066 до 0,055. Увеличение доли СС в спектре облучения приводило к повышению (почти в 1,75 раза) накопления каучука в корнях кок-сагыза по сравнению с растениями, выращиваемыми при облучении с большей долей КС. Кроме того, наблюдалось увеличение накопления инулина в 1,17 раза. Основанная на этом технология выращивания кок-сагыза, обеспечивающая биосинтез каучука и инулина в контролируемых условиях фитотрона с оптимизацией всех факторов роста, представляется весьма перспективной (Мартиросян и др., 2023).

3.6. Агробактериальная трансформация *T. kok-saghyz* R. с целью получения культуры «*hairy roots*»

3.6.1. Получение культуры изолированных корней «hairy roots» *T. kok-saghyz* R.

После трансформации листовых пластинок кок-сагыза методом кокультивации в агробактериальной суспензии, индукция ризогенеза была зафиксирована на 11-е сутки. Наиболее активное образование корней отмечалось из поранений в районе центральной жилки (Рисунок 3.23).

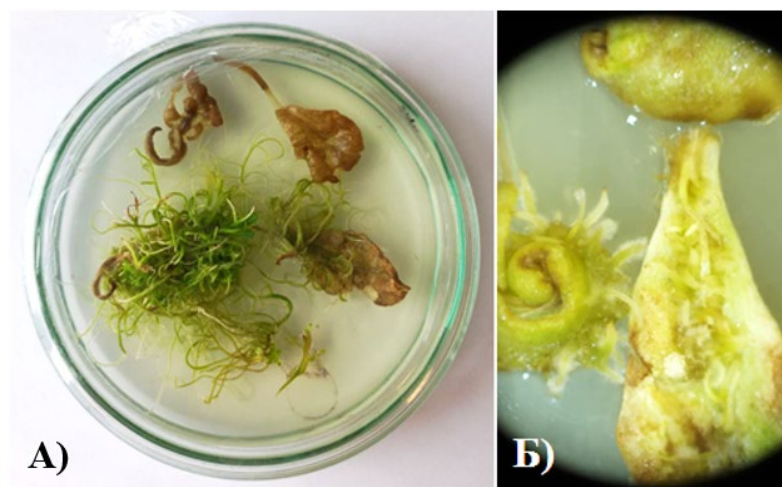


Рисунок 3.23 – Индукция ризогенеза на трансформированных листовых эксплантах кок-сагыза: А) общий вид; Б) образование корней из центральной жилки листового экспланта

Через 20 суток корни переносили в жидкую среду, по 0,5 г на 25 мл культуральной среды для дальнейшей культивации и исследования роста.

Для выделения ДНК и анализа на наличие *rol*-генов и *vir*-генов брались полученные образцы корней. В качестве отрицательного контроля использовали корни интактных растений. В результате ПЦР были отобраны образцы культуры корней с подтвержденным наличием трансгенов (Рисунок 3.24, 3.25).

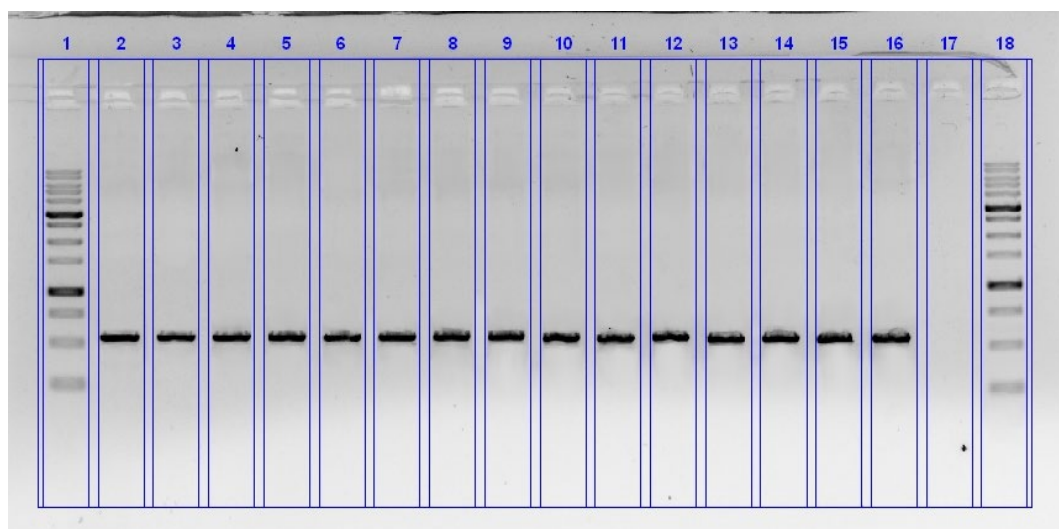


Рисунок 3.24 – Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие гена *rolA*: 1, 18 – маркер длин ДНК 1 kb (DNA Ladder 1 kb, «Евроген», Россия), 2–15 – ДНК, выделенная из корней, полученных в результате трансформации, 16 – ДНК *R. rhizogenes*, выделенная из интактных растений, 17 – dH₂O (отрицательный контроль)

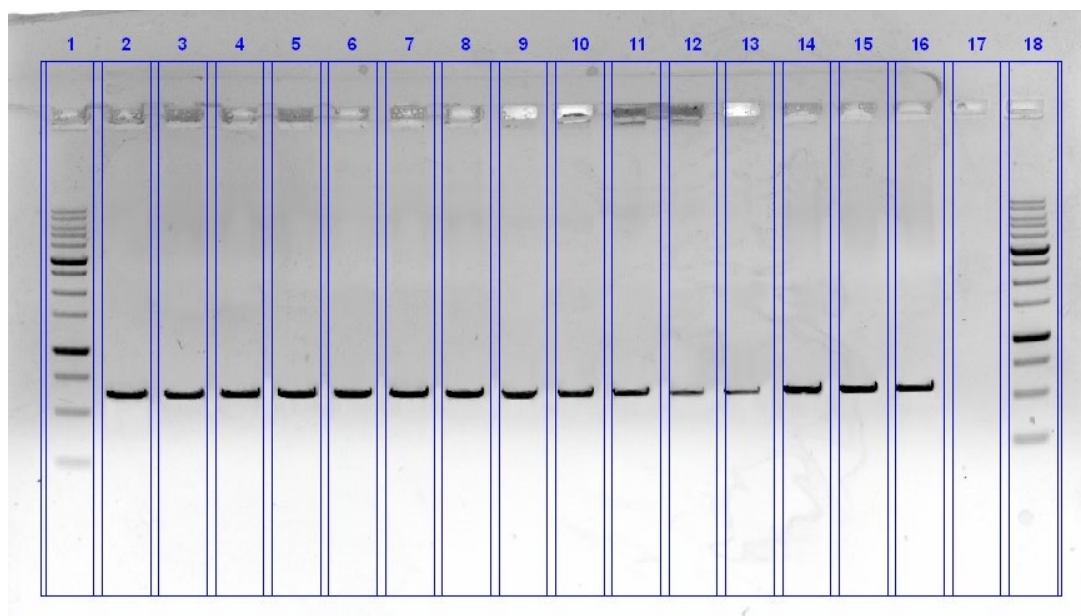


Рисунок 3.25 – Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие гена *rolC*: 1, 18 – маркер длин ДНК 1 kb (DNA Ladder 1 kb, «Евроген», Россия), 2–15 – ДНК,

выделенная из корней, полученных в результате трансформации, 16 – ДНК *R. rhizogenes*, выделенная из интактных растений, 17 – dH₂O (отрицательный контроль)

Для того, чтобы убедиться в отсутствии ложноположительных результатов, был проведен анализ на наличие генов вирулентности бактерий, наличие которых может говорить о том, что детектированные ранее *rol*-гены принадлежат не трансформированным растениям, а остаточным агробактериям (Рисунок 3.26, 3.27).

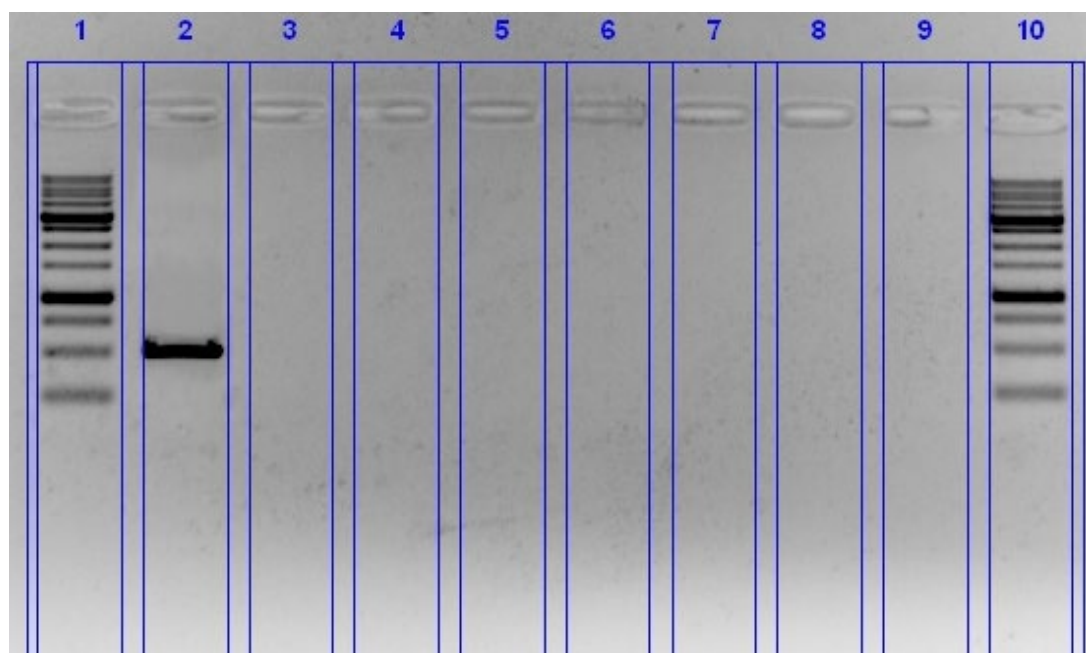


Рисунок 3.26 – Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие гена *virA*: 1–10 – маркер длин ДНК 1 kb (DNA Ladder 1 kb, «Евроген», Россия), 2 – ДНК *R. rhizogenes* (положительный контроль), 3 – dH₂O (отрицательный контроль), 4–9 – ДНК, выделенная из корней, полученных в результате трансформации

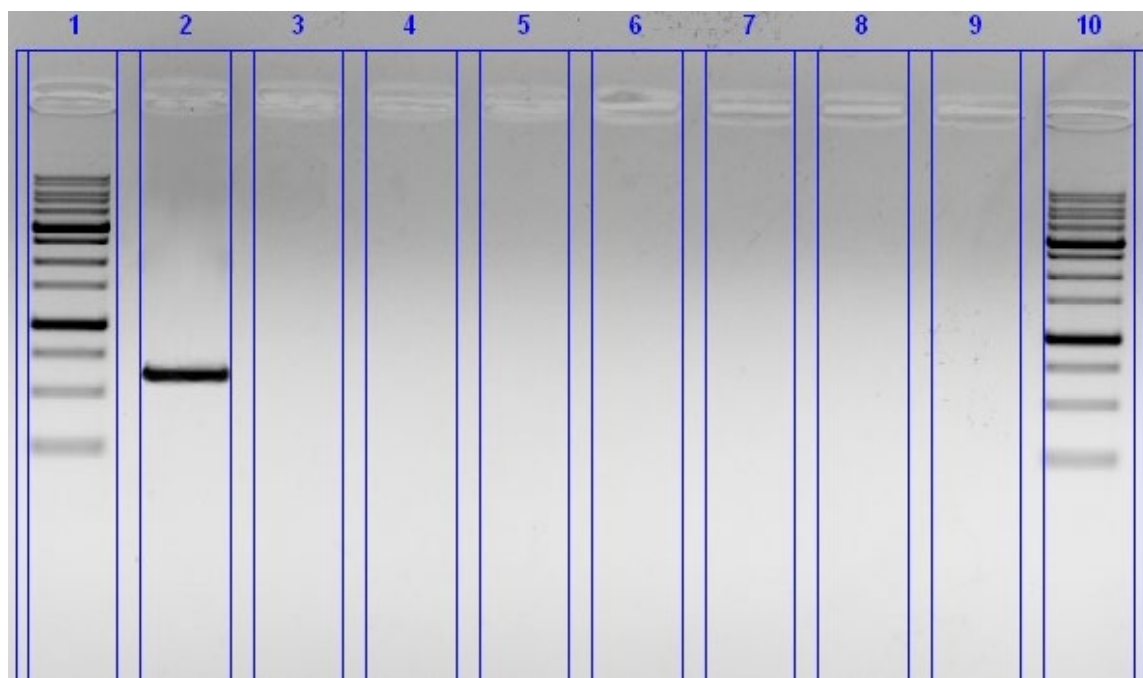


Рисунок 3.27 – Электрофореграмма результатов ПЦР на наличие гена *virB*: 1–10 – маркер длин ДНК 1 kb (DNA Ladder 1 kb, «Евроген», Россия), 2 – ДНК *R. rhizogenes* (положительный контроль), 3 – dH₂O (отрицательный контроль), 4–9 – ДНК, выделенная из корней, полученных в результате трансформации.

Эффективность трансформации рассчитывали, как процентное соотношение линий с подтвержденным наличием *rol*-генов и отсутствием бактериальной контаминации ко всем линиям, использовавшимся в анализе. Эффективность трансформации составила 14 %. Из 100 листовых эксплантов, подвергшихся агробактериальной трансформации, на селективной среде, содержащей антибиотики, отобрали 32 экспланта. В дальнейшем, при проведении ПЦР-анализа наличие генов *rolA* и *rolC* обнаружили только в 14 эксплантах, в то же время *vir*-гены в этих образцах отсутствовали. Это свидетельствует о том, что на селективной среде удалось получить трансформированные экспланты без бактериальной контаминации.

3.6.2. Ростовые характеристики культуры корней «hairy roots» *T. koksaghyz* R. и содержание в них каучука и инулина

Индекс роста культуры трансформированных корней кок-сагыза представлен на рисунке 3.28.

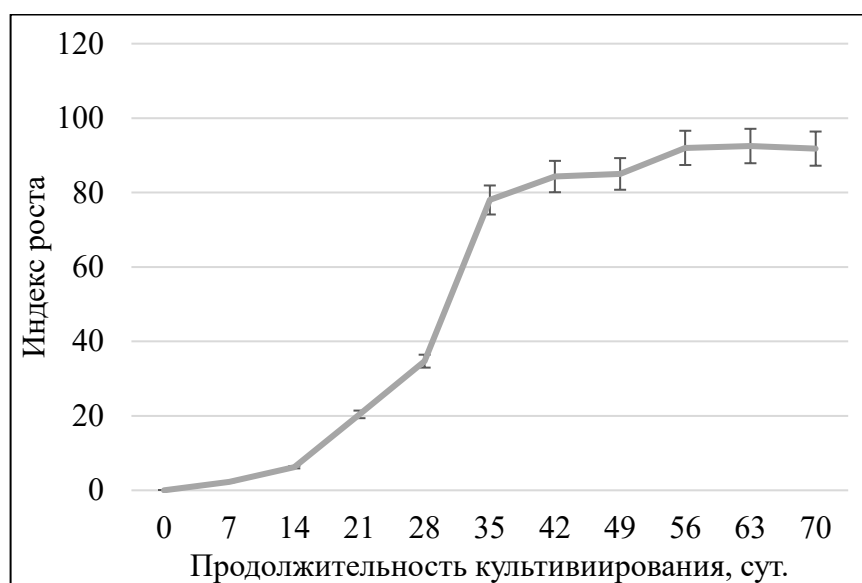


Рисунок 3.28 – Индекс роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 70 суток

Лag-фаза составляла первые две недели культивирования. Затем наступала семидневная фаза ускоренного роста, (индекс роста от 4 до 11), затем фаза экспоненциального роста, (21–35 суток) с резким увеличением индекса роста, с 20 до 89. Далее рост культуры выходил на плато, соответствующее стационарной фазе роста. На этой стадии индекс роста был максимальным и составил 89–94.

Динамика накопления каучука и инулина в процессе культивирования трансформированных корней кок-сагыза представлена на рисунке 3.29.

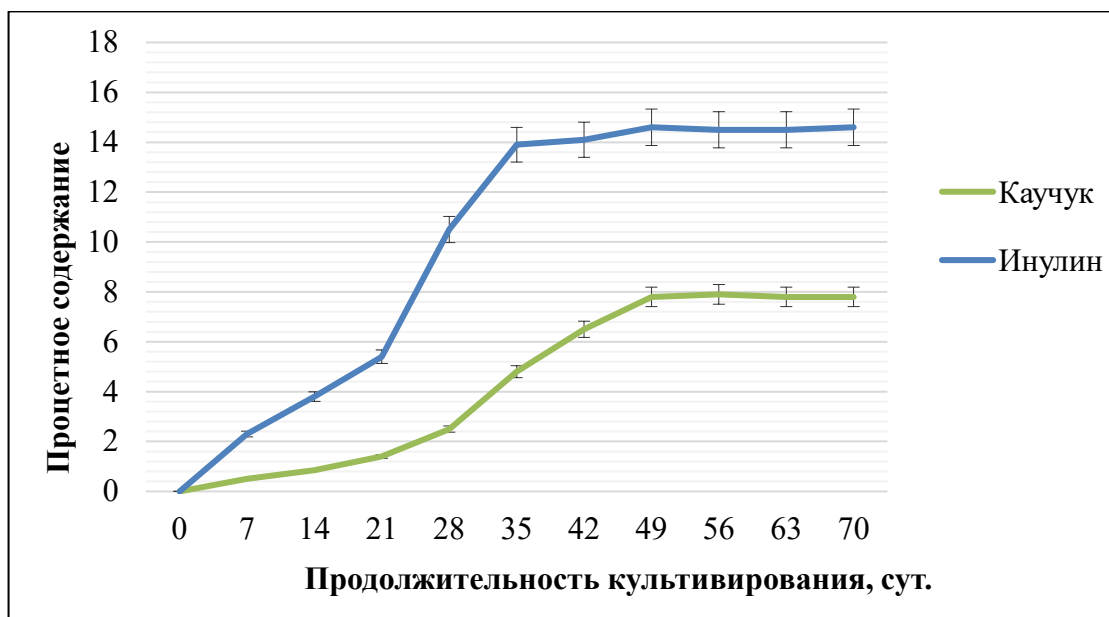


Рисунок 3.29 – Динамика изменения удельного содержания каучука и инулина в процессе роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 70 суток

Накопление каучука и инулина наблюдали во всех трех фазах роста, причем трансформированные корни кок-сагыза за 35–49 суток наращивали биомассу в 89 раз большую, по сравнению с исходным корневым эксплантом, и накапливали каучук и инулин до 7,8 % и 14,6 %, по сухому веществу, соответственно. В период от 56 до 70 суток роста изменений содержания каучука и инулина не происходило, что, возможно, связано со старением культуры корней, накоплением внутриклеточных вторичных метаболитов, влияющих на ростовые процессы.

Похожие результаты были получены учёными из Уфы, применявшими метод агробактериальной трансформации *in planta* – у растений удаляли несколько нижних листьев и корней и прокалывали гипокотиль, затем на места поранений наносили суспензию агробактерии *R. rhizogenes* штамма А4. Было показано, что полученные «*hairy roots*» корни накапливают в среднем 7,5 % гексанового экстракта (каучукоподобных веществ) на сухую массу, что примерно в 1,5 раза больше, чем корни кок-сагыза, выращенные исследователями в полевых условиях

(Кулуев и др., 2020). Полученные ранее данные, а также результаты нашего исследования в очередной раз доказывают перспективность использования растений кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*» для промышленного получения натурального каучука.

3.6.3. Получение композитных растений *T. kok-saghyz* R. с фенотипом «*hairy roots*»

В отличие от культуры изолированных корней, выращивание полностью сформированных растений (с листовой розеткой) может быть менее затратным с точки зрения использования материалов, а также времени, уходящего на их подготовку. При масштабировании технология выращивания корневой культуры предполагает использование биореакторов, что также увеличивает стоимость производства (Ganeshan et al., 2021).

Для получения композитных растений кок-сагыза корни с подтвержденным наличием *rol*-генов и отсутствием агробактериальной контаминации переносили из жидкой питательной среды на твердую среду MS без внесения регуляторов роста и дополнительно наносили поранения. Через 4 суток культивирования на местах поранений был отмечен каллусогенез. На 12-е сутки была отмечена вторичная дифференцировка с образованием листьев и новых корней (Рисунок 3.30).

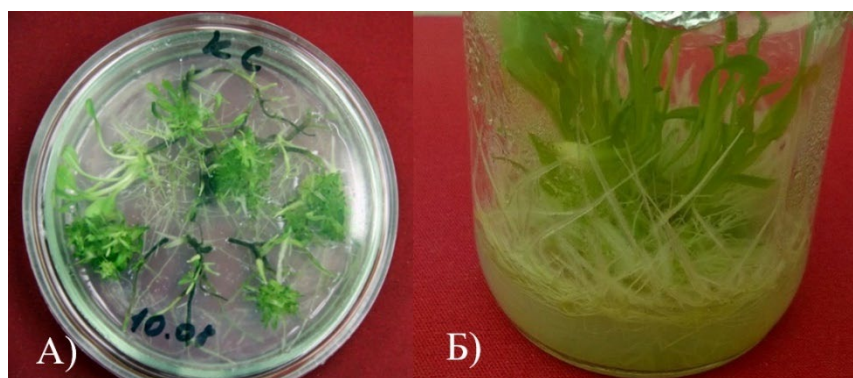


Рисунок 3.30 – Растения-регенеранты кок-сагыза, образовавшиеся из трансформированных корней «*hairy roots*»: А) инициация каллусогенеза и

побегообразования из корней; Б) 2-месячное растение

Таким образом, нами были получены растения, листовая розетка которых не проходила процесс агробактериальной трансформации, т. е. композитные растения (Дмитрюкова и др., 2011). Нами были измерены морфометрические показатели и накопление целевых веществ у интактных и композитных растений кок-сагыза возрастом 60 суток: высота растений (вР), длина корня (дК), длина самого крупного листа (дЛ), масса растения (мР), масса корня (мК) и масса листьев (мЛ), содержание каучука и инулина (Таблица 3.20). Растения выращивались в одинаковых условиях аэропонного фитотрона (Рисунок 3.31) с использованием питательного раствора, описанного в разделе 3.4.

Таблица 3.20 – Сравнение морфометрических показателей и содержания целевых веществ у интактных и композитных растений кок-сагыза

Вариант	вР, см	дК, см	дЛ, см	мР, г	мК, г	мЛ, г	НК		Инулин	
							%	мг/раст	%	мг/раст
Интактные растения	32,3±1,5 (А)	20,6±0,9 (В)	7,9±0,6 (А)	39,5±0,1 (В)	32,4±0,1 (В)	7,2±0,2 (А)	8,4±0,6	326,5±2,5 (В)	14,9±0,3	579,3±2,7
Композитные растения « <i>hairy roots</i> »	33,9±0,6 (А)	25,9±0,4 (А)	7,8±0,5 (А)	83,8±1,5 (А)	77,9±1,2 (А)	6,9±1,3 (А)	8,8±1,2	822,6±3,2 (А)	16,5±0,9	1542,4±2,2

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Содержание сухого вещества в растениях, выращенных в аэропонном фитотроне – 12±1 %.



Рисунок 3.31 – Композитные растения кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*» выращенные в аэропонном фитотроне

Композитные растения превосходят интактные по массе корневой системы и, как следствие, по производительности каучука и инулина. Можно сделать заключение, что композитные растения будут эффективны при культивировании в аэропонных фитотронах.

Выращивание растений с фенотипом «*hairy roots*» предполагает получение большей корневой массы. Однако некоторые авторы выражают мнение, что при выращивании плантационным способом композитных растений с фенотипом «*hairy roots*» урожайность будет ухудшаться из-за трудности сбора и потери части корней (Zhang et al., 2015). Отчасти такие опасения могут быть и справедливыми, но многое будет зависеть и от влияния других факторов, в частности, от массы и объема корней, от агротехнологии посадки рассады и от технологии сбора товарной продукции, от отмыва почвы, сушки, хранения и переработки корней. Предложенный нами способ культивирования композитных растений с фенотипом «*hairy roots*» в аэропонных системах, в контролируемых условиях фитотрона не только лишен вышеуказанных недостатков, но имеет существенные преимущества.

3.7. Оценка уровня ploидности и морфологических параметров растений *T. kok-saghyz* R., полученных в процессе полиплоидизации

3.7.1. Оценка жизнеспособности и эффективности полиплоидизации *T. kok-saghyz* R. в зависимости от концентрации и экспозиции колхицинирования

Колхицин является высокотоксичным веществом, и его высокие концентрации вызывают гибель клеток растений (Kurek, 2018). Он также воздействует на прорастание семян и выживание проростков, в частности из-за того, что может накапливаться и сохраняться в семенной оболочке, влияя на темпы роста растения в фазе всходов (Luo et al., 2018). При этом, в зависимости от вида растения, а также концентрации антимитотика и времени его воздействия на растительный организм, данное влияние может быть как негативным и приводящим к угнетению и гибели зародышей и проростков, так и стимулирующим, способствующим прорастанию семян (Келько и др., 2021).

Наше исследование показывает, что выживаемость семян кок-сагыза, обработанных более высокими концентрациями колхицина (0,05%, 0,1%) с более длительной экспозицией (48 ч, 72 ч), была значительно ниже, по сравнению с другими вариантами (Таблица 3.21). Самая высокая летальность наблюдалась при использовании 0,1% раствора колхицина в течение 72 ч. Наибольшая эффективность полиплоидизации, рассчитанная как процентное отношение количества выживших в процессе колхицинирования семян кок-сагыза к количеству полученных из них растений с подтвержденным фактом увеличения ploидности, была получена при использовании 0,1% колхицина с экспозицией в 24 ч. Однако показатель эффективности полиплоидизации, рассчитанный как процентное соотношение количества обработанных семян к количеству полученных из них растений-полиплоидов кок-сагыза, был наибольшим в варианте с использованием 0,1% раствора колхицина в течение 12 ч (Таблица 3.21). Данный

вариант обеспечивает получение большего количества полиплоидных растений, т. к. обеспечивает большую выживаемость семян.

Таблица 3.21 – Показатели выживаемости и эффективности полиплоидизации кок-сагыза в зависимости от концентрации колхицина и экспозиции обработки

Концентрация колхицина, %	Время обработки, ч	Тип растительного материала (эксплантов)	Кол-во эксплантов (а)	Кол-во выживших эксплантов (б)	% выживаемости эксплантов (в)	Кол-во эксплантов с измененной плоидностью (г)	Эффективность полиплоидизации отн. выживших эксплантов, % (д)	Эффективность полиплоидизации отн. общего кол-ва эксплантов, % (е)
0,01	12	семянки	100	98	98	2	2,0	2
	24		100	77	77	6	7,8	6
	48		100	65	65	12	18,5	12
	72		100	50	50	37	74,0	37
0,05	12		100	95	95	8	8,4	8
	24		100	45	45	22	48,9	22
	48		100	54	54	45	83,3	45
	72		100	35	35	15	42,9	15
0,1	12		100	92	92	75	81,5	75
	24		100	34	34	30	88,2	30
	48		100	22	22	10	45,5	10
	72		100	12	12	2	16,7	2
0,01	12	каллус	25	24	96	21	87,5	84
	24		25	16	64	15	93,8	60
	48		25	17	68	10	58,8	40
	72		25	15	60	6	40,0	24
0,05	12		25	23	92	20	87,0	80
	24		25	12	48	10	83,3	40
	48		25	13	52	8	61,5	32
	72		25	8	32	5	62,5	20
0,1	12		25	11	44	10	90,9	40
	24		25	5	20	3	60,0	12
	48		25	2	8	0	0,0	0
	72		25	2	8	0	0,0	0

Примечание к Таблице 3.21: % выживаемости эксплантов ($v = \frac{б}{a} \cdot 100\%$) = количество выживших эксплантов (б)/ количество эксплантов (а) (через неделю после обработки); эффективность полиплоидизации относительно выживших эксплантов ($д = \frac{г}{б} \cdot 100\%$) = количество полиплоидизированных эксплантов (г)/ количество выживших эксплантов (б) (через месяц после обработки); эффективность полиплоидизации относительно общего количества эксплантов ($е = \frac{г}{a} \cdot 100\%$) = количество полиплоидизированных эксплантов (г)/ общее количество эксплантов (а) (через месяц после обработки).

Каллус кок-сагыза как материал для колхицинирования являлся менее жизнеспособным, по сравнению с его сеянками, что может объясняться отсутствием семенной оболочки, защищающей живые клетки от токсического воздействия антимиотика. Наибольшую выживаемость наблюдали при использовании 0,01% и 0,05% колхицина в течение 12 ч. Увеличение экспозиции обработки приводила к значительному показателю гибели эксплантов. При использовании каллусных масс кок-сагыза для полиплоидизации наибольшая эффективность полиплоидизации относительно общего количества эксплантов была получена при использовании наименьшей исследуемой концентрации колхицина (0,01%) с наименьшей исследуемой экспозицией (12 ч) (Таблица 3.21).

Результаты нашего исследования подтверждаются работами иностранных авторов. В работах Luo Z. и соавторов, посвященных полиплоидизации кок-сагыза, фаза прорастание-всходы у сеянков, обработанных колхицином, особенно в более высоких концентрациях, наступала значительно позже, чем у контрольного варианта. Также с увеличением концентрации колхицина и времени его воздействия на сеянки уменьшалась их выживаемость (Luo et al., 2017; Luo et al., 2018). Таким образом, стимулирующего действия колхицина на прорастание и всхожесть кок-сагыза обнаружено не было.

3.7.2. Оценка плоидности растений *T. kok-saghyz* R. методом проточной цитометрии

Поскольку полиплоидизацию и дальнейшее выращивание растений после нее проводили в условиях *in vitro*, достоверный отбор по морфологическим признакам полиплоидных растений провести было сложно. Требовалось проанализировать большое количество образцов, поэтому для первичного скрининга нами был выбран метод проточной цитометрии. Цитометрия позволяет анализировать большое количество образцов за относительно небольшое, по сравнению с классическим кариологическим анализом митотических хромосом, время, и фиксирует изменения кариотипа даже в плечах хромосом (Galbraith et al., 2021; Fomicheva, Domblides, 2023).

Цитометрический анализ клеточных ядер колхицинированных растений выявил несколько различных по плоидности форм кок-сагыза: диплоидные, триплоидные, тетраплоидные, гексаплоидные и миксоплоидные (Рисунок 3.32).

Количество индуцированных тетраплоидов различалось по вариантам обработки колхицином. Самая высокая эффективность индукции была при концентрации 0,2 % колхицина, экспозиции в течение 48 часов, а затем при 0,1 % колхицина в течение 48 часов. При концентрации 0,5 % колхицина тетраплоиды не обнаруживались, при любой продолжительности воздействия колхицином. Среди проростков, полученных из семян, при всех режимах обработки, были идентифицированы 28 образцов тетраплоидов ($4n$), 4 образца триплоидов ($3n$), 6 образцов миксоплоидов $3n-4n$. Также были получены 3 образца миксоплоидов $5n-6n$ и 1 образец гексаплоид ($6n$). Изначально количество полиплоидов было значительно выше, 86 экземпляров, но в процессе культивирования часть образцов погибла. Выжившие образцы ввели в культуру *in vitro*, провели их оздоровление и размножили, создали рабочую коллекцию.

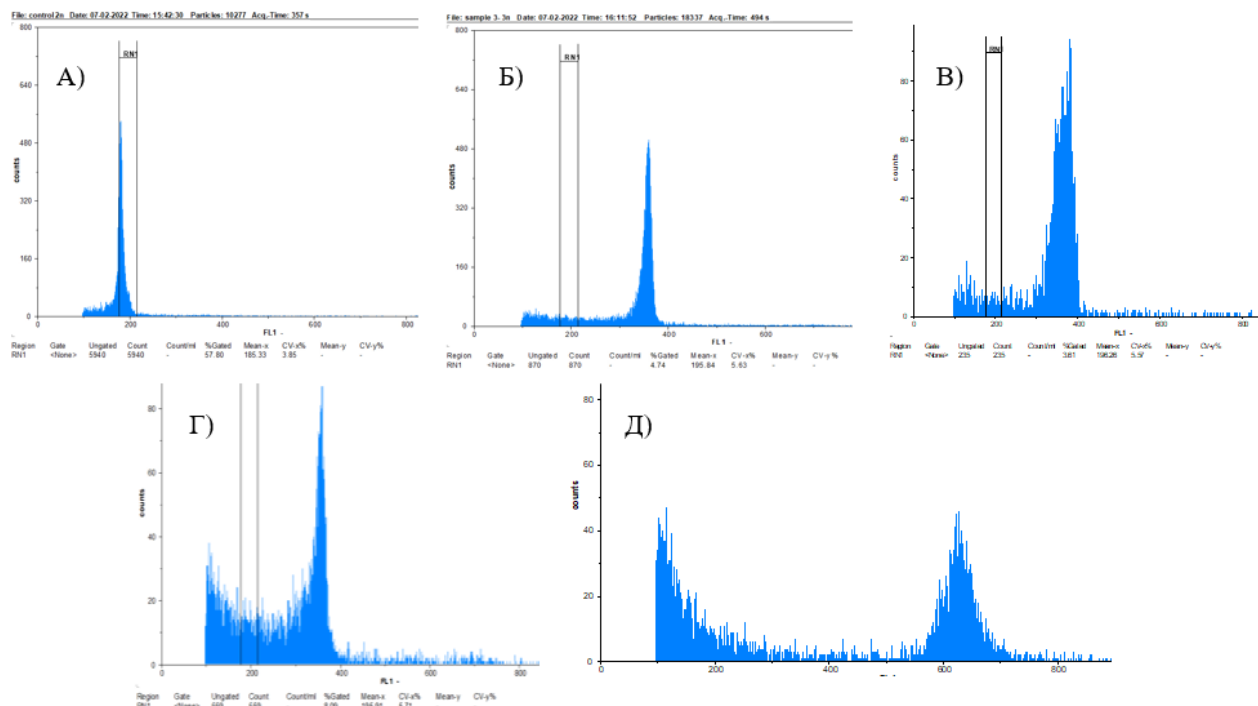


Рисунок 3.32 – Результаты анализа растений-регенерантов кок-сагыза с использованием проточной цитометрии: А) диплоидная форма (2n); Б) триплоидная форма (3n); В) тетраплоидная форма (4n); Г) миксоплоидная форма; Д) гексаплоидная форма (6n)

3.7.3. Кариологический анализ растений *T. kok-saghyz* R., полученных в процессе полиплоидизации

Несмотря на многочисленные преимущества метода проточной цитометрии в установлении ploidy, растения, как его объекты, имеют ряд особенностей, из-за которых остается актуальным цитологический анализ кариотипа растительных клеток. Эти особенности заключаются в наличии клеточных стенок и неправильной формы клеток, из-за чего лазерный луч цитометра может по-разному отражаться от них, и большого количества вторичных метаболитов, которые могут влиять на окрашивание клеток флуоресцентным красителем или вызывать автофлуоресценцию (Fomicheva, Domblides, 2023). Все это может являться причиной больших погрешностей при использовании данной методики,

поэтому для увеличения точности результатов мы дополнительно проводили кариологический анализ, с использованием митотических метафазных пластинок с кончиков корней растений-регенерантов кок-сагыза, полученных в процессе колхицинирования.

Во многих работах на различных культурах показано, что при культивировании клеток и тканей растений *in vitro* в меристематически активных клетках наблюдается некратное изменение числа хромосом в сторону их уменьшения или увеличения (получение анеуплоидов). Это может быть обусловлено различными причинами, в том числе возможной цитотоксичностью фитогормонов и регуляторов роста (D'Amato , Bayliss, 1985; Phillips et al., 1994; Regalado et al., 2015; Маскаева и др., 2017). В наших исследованиях также наблюдалась соматоклональная вариабельность в клетках каллусных тканей кок-сагыза (Рисунок 3.33), в чем могут быть свои преимущества. Соматоклональные мутанты зачастую отличаются новыми свойствами, например, повышенным уровнем целевых вторичных метаболитов (Ngezahayo, 2018; Ferreira et al., 2023). Эти экземпляры могут быть отобраны в ходе культивирования *in vitro* и стать предшественниками новых форм растений.

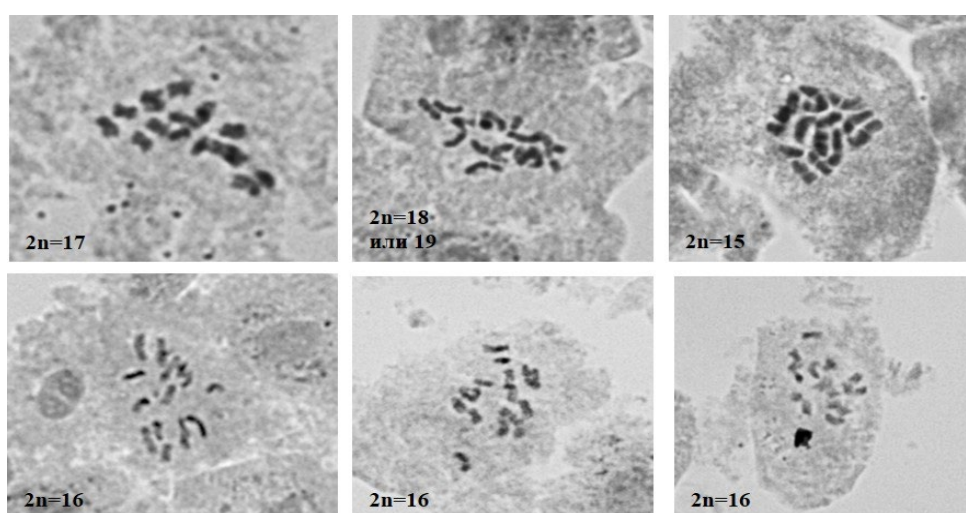


Рисунок 3.33 – Соматоклональная изменчивость растений кок-сагыза при культивировании в условиях *in vitro*, выраженная анеуплоидией

На рисунке 3.34 представлены микрофотографии клеток кок-сагыза с разным уровнем плоидности: 16 хромосом, 24 хромосомы, 32 и 48 хромосом, соответствующие диплоидному ($2n$), триплоидному ($3n$), тетраплоидному ($4n$) гексаплоидному ($6n$) уровням плоидности, соответственно.

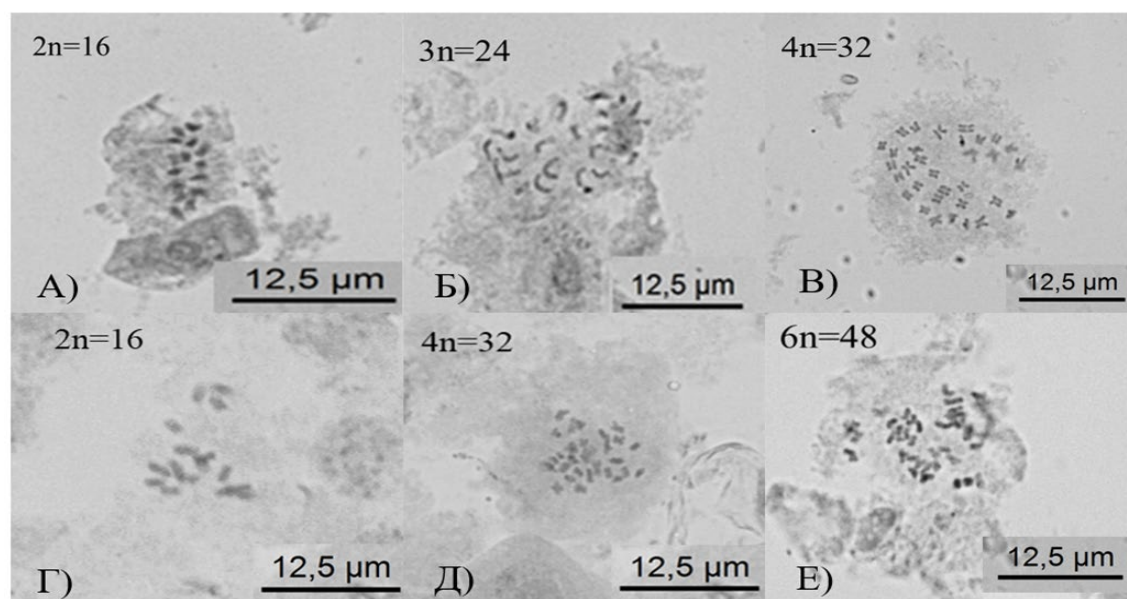


Рисунок 3.34 – Метафазы в меристемах растений-регенерантов кок-сагыза, уровни плоидности: А) диплоид ($2n$); Б) триплоид ($3n$); В) тетраплоид ($4n$); Г-Д) миксоплоиды; Е) гексаплоид ($6n$)

Также были зафиксированы и подтверждены случаи миксоплоидии – на рисунке 3.34 Г представлены метафазные пластинки клеток, имеющих разное количество хромосом, при этом полученных из одного образца. Так нами было установлено, что среди полученных в ходе колхицинирования образцов есть растения, клетки которых имеют разный уровень плоидности, $3n-4n$ и $5n-6n$. Плоидность проверенных образцов растений полностью совпала с уровнем плоидности, определенным с использованием метода проточной цитометрии, однако полученные микрофотографии представляют дополнительную

информацию, в частности, для установления хромосомного статуса миксоплоидных форм кок-сагыза.

Как и в случаях с анеуплоидией, особенно много миксоплоидных форм кок-сагыза было получено при колхиционировании каллусных масс. Отмечается, что обработка антимитотиками преимущественно вызывает образование именно миксоплоидных растений (Kunakh, 1980; Fomicheva et al., 2024). Однако в процессе их онтогенеза химерный статус может изменяться или пропадать, например, при активном делении клеток конкретной ploидности, вытесняющих остальные клетки (Kunakh, 1980; Волынкин и др., 2009). Полученные миксоплоидные формы были проверены несколько раз: первично, спустя 3 месяца и спустя 6 месяцев вегетации, при этом отмеченная миксоплоидия сохранялась, растения росли и развивались. Параллельно проводили оздоровление и микроклональное размножение полученных полиплоидов, с целью создания рабочей коллекции.

3.7.4. Показатели абаксимального эпидермиса у растений *T. kok-saghyz* R., полученных в процессе полиплоидизации

Установлено, что чем меньше количество устьиц в поле зрения микроскопа, тем больше их длина и ширина, тем выше уровень ploидности (Домблides и др., 2021). Таким образом, размер и количество устьиц коррелирует с уровнем ploидности растений, и их учет используется в качестве косвенного метода для предварительного скрининга регенерантов после полиплоидизации (Клименко и др., 2021). Поэтому дополнительно нами была проведена оценка растений-полиплоидов по основным показателям абаксимального эпидермиса: плотности устьиц, их длине, ширине и площади, а также и количеству хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (Таблица 3.22). Для подсчета количества хлоропластов использовали флуоресцентный микроскоп с набором фильтров, позволяющих детектировать автофлуоресценцию хлоропластов (Рисунок 3.35).

Таблица. 3.22 – Морфологические параметры устьиц растений-полиплоидов кок-сагыза

Плоидность Параметр	2n (контроль)	3n	4n	6n
Плотность устьиц ($n \cdot \text{мм}^{-2}$)	56,85±2,23 (A)	54,15±2,23 (A)	43,55±3,20 (B)	35,7±2,25 (C)
Длина устьиц ($\text{мм} \cdot 10^{-2}$)	3,15±0,38 (B)	3,15±0,38 (B)	3,95±0,21 (B)	4,25±0,31 (A)
Ширина устьиц ($\text{мм} \cdot 10^{-2}$)	1,22±0,12 (C)	1,24±0,15 (C)	1,55±0,25 (B)	1,86±0,14 (A)
Площадь устьиц ($\text{мм}^2 \cdot 10^{-2}$)	12,06±0,01 (C)	12,26±0,01 (C)	19,22±0,01 (B)	24,8±0,01 (A)
Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц	14±2 (C)	14±2 (C)	22±2 (B)	38±3 (A)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Дункана (MRT).

Длина, ширина и площадь устьиц были значительно больше у тетраплоидных растений и гексаплоидного образца, чем у диплоидных (Таблица 3.22; Рисунок 3.35 З-И). Однако у тетраплоидных растений наблюдалось меньше устьиц на единицу площади листа, чем у диплоидных (Таблица 3.22; Рисунок 3.35 Г-Е). Средняя плотность устьиц у контрольных диплоидов составила 56,9/мм², у обработанных триплоидов была 54,15/мм², у тетраплоидов 43,55/мм², а у гексаплоида 35,7/мм² (Таблица 3.22). При этом миксоплоидные формы достоверно не отличались от диплоидных по всем вышеописанным параметрам.

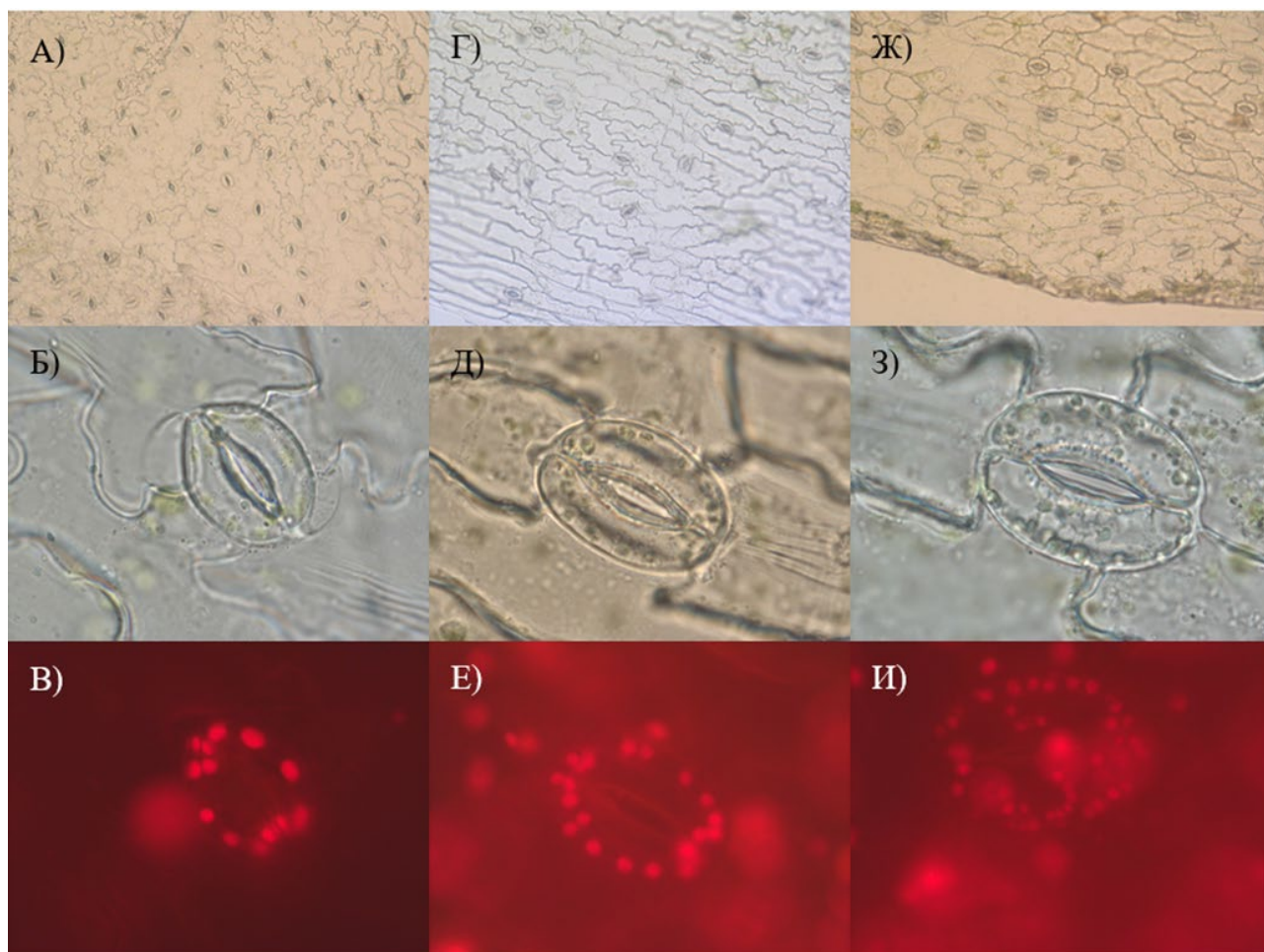


Рисунок 3.35 – Эпидермис абаксиальной поверхности листьев кок-сагыза разной плоидности: А), В) диплоиды ($2n$); Г), Е) тетраплоиды ($4n$); З), И) гексаплоид ($6n$) А), Г), З) устьичные клетки у растений разного уровня плоидности при использовании объектива $20\times$; Б), Д), З) устьичные клетки растений разного уровня плоидности при использовании объектива $100\times$; В), Е), И) автофлуоресценция хлоропластов при использовании набора флуоресцентных фильтров при использовании объектива $100\times$

3.7.5. Морфологические характеристики листьев и корней растений *T. kok-saghyz* R., полученных в процессе полиплоидизации

Одними из следствий полиплоидии является увеличение габитуса растений и изменения его морфологии (Liu et al., 2007; Ye et al., 2010). Мы оценивали

количество листьев и их параметры, а также биомассу корней и диаметр основания корня (место соединения корневой шейки с каудексом) у ди-, три-, тетра- и гексаплоидных растений кок-сагыза спустя 3 месяца выращивания в вегетационных сосудах *ex vitro*. Все полученные в результате колхицинирования образцы полиплоидов, визуальнo, по морфологии надземной части и корней, отличались от контрольных, диплоидных, образцов, хотя необходимо уточнить, что между диплоидными и триплоидными формами разница была небольшая.

Молодые тетраплоиды (возрастом 2 месяца) росли медленнее, чем контрольные (интактные) диплоидные растения того же возраста. Через шесть месяцев после обработки колхицином у тетраплоидных растений было меньше листьев, чем у диплоидных, однако их листья были шире и, таким образом, имели уменьшенный листовой индекс (длина/ширина) (Рисунок 3.36 А, В, Д, Ж; Таблица 3.26).

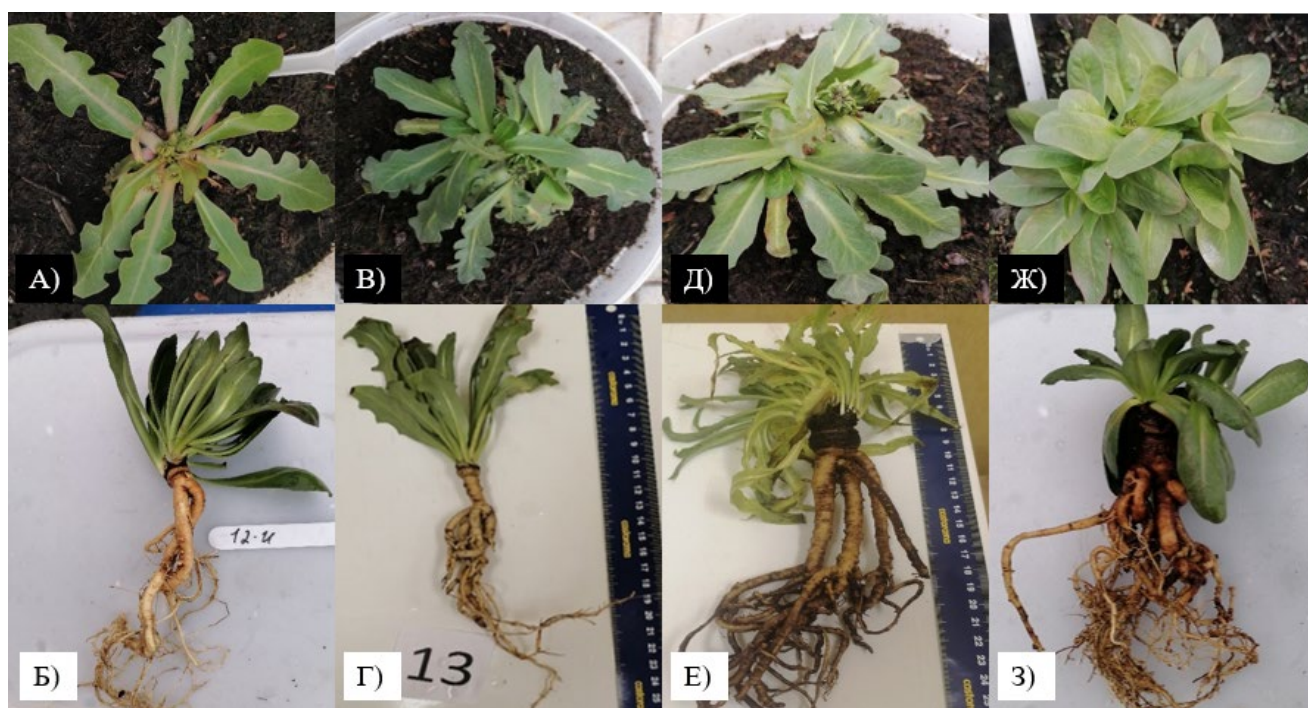


Рисунок 3.36 – Растения-регенеранты кок-сагыза: А), Б) диплоидная форма ($2n$); В), Г) триплоидная форма ($3n$); Д), Е) тетраплоидная форма ($4n$); Ж), З) гексаплоидная форма ($6n$)

Параметры габитуса ди- и триплоидных растений кок-сагыза в значительной степени не различались, тогда как тетра- и гексаплоиды имели увеличенный листовой индекс, количество листьев и большую ширину листьев, по сравнению с контрольными растениями. Диаметр основания корня также был большим у тетраплоидных, и особенно у гексаплоидных форм кок-сагыза (Таблица 3.23).

Таблица 3.23 – Морфологические параметры растений-полиплоидов кок-сагыза

Плоидность Параметр	2n (контроль)	3n	4n	6n
Листовой индекс	2,55±0,31(C)	2,55±0,31(C)	4,07±0,23(B)	4,32±0,25(A)
Количество листьев (шт.)	9,57±1,11(C)	9,57±1,11(C)	14,57±0,84B	15,48±0,96(A)
Ширина листа (см)	1,37±0,11(C)	1,53±0,10(B)	2,18±0,14(A)	2,21±0,17(A)
Длина листа (см)	5,72±0,29(A)	5,72±0,29(A)	5,27±0,38(A)	5,96±0,27(A)
Диаметр основания корня (см)	1,30±0,1(B)	1,20±0,1(B)	3,70±0,2(A)	4,80±0,16(A)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Данетта.

Значительные и достоверные различия наблюдались между тетраплоидами, гексаплоидами и диплоидами по всем показателям, кроме процентного содержания инулина, от сухой биомассы корней, оно составляло $20 \pm 1,5$ для всех растений. Процентное содержание каучука, от сухой биомассы, у тетраплоидных и гексаплоидных образцов по сравнению с диплоидными снизилось примерно на 25%, с 11,5% до 8,35% в среднем. Несмотря на это, за счет общего увеличения корневой системы (биомассы корней) и увеличенного каудекса (места основной концентрации каучука), общее содержание каучука на одно растение у тетраплоидов и гексаплоидов было выше в 1,35 раза, а содержание инулина – в 1,82

раза (Рисунок 3.37). По остальным параметрам тетраплоидные и гексаплоидные так же достоверно превосходят контрольные растения (Таблица 3.24).



Рисунок 3.37 – Демонстрация накопления НК в корнях гексаплоидного экземпляра

Таблица 3.24 – Ростовые и биохимические параметры растений-полиплоидов коксагыза

Плоидность Параметр	2n (контроль)	3n	4n	6n
Общая сырая биомасса (г)	39±1 (C)	40±0,96 (C)	65±1 (B)	72±1 (A)
Масса сырых корней (г)	31,2±1,2 (C)	32±1,1 (C)	52±1,2 (B)	57,6±1,2 (A)
Масса сухих корней (г)	6,24±0,5 (B)	6,4±0,36 (B)	10,4±0,5 (A)	11,52±0,5 (A)
Масса сырых листьев (г)	7,8±0,25 (C)	8±0,32 (C)	13±0,25 (B)	14,4±0,25 (A)
Масса сухих листьев (г)	1,56±0,36 (B)	1,6±0,24 (B)	2,6±0,36 (A)	2,88±0,36 (A)
Содержание каучука (% от сухой массы корней)	11,6±1,2 (A)	11,5±1,1 (A)	9,2±1,2 (B)	9,5±1,2 (B)
Содержание инулина (% от сухой массы корней)	19,8±1,5 (B)	19,5±1,62 (B)	20,4±1,5 (B)	24,5±1,5 (A)
Содержание каучука (мг/на сухую массу корней)	723,84±5,2 (C)	736±2,6 (C)	956,8±5,2 (B)	1094,4±5,2 (A)
Содержание инулина (мг/ на сухую массу корней)	1236±10,5 (C)	1248±8,2 (C)	2122±10,5 (B)	2327±10,5 (A)

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Данетта.

Как отмечалось ранее, полученные в 1945 году Warmke Н. Е. тетраплоидные формы кок-сагыза имели более высокую урожайность НК при выращивании в открытом грунте, чем диплоидные формы. При этом они имели более крупные корни, но более низкую концентрацию каучука в них. Однако при выращивании в закрытом грунте не было зафиксировано достоверных отличий между ди- и тетраплоидами кок-сагыза по содержанию НК (Warmke, 1945). По нашему мнению, причин может быть несколько, например, бедный или неподходящий состав минеральных элементов в тепличном грунте или ухудшение спектрального состава и интенсивности света после прохождения через стеклянные покрытия.

Несмотря на то, что в 50-е годы прошлого века исследования хромосомного статуса могли не отличаться достоверностью, аналогичные результаты были опубликованы Luo Z. с соавторами в 2018 году. Исследователи наблюдали значительные различия между тетраплоидными и контрольными диплоидными формами кок-сагыза по общей сырой биомассе, сырой и сухой биомассе корней и содержанию каучука и инулина при выращивании в открытом грунте, не наблюдая при этом существенной разницы при их выращивании в закрытом грунте (Luo et al., 2018).

Во всех исследованиях, посвященных получению растений-полиплоидов кок-сагыза отмечается увеличение их биомассы, что говорит о перспективности культивирования этих форм, однако на сегодняшний день достоверно не известно о параметрах и свойствах данных линий спустя несколько поколений. Необходима оценка гетерозиса у полиплоидных гибридов и его угасания, а также возможных случаев диплоидизации потомства (Навашин, Герасимова, 1939; Warmke, 1945; Поддубная-Арнольди, 1947; Luo et al., 2018). Отмечается, что полиплоидные формы кок-сагыза могут быть как самоопыляемыми, так и стерильными (Warmke, 1943; Bannan, 1945).

Увеличение биомассы и содержания НК у полиплоидов при выращивании в открытом грунте и отсутствие достоверных различий между ди- и тетраплоидными

растениями кок-сагыза при выращивании в тепличных условиях, в предыдущих работах, также может свидетельствовать о приспособительных преимуществах увеличенного набора хромосом в неблагоприятных, по сравнению с закрытым грунтом, условиях полевого выращивания (Luo et al., 2018). Изучение факторов, влияющих на накопление полиплоидными растениями целевых веществ (НК и инулина) в открытом грунте будет способствовать адаптации режимов выращивания высокопродуктивных полиплоидных растений кок-сагыза в закрытом грунте, а также при аэропонном выращивании. На сегодняшний день стратегия и приемы полиплоидизации широко используются для получения новых форм сельскохозяйственных и садовых культур, поскольку они часто отличаются лучшими агрономическими признаками.

Для полной и эффективной характеристики наших форм полиплоидных растений необходимо дальнейшее, многопрофильное и детальное изучение полученных образцов. Как отмечали другие исследователи (Warmke, 1945), тетраплоидные растения кок-сагыза могут быть стерильными или иметь низкие репродуктивные качества. Однако эти препятствия могут быть преодолены путем получения необходимого и достаточного количества посадочного материала методом микроклонального размножения. Мы предполагаем, что этот естественный недостаток (стерильность, отсутствие семян) можно будет успешно использовать для сохранения полученного генотипа (селекционный образец) и максимально уменьшить вероятность несанкционированного распространения в природе.

3.8. Периодическая срезка корней *T. kok-saghyz* R. при выращивании в аэропонном фитотроне, как метод увеличения продуктивности

В природе, в местах естественного произрастания, кок-сагыз растет медленно, и сырая биомасса одного растения составляет примерно 10 г, а сухая

масса корней составляет порядка 1 г. Содержание каучука в зависимости от образца варьирует от 6 до 14%. При плантационном способе культивирования кок-сагыза продукционные процессы значительно увеличиваются, однако пока являются нерентабельными в отношении конечного продукта. Очевидно, что такие параметры на сегодняшний день неприемлемы для промышленного выращивания кок-сагыза как источника НК. По этой причине становится актуальным поиск новых способов увеличения скорости роста и накопления биомассы корней, а также существенное увеличение содержания НК в корнях кок-сагыза. В этом контексте цель наших исследований – определить возможность периодической частичной срезки корней кок-сагыза, растущего в аэропонной системе.

Известно, что во многих случаях существенное накопление в тканях и органах конечных продуктов подавляют дальнейший биосинтез этих веществ, что приводит или к замедлению биосинтетических процессов или к подавлению. Исходя из этих позиций, мы разработали метод частичной периодической срезки корней кок-сагыза. В аэропонике есть свободный доступ к корневой системе, что позволяет проводить любые манипуляции, в том числе частичную срезку.

В эксперименте использовали оздоровленные растения кок-сагыза коллекционного образца К-31, выращенные из семян в условиях *in vitro*. Опытные растения выращивали в контролируемых условиях фитотрона, контрольные растения выращивали в фитотроне и в почвогрунте, в вегетационных сосудах. Условия и параметры роста были такими же, как и на предыдущих этапах исследований, что отражено в соответствующих разделах.

Растения вегетировали на протяжении 210 суток. Срезку опытных вариантов проводили каждые 30 суток. Всего было 4 срезки. Условия проведения срезки описаны в разделе 2.7. Данные, полученные в результате срезки, представлены в таблице 3.24 и на рисунке 3.37. Эффективность способа периодической срезки корней оценивали как разницу между опытными и контрольными образцами по

сырой биомассе корней и содержанию целевых веществ (НК и инулина) (Таблица 3.25).



Рисунок 3.37 – Срезка корней кок-сагыза, выращенного в аэропонном фитотроне: А) трехмесячное растение до срезки; Б) растения сразу после срезки; В) восстановление корневой системы после срезки, через 30 дней

Таблица 3.25 – Эффективность накопления сырой биомассы корней, общая продуктивность по каучуку и инулину при разных вариантах выращивания кок-сагыза, за 210 дней вегетации

Варианты	Масса сырого корня, г	Эффектив- ность накопления биомассы сырого корня, %	Общая продук- тивность по НК, г/растение	Эффек- тивность продук- тивности по НК, %	Общая продук- тивности по инулину, г/растение	Эффективность продуктивности по инулину, %
Кок-сагыз (почва) контроль без срезки	59,2±7,8 (С)	1,00	1,75±0,01 (С)	1,00	3,16±0,08 (С)	1,00
Кок-сагыз (аэропоника) контроль без срезки	127,3±3,1 (В)	2,16	2,79±0,02 (В)	1,63	5,25±0,07 (В)	1,66

Продолжение Таблицы 3.25

Варианты	Масса сырого корня, г	Эффективность накопления биомассы сырого корня, %	Общая продуктивность по НК, г/растение	Эффективность продуктивности по НК, %	Общая продуктивности по инулину, г/растение	Эффективность продуктивности по инулину, %
Кок-сагыз (аэропоника) 4 срезка	261,7±20,3 (А)	4,44	4,83±0,01 (А)	2,82	11,28±0,04 (А)	3,57

Примечание: представленные значения являются средними для трех независимых экспериментов с тремя повторами внутри каждого. Значения с одинаковой буквой значимо не различаются с вероятностью 95% в соответствии с тестом Данетта.

Содержание сухого вещества в растениях, выращенных в аэропонном фитотроне — 12±1 %.
Содержание сухого вещества в растениях выращенных в почве — 20±1

Контрольные растения, выращенные в почве в вегетационных сосудах, за 210 дней выращивания накопили 59±7,8 г сырой биомассы корня, 1,75 ±0,01 г каучука и 3,16±0,08 г инулина. Опытные варианты, в том числе растения, выращенные в аэропонном фитотроне, без срезки, накопили в 2,16 раза большее количество корневой биомассы, в 1,63 раза больше каучука и в 1,66 раза больше инулина. Наилучший результат по накоплению сырой биомассы корней получили в варианте с периодической срезкой. По сравнению с контрольными растениями, выращенными в почве, контрольные растения, выращенные в аэропонном фитотроне, накопили НК больше в 2,82 раза, а инулина больше в 3,57 раза. Суммарная масса корней, полученных в процессе роста и частичной срезки, была в 4,4 раза больше, чем у контрольных растений в почве. В варианте роста без срезки масса корней была в 2,16 раза больше, чем в контроле. Если сравнивать аэропонный способ выращивания со срезкой и без, то срезка позволяет собрать примерно вдвое большую биомассу корней за тот же период вегетации. Это можно объяснить положительным влиянием срезки, удалением накопленных метаболитов, антибактериальной и гормональной обработкой для восстановления корневой системы.

В работе Cornish K. с соавторами также исследовался вопрос периодической срезки корней кок-сагыза с целью повышения продуктивности производства НК. Растения кок-сагыза выращивали в гидропонной установке в течение 10 недель, затем промывали и срезали на 10 см ниже каудекса и продолжали выращивать на гидропонной установке при неизменных условиях. Через определенные промежутки времени регистрировали общую массу растений, а через восемь недель отдельно определяли массу корней и побегов, а также концентрацию каучука в корнях. В результате после обрезки корней растения отрастили больше корневой массы, чем было до обрезания (за 10 недель выращивания на гидропонике), однако концентрация каучука в них оказалась такой же, как и в корнях до обрезки (Cornish K. et al. 2016).

3.9. Исследование качественного состава каучука, полученного из растений *T. kok-saghyz* R.

3.9.1. Гель-проникающая хроматография каучука, выделенного из корней *T. kok-saghyz* R.

Гель-проникающая хроматография (ГПХ) – это широко распространенный метод получения данных о распределении молекулярных масс полимеров, в т.ч. каучука. Увеличение молекулярной массы ведет к улучшению эксплуатационных свойств материала, в то время как увеличение ширины распределения (полидисперсность) ведет к ухудшению эксплуатационных свойств, но улучшает обрабатываемость материала.

При разработке технологии выращивания растений кок-сагыза как источника НК, в фитотронных условиях методом аэропоники, важно было выяснить количественные и качественные характеристики НК, полученного таким способом. Биосинтез полиизопренов (в том числе каучука) является реакцией поликонденсации, в которой основную роль играют каучуковые частицы,

находящиеся в специализированных клетках, млечниках (латициферах). В этих клетках синтезируются первичные звенья изопентенилпирофосфата (IPP), из которых, в результате реакции поликонденсации, образуются молекулы НК. Реакция происходит путем ферментативного присоединения изопентенилпирофосфата с аллильной перегруппировкой и отщеплением аниона пирофосфата. Так как эти процессы динамичные, протекают и в течение вегетации, и во время покоя, то в латициферах наличествуют молекулы каучука различной длины и, соответственно, разной молекулярной массы. Молекулярно-массовое распределение может быть представлено индексом полидисперсности, определяемым по формуле:

$$D = M_w / M_n ,$$

где D – индекс полидисперсности;

M_w – среднемассовая молекулярная масса (г/моль);

M_n – среднечисленная молекулярная масса (г/моль).

Индекс полидисперсности позволяет учитывать неоднородность материалов и прогнозировать их свойства. С увеличением молекулярной массы полимера повышаются его прочность, вязкость и температура плавления.

Даже так называемые монодисперсные полистиролы имеют индекс полидисперсности 1,1 по сравнению со значением 1,0 для чистого соединения с однородной молекулярной массой. При увеличении диапазона размеров молекул полимера увеличивается и индекс полидисперсности.

Методом гель-проникающей хроматографии было получено молекулярно-весовое распределение НК из кок-сагыза и НК из гевеи бразильской (Рисунок 3.38).

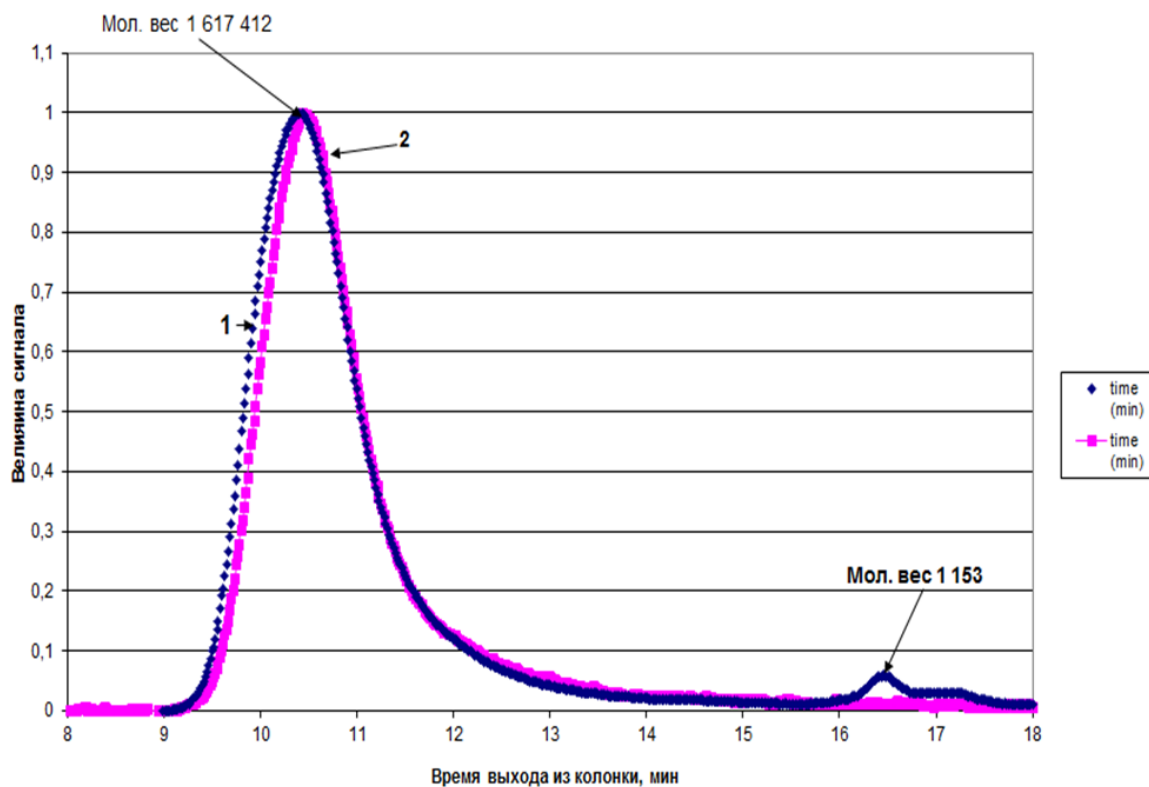


Рисунок 3.38 – Гель-хроматограмма натурального каучука: 1) темно-синий цвет-образец из кок-сагыза, выращенного в фитотроне; 2) фиолетовый цвет-образец из гевеи бразильской (марка SIR, Estate Brown Crepes, сорт LX)

Показано, что молекулярно-массовое распределение обоих образцов практически совпадает по основному максимуму распределения, молекулярная масса которого около 1,6 млн Да. В таблице 3.26 показаны характеристики НК, извлеченного из корней, выращенных в аэропонном фитотроне, с периодической срезкой и без нее, в сравнении с НК из гевеи и НК из корней кок-сагыза, выращенных в почве.

В реальности в растениях в процессе биосинтеза все полимеры, в том числе каучук, состоят из макромолекул разной длины и разной массы. В образце каучука из кок-сагыза, выращенного в фитотроне, присутствует низкомолекулярная часть, по молекулярной массе примерно в 1000 раз меньше, чем высокомолекулярная.

Таблица 3.26 – Сравнение молекулярно-массовых характеристик НК, извлеченного из корней кок-сагыза, выращенного в фитотроне и в почве, с НК из гевеи (марка SIR Estate Brown Crepes, сорт LX)

Образец НК	Мр (г/моль)	Мw (г/моль)	Мn (г/моль)	PDI
Контроль (гевея)	$1,04 \cdot 10^6$	$0,99 \cdot 10^6$	$4,11 \cdot 10^5$	2,41
Почва (кок-сагыз)	$1,16 \cdot 10^6$	$1,61 \cdot 10^6$	$6,72 \cdot 10^5$	2,40
Фитотрон (кок-сагыз) без срезки корней	$1,14 \cdot 10^6$	$1,52 \cdot 10^6$	$6,14 \cdot 10^5$	2,48
Фитотрон (кок-сагыз) периодическая срезка корней	$0,99 \cdot 10^6$	$0,85 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^5$	1,13

Среднемассовая молекулярная масса (Мw), среднечисленная молекулярная масса (Мn), пиковая молекулярная масса (Мр), индекс полидисперсности (PDI)

Видимо, наличие низкомолекулярного НК можно объяснить динамическими процессами биосинтеза каучука в корнях, так как процесс синтеза новых молекул каучука идет постоянно и часть низкомолекулярных частиц каучука еще не вовлечена в процессы поликонденсации. Низкомолекулярная фракция может быть как результатом неполной полимеризации, так и деградации высокомолекулярных цепей или наличия альтернативных путей биосинтеза.

Такие же закономерности биосинтеза НК и распределения, в зависимости от возраста растений наблюдается у гевеи (Yamashita S., Takahashi S., 2020).

Так как низкомолекулярный каучук легко поддается переработке, его можно использовать для специальных изделий, где требуется от НК низкая вязкость, хорошая растворимость и легкость модификации. Можно предположить, что все каучуки, полученные из растений кок-сагыза, выращенных аэропнным способом, будут востребованы со стороны перерабатывающей промышленности.

3.9.2. Исследование качественного состава каучука из корней *T. kok-saghyz* R. методом ИК-спектроскопии

Был проведен сравнительный анализ качественного состава каучука, полученного из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, натурального каучука из гевеи (марка SIR, Estate Brown Crepes, сорт LX), библиотечных данных по каучуку двух марок из бразильской гевеи, SMR CV 60 и SMR-5, и синтетическому полиизопреновому каучуку на основе спектров ИК-поглощения. Для большей наглядности сравнение спектров ИК-поглощения обоих видов каучука сделано в виде одного рисунка (Рисунок 3.39).

На рисунке 3.39 синим цветом показан спектр ИК-поглощения НК из гевеи. Видно, что полосы поглощения условно можно разделить на четыре области (слева направо): 1) область, в которой максимальное поглощение приходится на полосу 2962 см^{-1} ; 2) область с максимумом поглощения 1495 см^{-1} ; 3) область с максимумом поглощения 837 см^{-1} ; 4) область с максимумом поглощения 577 см^{-1} .

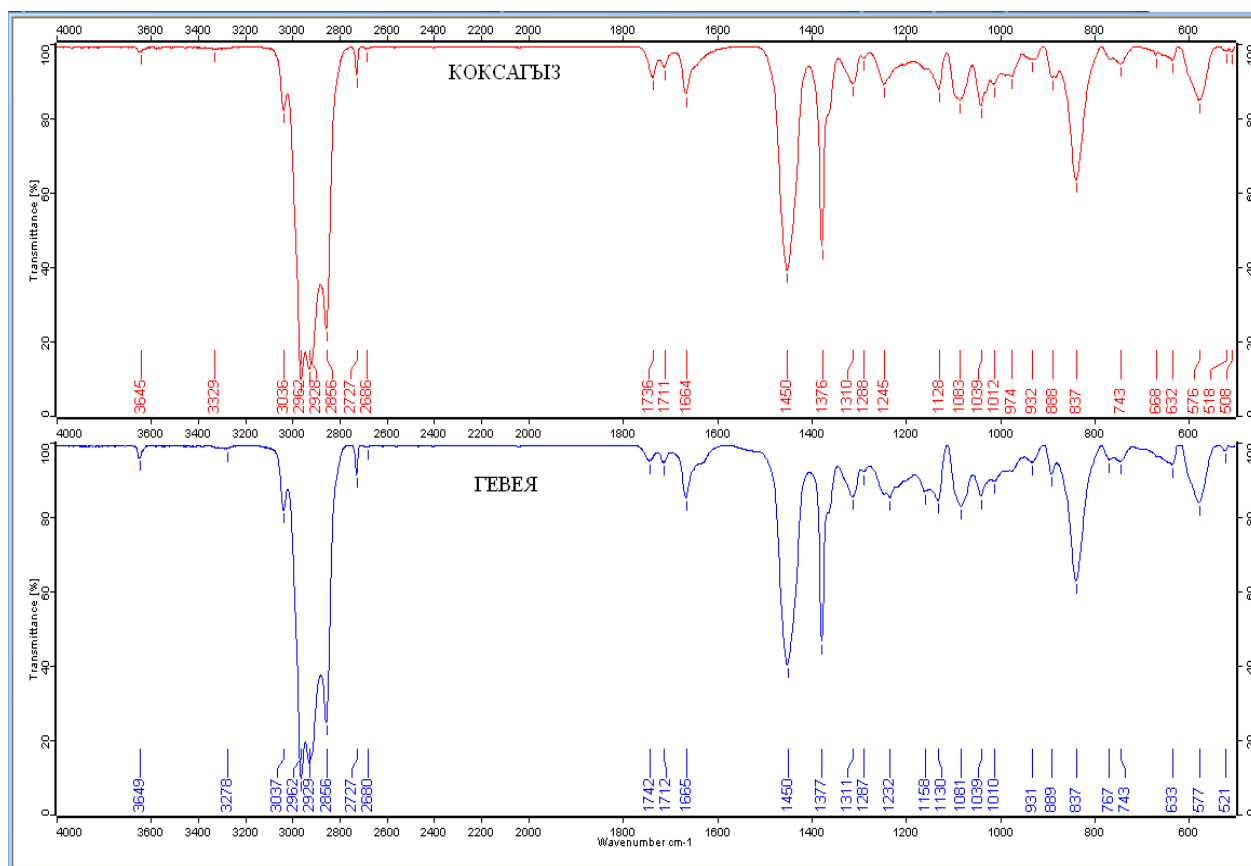


Рисунок 3.39 – Сравнение ИК-спектров каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, и каучука из гевеи, (марка SIR, Estate Brown Crepes, сорт LX). Образцы для проведения анализа приготовлены по стандартной методике

Согласно литературным данным (Chen, 2013; Nandiyanto et al., 2019), полоса поглощения при 837 см^{-1} , отражающая валентные колебания двойных связей в основной цепи цис-1,4- полиизопрена, является уникальной, изолированной и интенсивной. Поэтому она могла бы быть использованной для количественного определения каучука. В спектрах проявляются также углерод-углеродные валентные связи в пике при 1645 см^{-1} и вырожденные пики колебаний метильных и метиленовых групп при 1450 см^{-1} , метильных при 1380 см^{-1} и упомянутая выше полоса 837 см^{-1} колебаний двойных связей в изопрене. Пики 1738 см^{-1} и 1664 см^{-1} могут быть приписаны функциональным группам $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}=\text{O}$ соответственно. Пики 3282 см^{-1} и 1548 см^{-1} относятся к связи $\text{N}-\text{H}$ и обозначают присутствие

протеинов в образце SK (НК) и их практически отсутствие в образце SP-SK (синтетический цис-1,4-полиизопреновый каучук) (Рисунок 3.40). Рисунок 3.40 носит иллюстративный характер и взят из литературы (Keawmuangkham et al., 2017).

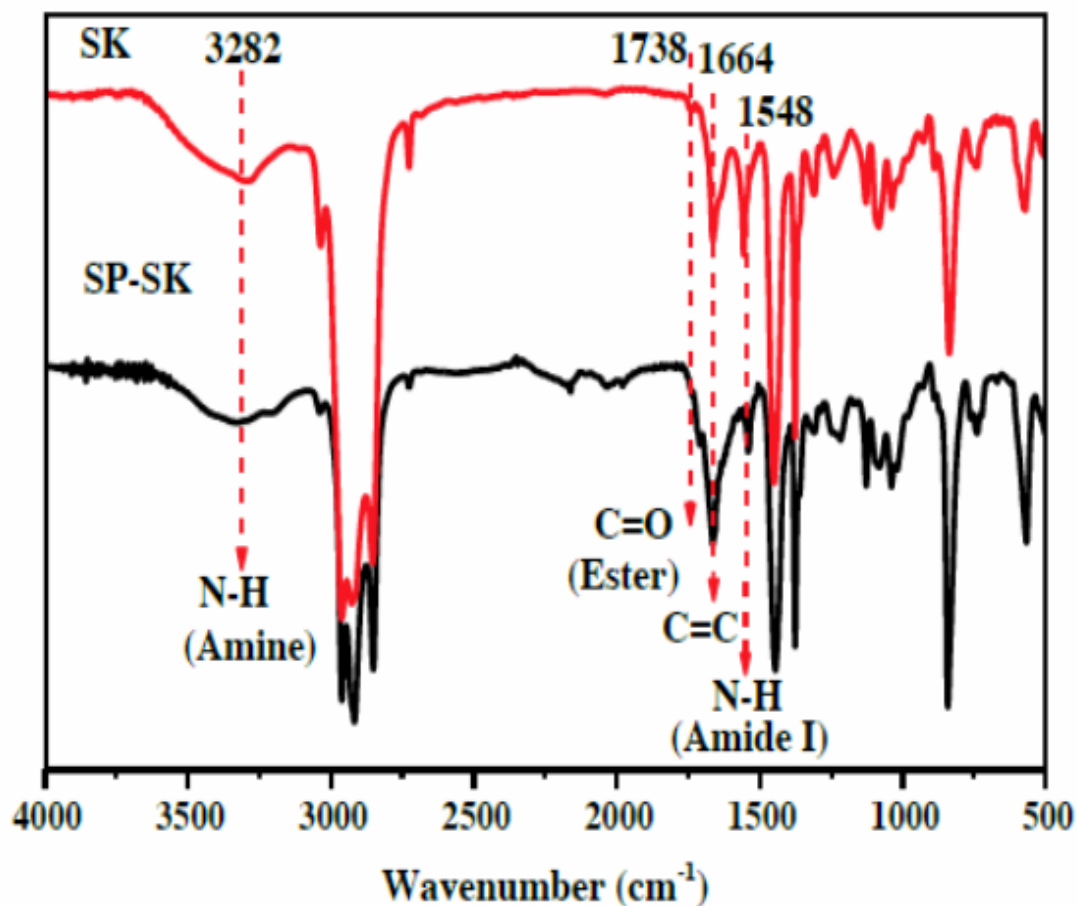


Рисунок 3.40 – Сравнение ИК-спектров натурального каучука (SK, красная линия) и синтетического, полиизопренового (SP-SK, темно-синяя линия) (Keawmuangkham S. et al., 2017)

Было проведено сопоставление ИК-спектров каучука из растений кок-сагыза, выращенного в фитотроне, со стандартными библиотечными спектрами (Рисунок 3.41).



Рисунок 3.41 – Сравнение ИК-спектра каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, с ИК-спектром каучука бразильской гевеи марки SMR CV 60. Характеристики стандартного образца бразильской гевеи: внешний вид – светло-коричневый эластомер. Химическое название – poly(1,4-Z-isoprene), poly(1-methyl-1-Z-butenylene); с малым количеством низкомолекулярных соединений (смол) и протеинов. Метод приготовления – пленка на KBr

На рисунке 3.42 проведено сопоставление ИК-спектра каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, с библиотечным спектром каучука из гевеи. Интересно отметить, что пики 3282 см^{-1} и 1548 см^{-1} , ответственные за присутствие в каучуке протеинов, присутствующие в каучуке из гевеи, отсутствуют в каучуке из растений кок-сагыза. Присутствие протеинов в натуральном каучуке объясняется их участием в осуществлении катализа одной из стадий синтеза каучука в гевее. Показанные на рисунке 3.42 результаты говорят о возможном отличии химизма синтеза каучука в гевее и растениях кок-сагыза или о том, что в

процессе выделения из корней каучука некоторые фракции, не растворимые в органических растворителях, удаляются.

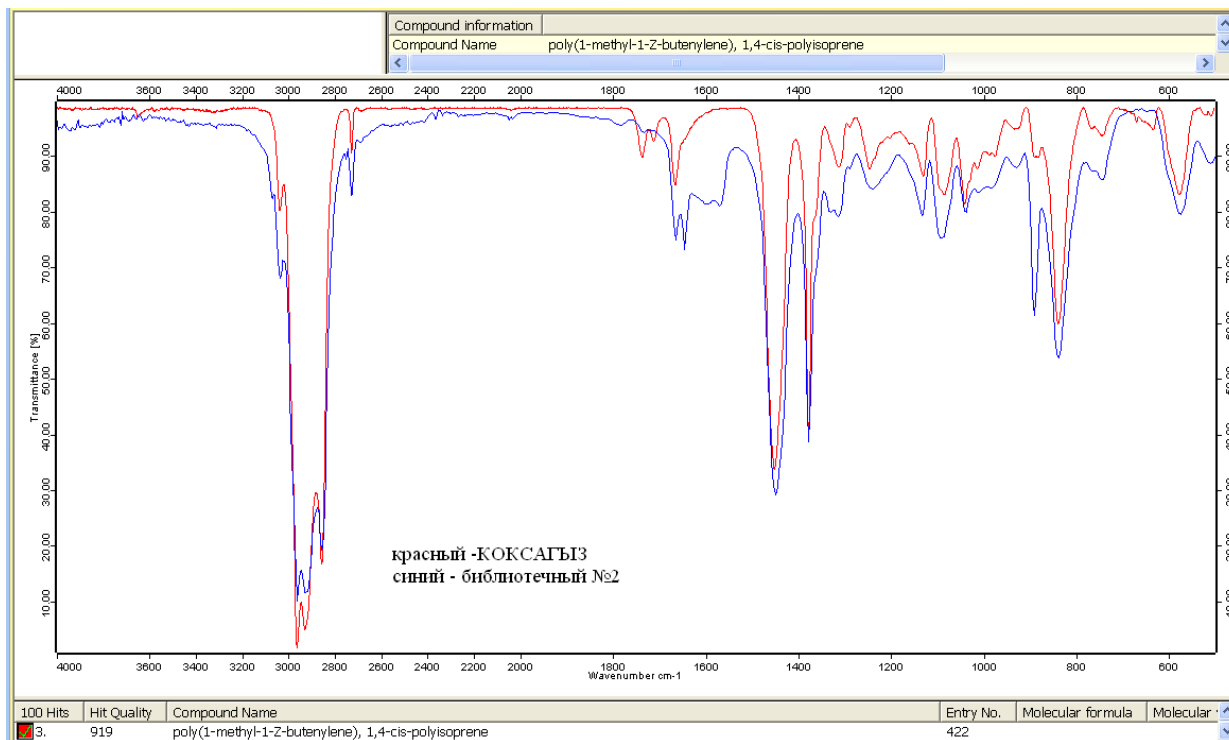


Рисунок 3.42 – Сравнение ИК-спектра каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, с библиотечным ИК-спектром синтетического полиизопренового каучука. Химическое название стандартного библиотечного образца: poly(1-methyl-1-Z-butenylene), 1,4-cis-polyisopren

Сравнение спектров каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, с библиотечным ИК-спектром синтетического полиизопренового каучука показало ожидаемое для синтетического каучука отсутствие пиков, соответствующих связям N-H в протеинах, и неожиданное их отсутствие в натуральном каучуке, полученном из растений кок-сагыза (Рисунок 3.42). Заметное отличие проявилось на частоте 1600 см^{-1} . В библиотечном спектре 1,4-цис-полиизопрена поглощение есть, а в спектре каучука из растений кок-сагыза его нет.

Это, вероятно, связано с различием химизма синтеза каучука в промышленности и природе.

При сравнении спектра каучука из растений кок-сагыза с библиотечным ИК-спектром натурального каучука из бразильской гевеи марки SMR-5 (Рисунок 3.43) подтвердилось неожиданное отсутствие N-H связей в первом и их присутствие во втором. Таким образом, каучук, полученный из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, практически идентичен НК из гевеи бразильской, за исключением отсутствия в нем примеси протеинов. Отсутствие протеинов связано со способом извлечения НК из корней кок-сагыза.

Предложенный способ культивирования растений кок-сагыза в контролируемых условиях фитотрона, методом аэропоники позволяет получать высокомолекулярный каучук, идентичный НК из гевеи, что указывает на перспективы культивирования растений в условиях фитотрона.

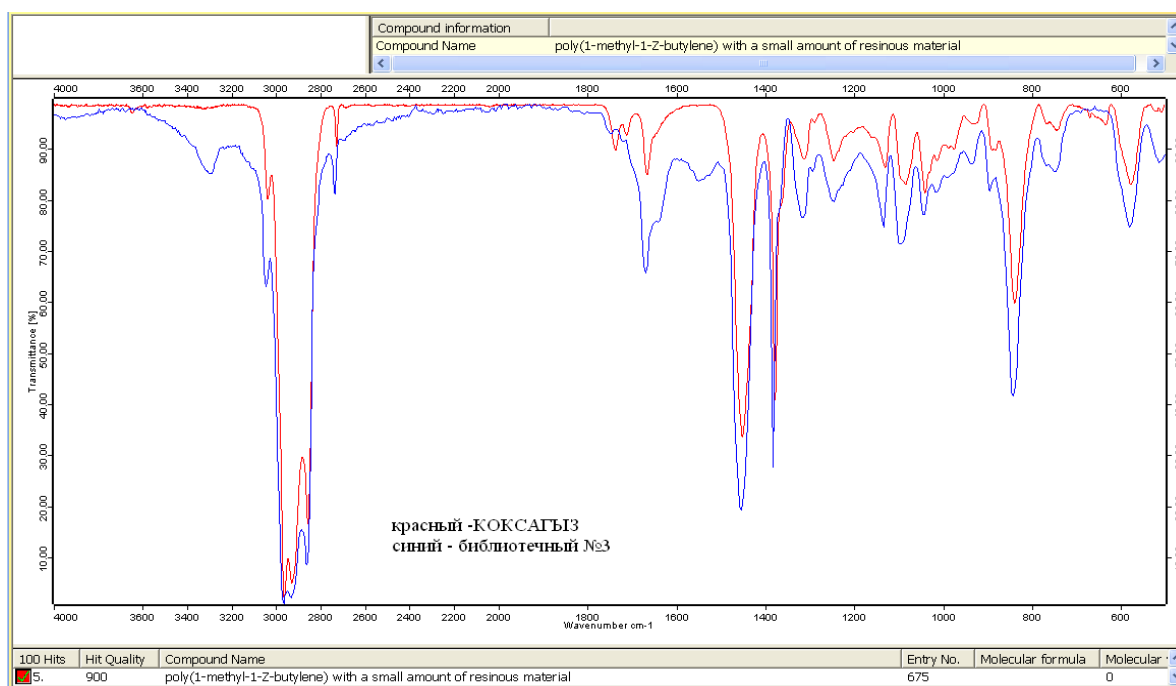


Рисунок 3.43 – Сравнение ИК-спектров каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, с библиотечным ИК-спектром натурального каучука из бразильской гевеи марки SMR-5

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе раскрываются новые аспекты биотехнологии культивирования каучуконоса *Taraxacum kok-saghyz* R., факторы, влияющие на биосинтез каучука и инулина. Исследованы реакции растений на смену среды культивирования при переходе из почвенной среды в аэропонную.

В процессе проведения исследований были выделены и идентифицированы два не описанных ранее патогена кок-сагыза: *Pseudomonas putida* и *Raoultella terrigena*; для борьбы с патогенами были подобраны антибиотики. Было получено несколько штаммов бактериофагов *P. putida* и *R. terrigena*. Была создана оздоровленная рабочая коллекция растений кок-сагыза.

Впервые, экспериментально установлено, что причиной «летнего покоя» (дефолиации) растений *T. kok-saghyz* R., не прошедших цикла оздоровления, является эндогенная микрофлора. В конце вегетации средняя биомасса оздоровленных растений была примерно в 3 раза выше, чем у инфицированных *P. putida* и *R. terrigena* растений. Соответственно, содержание целевых продуктов было выше, НК в 3,7 раза, инулина примерно в 5 раз.

Подобраны и оптимизированы условия введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения кок-сагыза. Для получения асептических жизнеспособных растений кок-сагыза рекомендовано проводить двухступенчатую асептизацию семян. Наилучшей средой для каллусогенеза кок-сагыза была питательная среда MS, в качестве эксплантов предпочтительнее использовать корни. Добавление GSH в питательную среду, за счет стимулирования образования гидроксикоричных кислот, ускоряло возникновение морфогенных зон, образование регенерантов, снижалась доля потемневших каллусов. Наблюдался прирост биомассы каллусов и, далее, растений.

У коллекционного образца кок-сагыза В-391 отмечена большая скорость фотосинтеза, т. е. он проявлял высокую продуктивность при высоких уровнях

интенсивности света. Данные по скорости газообмена и аппроксимации световых кривых у коллекционного образца В-391 свидетельствовали о скорости CO_2 газообмена и эффективности работы фотосинтетического аппарата. Данный образец был выбран для дальнейших экспериментов. Облучение растений в области ФАР, с преобладанием синей части его спектра (ФАР+СС), приводило к повышению скорости фотосинтеза и активности ФС II и к большему накоплению каучука и инулина, в сравнении с облучением растений в области ФАР с преобладанием красной части (ФАР+КС). Использование облучения с большей долей красной составляющей спектра (ФАР+КС) способствовало большему накоплению биомассы при меньшей активности фотосинтетического аппарата.

Разработан способ получения культуры трансформированных корней с фенотипом «*hairy roots*». Исследован метаболизм данных корней, в зависимости от длительности культивирования в жидкой питательной среде. Получены композитные растения кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*». Композитные растения кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*» при выращивании в аэропонном фитотроне (в течение 3 месяцев), в сравнении с интактными растениями, имели в 1,7 раза увеличенную корневую систему. При этом содержание каучука и инулина отличалось незначительно. Разработана методика получения полиплоидных растений из каллусных тканей кок-сагыза. Полученные тетраплоидные растения продуцировали в 1,5 раза больше каучука, а инулина в 1,9 раза больше, чем диплоидные растения. По качеству каучук кок-сагыза из аэропонного фитотрона не отличается от каучука из гевеи, что указывает на перспективы культивирования растений в условиях фитотрона. Разработан экспресс-метод определения количественного содержания НК в микрообразцах корней с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых зондов без экстракции растворителями, а также устройство автоматического непрерывного взвешивания растений в фитотроне. Эти метод и устройство позволяют существенно ускорять селекционный процесс,

проводить отбор по скорости роста и по концентрации каучука на начальных стадиях развития растений кок-сагыза.

Проведен сравнительный анализ качественного состава НК, полученного из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, НК из гевеи и библиотечных данных по каучуку из двух сортов бразильской гевеи, SMR CV 60 и SMR-5, а также синтетическому полиизопреновому каучуку, на основе спектров ИК-поглощения и гель-проникающей хроматографии. НК, полученный из кок-сагыза, выращенного в фитотроне, практически идентичен НК из гевеи, за исключением отсутствия или низкого содержания в нем примеси протеинов, обычно присутствующих в натуральных каучуках.

В данном исследовании также предлагается новая стратегия увеличения выхода натурального каучука с помощью аэропонного культивирования с применением метода периодической частичной срезки корней в условиях фитотрона. В перспективе, для коммерциализации аэропонного культивирования кок-сагыза, большую роль будет играть комплексная переработка всей выращенной растительной биомассы для одновременного извлечения всех ценных продуктов, имеющихся в кок-сагызе.

ВЫВОДЫ

1. Создана рабочая коллекция оздоровленных от патогенов растений *T. kok-saghyz* R. *in vitro*.
2. Выделены и идентифицированы два не описанных ранее патогена *T. kok-saghyz* R.: *Pseudomonas putida* и *Raoultella terrigena*. Подобраны антибиотики и получены бактериофаги для борьбы с бактериозом корней кок-сагыза.
3. Экспериментально установлено, что причиной «летнего покоя» (дефолиации) растений *T. kok-saghyz* R., не прошедших цикла оздоровления, является эндогенная микрофлора. У оздоровленных растений в течение вегетации, как в условиях почвы, так и в аэропонных условиях, дефолиация не наступает.
4. Разработан и запатентован исследовательский аэропонный фитотрон, позволяющий одновременно контролировать основные факторы роста и развития растений. Подобраны условия выращивания растений, включающие минеральное питание, световые режимы, концентрацию CO₂ в культивационной камере фитотрона.
5. Разработан экспресс-метод определения количественного содержания каучука в образцах с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых зондов.
6. Показано, что облучение растений в области ФАР, с преобладанием синей части его спектра, приводит к повышению скорости фотосинтеза, активности фотосистемы два и высокому содержанию каучука ($12,3 \pm 0,3$ % по сухому веществу) и инулина ($21,3 \pm 1,2$ % по сухому веществу) в корнях растений.
7. Разработан способ получения культуры трансформированных корней *T. kok-saghyz* R. с фенотипом «*hairy roots*», определено содержание каучука ($7,9 \pm 0,2$ %) и инулина ($14,6 \pm 0,2$ %) на 70-е сутки выращивания.
8. Получены композитные растения-регенеранты кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*» с увеличенной в 1,7 раза массой корней по сравнению с интактными растениями, в почве. Содержание целевых продуктов в композитных

растениях-регенерантах *T. kok-saghyz* R.: НК $8,8 \pm 0,2$ % или $563,2 \pm 1,5$ мг сухой биомассы корней, инулин $16,5 \pm 0,9$ %, или $1100 \pm 0,9$ мг сухой биомассы корней.

9. Разработана методика получения полиплоидных растений. Полученные тетраплоидные растения продуцировали в 1,5 раза больше каучука и в 1,9 раза больше инулина, чем диплоидные растения, в пересчете на сухую массу корней.

10. Установлено, с помощью ИК-спектроскопии и гель-проникающей хроматографии, что каучук кок-сагыза, выращенного в аэропонном фитотроне, по качественному составу практически не отличается от каучука из гевеи.

11. Разработана методика периодической частичной срезки корней в аэропонном фитотроне, позволяющая получить в 4,4 раза больше сырой массы корней, в 2,8 раза больше НК и в 3,6 раза больше инулина по сравнению с контрольными растениями, выращенными в почве.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

6-БАП – 6-бензиламинопурин;

АЦП – аналого-цифровой преобразователь;

БС – белый свет;

БОЕ – бляшкообразующая единица;

ВИР – Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова;

ГК – гидроксикоричные кислоты;

ГПХ – гель-проникающая хроматография;

ИБП – источник бесперебойного питания;

ИМК – индолил-3-масляная кислота;

ИУК – индол-3-уксусная кислота;

КИН – кинетин;

КС – красный свет;

НК – натуральный каучук;

НУК – α -нафталинуксусная кислота;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СД – светодиодные облучатели;

СК – синтетический каучук;

СКП – световая точка компенсации;

СС – синий свет;

ТГФ – тетрагидрофуран;

ТДЗ – тидиазурон;

ФА – фотосинтетический аппарат;

ФАР – фотосинтетически активная аппарат;

ФС II – фотосистема два;

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;

APP – аллилпирофосфат;

DMAPP – 1,1-диметилаллилпирофосфат;

F_0 – исходный фоновый уровень флуоресценции (в темноте);

F_m – максимальный квантовый фотохимический выход флуоресценции ФС II;

F_v – фотоиндуцированные изменения флуоресценции;

F_v/F_m – показатель функционального состояния ФА;

GSH – глутатион;

IPP – изопентенил пирофосфат;

MER – метилэритрит;

MS – среда Мурасиге-Скуга;

MVA – мевалонат;

NPQ – показатель нефотохимического тушения;

PAM – флуориметр с импульсной модуляцией амплитуды возбуждающего света;

SALB – южноамериканский фитофтороз;

SRPP – малый белок, ассоциированный с каучуковыми частицами;

ETR – показатель скорости транспорта электронов;

Φ (II) – эффективный квантовый выход ФС II.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ТЕРМИНОВ

Адвентивные почки – почки на растениях, возникшие из клеток и тканей, обычно их не образующих.

Аэропоника – способ выращивания растений в воздушной среде без использования почвы, при котором питательные вещества к корням растений доставляются в виде аэрозоля.

Бляшкообразующая единица — это мера, используемая в вирусологии для описания количества вирусных частиц, способных образовывать бляшки на единицу объема.

Гидропоника – способ выращивания растений без использования почвы, при котором питательные вещества к корням растений поступают из питательного раствора, окружающего корни.

Квантовая эффективность фотосинтеза – количество молекул CO_2 , ассимилированных на 1 моль поглощенных фотонов.

Коллекционный образец – это сохраняемое в живом виде растение, относящееся к одному виду или внутривидовому таксону одного ранга, которое является компонентом коллекции.

Световая точка компенсации, или световой компенсационный пункт (СКП) – наименьшая интенсивность света на световой кривой, при которой активность фотосинтеза и дыхания уравниваются по газообмену; в этой точке количество фиксируемого растением CO_2 в точности соответствует его количеству, выделяемому растением в результате дыхания и фотодыхания.

Фитотрон – изолированная камера или помещение для программируемого выращивания растений. В фитотроне контролируются и регулируются все параметры, влияющие на рост и развитие растений (температура, влажность, газовый состав среды, спектральный состав и интенсивность света, длина

светового дня - соотношение день/ночь, параметры минерального питания растений).

Эффективность фотосинтеза – доля световой энергии, преобразуемая организмами в химическую в процессе фотосинтеза.

Ex situ – сохранение компонентов биологического разнообразия вне их естественных мест обитания.

In planta – процесс прямого трансформирования растений, т. е. без стадии культивирования растительных клеток и тканей и регенерации растений.

In vitro – метод исследования, выполняемый в контролируемых лабораторных условиях в пробирках или, более распространено, вне живого организма или клетки.

In vivo – метод исследования, проводимый непосредственно на живых организмах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Л.Н. Лабораторно-практические занятия по почвоведению / Л.Н. Александрова, О.А. Найденова. — Л.: Агропромиздат, 1986. — 295 с. — С. 280.
2. Алехина, Н.Д. Физиология растений: учебник для вузов / Н.Д. Алехина [и др.]. — М.: Academia, 2005. — С. 128-212. — ISBN 5-7695-1669-0.
3. Америк, А.Ю. Регуляция биосинтеза натурального каучука белками, ассоциированными с каучуковыми частицами / А.Ю. Америк, Ю.Ц. Мартиросян, И.В. Гачок // Биоорганическая химия. — 2018. — Т. 44, № 2. — С. 126-137. DOI: 10.7868/S0132342318020021.
4. Америк, А.Ю. *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? / А.Ю. Америк [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 2022. — Т. 57, № 1. — С. 3-26. DOI: 10.15389/agrobiology.2022.1.3rus.
5. Америк, А.Ю. Молекулярно-генетический анализ биосинтеза натурального каучука / А.Ю. Америк [и др.] // Физиология растений. — 2021. — Т. 68, № 1. — С. 36-52. DOI: 10.31857/S0015330321010036.
6. Аринушкина, Е.В. Руководство по химическому анализу почв: учебное пособие / Е.В. Аринушкина. — М.: МГУ, 1970. — С. 488-491.
7. Балацкий, А.В. Влияние концентрации углекислого газа и воды на скорость процесса фотосинтеза тепличных растений / А.В. Балацкий // Проблемы естествознания: история и современность. — 2018. — С. 26-28. — EDN YQEMSD.
8. Бари, Г.Т. Оптимизация площади питания одуванчика кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) / Г.Т. Бари [и др.] // Scientific journal "Bulletin of Science of the Kazakh Agrotechnical Research University named after S. Seifullin". — 2021. — № 1 (108). — С. 41-52. — ISSN 2079-939X.

9. Бари, Г.Т. Отбор высокопродуктивных и раннеспелых форм одуванчика кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) — источника натурального каучука в экспериментальных полевых условиях / Г.Т. Бари [и др.] // *Izdenister natigeler*. — 2021. — № 1 (89). — С. 107-118. DOI: 10.37884/1-2021/12.

10. Борейко, Н.П. Предпосылки для разработки государственной программы создания искусственного аналога натурального каучука / Н.П. Борейко, В.Н. Папков, Е.В. Комаров // *Каучук и резина*. — 2019. — Т. 78, № 6. — С. 380-383. — EDN FLGMBN.

11. Борисова, Г.Г. Основы биохимии вторичного обмена растений: учебно-методическое пособие / Г.Г. Борисова [и др.]. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. — С. 15-21. — ISBN 978-5-7996-1296-2.

12. Вассерман, А.М. Спиновые метки и зонды в физикохимии полимеров / А.М. Вассерман, А.Л. Коварский. — М.: Наука, 1986. — 244 с.

13. Вершинина, З.Р. Эволюция методов редактирования геномов / З.Р. Вершинина [и др.] // *Биомика*. — 2017. — Т. 9, № 3. — С. 245-270. — EDN ZUEBXB.

14. Волынкин, В.А. Селекция винограда на бессемянность, крупноягодность и раннеспелость на полиплоидном уровне / В.А. Волынкин, В.А. Зленко, В.В. Лиховской // *Виноградарство и виноделие*. — 2009. — Т. 39. — С. 9-13. — EDN VKAEGX.

15. Воробьев, В.Н. Практикум по физиологии и биохимии растений. Фотосинтез: Учебно-методическое пособие / В.Н. Воробьев, Т.П. Якушенкова, Г.В. Воробьев. — Казань: Казанский университет, 2013. — 32 с.

16. Воскресенская, Н.П. Регуляторная роль синего света в фотосинтезе / Н.П. Воскресенская // *Физиология фотосинтеза*. — 1982. — С. 203.

17. Гаврилова, В.А. Методические указания по возделыванию кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) / В.А. Гаврилова [и др.]. — СПб.: ВИР, 2017. — С. 6-10. — ISBN 978-5-905954-57-3.

18. Гармаш, Е.В. Митохондриальное дыхание фотосинтезирующей клетки / Е.В. Гармаш // Физиология растений. — 2016. — Т. 63, № 1. — С. 17. DOI: 10.7868/S001533031506007X.

19. Глазко, В.И. НИ Вавилов как организатор науки сообщение 4. НИ Вавилов и глобалистика / В.И. Глазко, В.М. Баутин // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. — 2012. — № 4. — С. 193-211.

20. Головацкая, И.Ф. Специфика роста и накопления флавоноидов у растений и клеточных культур *Lychnis chalcidonica*, полученных от эксплантов разных органов / И.Ф. Головацкая [и др.] // Fiziologija rastenij. — 2024. — Т. 71, № 3. — С. 320-332. DOI: 10.1134/S1021443724604208.

21. Гольцев, В.Н. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а - теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений / В.Н. Гольцев, М.Х. Каладжи, М.А. Кузманова, С.И. Аллахвердиев. — М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2014. — 220 с.

22. Гольдберг В. М., Барашкова И. И., Мартиросян Л. Ю., Мартиросян Ю. Ц., Мотякин М. В., Гайдамака С. Н., Варфоломеев С. Д.; заявитель — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН / Способ определения содержания каучука в тканях каучуконосных растений // Патент № 2805229, Российская Федерация, МПК: G01N 24/10, C08L 7/00, заявл. 20.10.2022, опубл. 12.10.2023. — EDN PGBMYN. — Текст: электронный.

23. Гольдберг В. М., Гусейнов Т. М., Соловьев А. А., Мартиросян Ю. Ц., Мартиросян Л. Ю.; патентообладатель — ИБХФ РАН / Устройство для измерения веса растений в фитотроне в режиме реального времени // Патент № 212577, Российская Федерация, МПК: G01G 3/12 (2006.01), A01G 31/00 (2006.01), заявл. 01.04.2022, опубл. 29.07.2022. — Текст: непосредственный.

24. ГОСТ Р 54905-2012. Методы определения ферментативной активности β -глюканазы. Enzyme preparations. Methods of β -glucanase enzyme activity determination. — Введ. 2013-07-01. — Москва: Стандартинформ, 2013. — 12 с.

25. ГОСТ 33402-2015. Определение низкомолекулярной массы полимеров методом гель-проникающей хроматографии. Test methods of chemicals of environmental hazard. Determination of the low molecular weight of a polymer using gel permeation chromatography. — Введ. 2016-01-01. — Москва: Стандартинформ, 2015. — 10 с.

26. Гумерова, Г.Р. Физиологические характеристики трансформированных различными способами культур корней: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.05 / Г.Р. Гумерова. — Уфа, 2018. — С. 9-17.

27. Гэлстон, А. Жизнь зеленого растения / А. Гэлстон, П. Девис, Р. Сэттер. — М.: Мир, 1983. — 550 с.

28. Дмитриюкова, М.Ю. Изучение влияния экспрессии гена леггемоглобина а сои на устойчивость рапса к кадмию с использованием «Бородатых» корней в качестве модельной системы / М.Ю. Дмитриюкова [и др.] // Вестник Башкирского университета. — 2011. — Т. 16, № 3. — С. 698-701. — EDN OOX SAP.

29. Домблидес, Е.А. Получение удвоенных гаплоидов *Cucurbita pepo* L / Е.А. Домблидес, Е.А. Ермолаев, С.Н. Белов // Овощи России. — 2021. — № 4. — С. 11-26. DOI: 10.18619/2072-9146-2021-4-11-26.

30. Дыкман, А.С. Перспективные возможности мирового производства натурального и изопренового каучуков / А.С. Дыкман [и др.] // Экономика и управление. — 2011. — № 10 (72). — С. 46-51. — EDN OJENG D.

31. Егоров, А.М. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам / А.М. Егоров, М.М. Уляшова, М.Ю. Рубцова // Acta Naturae (русскаяязычная версия). — 2018. — Т. 10, № 4 (39). — С. 33-48. — EDN PNXXSH.

32. Жигунов, А.В. Посевные качества семян гевеи бразильской / А.В. Жигунов, В.Т. Нгуен // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. — 2017. — № 221. — С. 162-174. DOI: 10.21266/2079-4304.2017.221.162-174.

33. Инновационный патент №30508 Казахстан: МПК: А01G 7/00, А01Н 4/00, А01G 31/00, С12N 5/04. Способ получения посадочного материала "TKS-1" прототипа сорта кок-сагыза *Taraxacum kok-saghyz*: № 2014/1300.1; заявл. 10.10.2014; опубл. 16.11.2015, бюл. №11. / К.Р. Утеулин, С.К. Мухамбетжанов, И.Р. Рахимбаев; заявитель и патентообладатель Товарищество с ограниченной ответственностью "Bio Tech TKS".

34. Кайбеяйнен, Э.Л. Параметры световой кривой фотосинтеза у *Salix dasyclados* и их изменение в ходе вегетации / Э.Л. Кайбеяйнен // Физиология растений. — 2009. — Т. 56, № 4. — С. 490-499. DOI: 10.1134/S1021443709040025.

35. Каратаева, М.Б. Кок-сагыз: национальное достояние и перспективы промышленного развития / М.Б. Каратаева, С.Б. Мукаев // ҚазЭУ хабаршысы. — 2012. — Т. 3. — С. 44. — ISSN 1991-3494.

36. Келько, А.Ф. Влияние химических мутагенов на всхожесть семян, рост и проявление декоративных признаков в семенном потомстве у представителей рода *Pinus* L / А.Ф. Келько [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. — 2021. — Т. 65, № 6. — С. 708-714. DOI: 10.29235/1561-8323-2021-65-6-708-714.

37. Кирильчик, А.П. Влияние меди на повышение продуктивности кок-сагыза на торфяно-болотных почвах: диссертация кандидата сельскохозяйственных наук / А.П. Кирильчик. — Минск, 1953. — 134 с.

38. Клименко, В.П. Идентификация уровня плоидности растений в селекции винограда / В.П. Клименко, Е.А. Луцай, А.С. Абдурашитова // "Магараç". Виноградарство и виноделие. — 2021. — Т. 23, № 4. — С. 322-329. DOI: 10.35547/IM.2021.23.4.003.

39. Кобелев, В.К. Селекция каучуконосных растений / В.К. Кобелев. — Москва: Сельхозгиз, 1937. — Т. 3. — С. 641-670.

40. Кононова, Т.А. Светодиодные фитоустройства для малообъемного бытового растениеводства / Т.А. Кононова, С.Б. Туранов, В.И. Юрченко // Вопросы развития мировых научных процессов. — 2018. — С. 50-55. — ISBN 978-5-6040063-9-9.

41. Королева, В.А. Внутривидовое разнообразие и его значение для преобразования кок-сагыза в культурное растение / В.А. Королева // Бот. журн. — 1957. — Т. 42, № 3. — С. 414-425.

42. Кошкин, Е.И. Влияние глобальных изменений климата на продуктивность и устойчивость сельскохозяйственных культур к стрессорам / Е.И. Кошкин // Агрохимия. — 2019. — № 12. — С. 83-96. DOI: 10.1134/S0002188119120068.

43. Кощанов, Б.А. Регуляция процессов биосинтеза вторичных метаболитов растений: взаимосвязь между первичным и вторичным метаболизмом растений / Б.А. Кощанов, Г.Ж. Сегизбаева // Сборник материалов международного научного форума «Омаровские чтения: Биология и биотехнология XXI века». — Астана: Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, 2023. — С. 4-7. — EDN MRFHSC.

44. Кулешова, Т.Э. Влияние спектральных особенностей световой среды на поглощение света листьями салата и его нетто-продуктивность / Т.Э. Кулешова [и др.] // Биофизика. — 2020. — Т. 65, № 1. — С. 112-124. DOI: 10.31857/S0006302920010147.

45. Кулешова, Т.Э. Разработка лабораторного фитотрона с возможностью варьирования спектра излучения и длительности суточной экспозиции и его биологическое тестирование / Т.Э. Кулешова [и др.] // Научное приборостроение. — 2016. — Т. 26, № 3. — С. 35-43. — ISSN 0868-5886.

46. Кулуев, Б.Р. Поиск потенциальных каучуконосов во флоре Республики Башкортостан / Б.Р. Кулуев [и др.] // Растительные ресурсы. — 2019. — Т. 55, № 3. — С. 317-333. DOI: 10.1134/S0033994619030105.

47. Кулуев, Б.Р. Гидропонное и аэропонное выращивание одуванчика *Taraxacum kok-saghyz* Rodin / Б.Р. Кулуев, З.А. Бережнева, А.В. Чемерис // Биомика. — 2017. — Т. 9, № 2. — С. 96. — EDN ZHKNYZ.
48. Кулуев, Б.Р. Натуральный каучук, его источники и составные части / Б.Р. Кулуев, Р.Р. Гарафутдинов, И.В. Максимов [и др.] // Биомика. — 2015. — Т. 7, № 4. — С. 224-283. — EDN VKCJGL.
49. Кулуев, Б.Р. Получение культур волосовидных корней кок-сагыза и анализ содержания в них натурального каучука / Б.Р. Кулуев, Г.Р. Гумерова, А.В. Князев [и др.] // Биомика. — 2020. — Т. 12, № 4. — С. 449-454. — EDN USCNS.
50. Куркин, В.А. Фитохимическое исследование надземной части одуванчика лекарственного / В.А. Куркин, А.В. Азнагулова // Химия растительного сырья. — 2017. — № 1. — С. 99-105. DOI: 10.14258/jcprtm.2017011027.
51. Курыжова, Е.А. Факторы жизни растений и законы земледелия / Е.А. Курыжова, Е.П. Кулагин // Перспективы развития сельскохозяйственного производства. — 2015. — С. 33-35. — EDN VMOHAY.
52. Кутузова, С.Н. Кок-сагыз—*Taraxacum kok-saghyz* (Asteraceae, Compositae) — источник ценного растительного сырья для резиновой, пищевой и фармацевтической промышленности / С.Н. Кутузова [и др.] // Биосфера. — 2015. — Т. 7, № 4. — С. 392-402. DOI: 10.24855/biosfera.v7i4.124.
53. Кутузова, С.Н. Морфо-биологическое изучение кок-сагыза из коллекции ВИР / С.Н. Кутузова, И.А. Петросян // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 2011. — Т. 167. — С. 125-132. — EDN UCFAST.
54. Лапин, А.К. Культура каучуконосов / А.К. Лапин // Сельское хозяйство СССР. Ежегодник. — 1935. — С. 65-73.
55. Лебедев, А.П. К морфологической изменчивости листьев у кок-сагыза / А.П. Лебедев // Селекция каучуконосных растений. — 1937. — Т. 1. — С. 28-38.
56. Липшиц, С.Ю. Кок-сагыз / С.Ю. Липшиц // Каучук и каучуконосы. — 1953. — Т. 2. — С. 153-172.

57. Лыгин, С.А. Каучук в жизни человека / С.А. Лыгин, А.В. Звонкова // Наука и образование: новое время. — 2020. — № 5. — С. 1-17. — EDN KHHFRI.
58. Макагон, В.Н. Проблема натурального каучука в СССР / В.Н. Макагон // Каучук и каучуконосы. — М.: АН СССР, 1936. — С. 127-70.
59. Маракаев, О.А. Экологическая физиология растений. Фотосинтез и свет: текст лекций для студентов специальности "Биология" / О.А. Маракаев. — Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 2005. — 95 с. — ISBN 5-8397-0373-7.
60. Мартиросян, Л.Ю. Влияние экзогенного глутатиона на регенерационный потенциал каллусных тканей *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin / Л.Ю. Мартиросян [и др.] // Химическая безопасность. — 2022. — № 1. — С. 198-207. DOI: 10.25514/CHS.2022.1.21014.
61. Мартиросян, Л. Ю. Количественное определение содержания натурального каучука в растениях *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin методом ЭПР спинового зонда / Л. Ю. Мартиросян, В. М. Гольдберг, И. И. Барашкова [и др.] // Биофизика. 2023. — Т. 68. — № 4. — С. 730–735. — DOI: 10.31857/S0006302923040130
62. Мартиросян, Л.Ю. Анализ и математическое моделирование ростовой активности культуры изолированных трансформированных корней *Taraxacum kok-saghyz* и определение содержания в ней целевых веществ (каучука и инулина) / Л.Ю. Мартиросян, Е.Р. Мягкова, В.В. Мартиросян // ББК 28.0 С37. — 2023. — С. 571. DOI: 10.17072/simbioz-2022-581-587.
63. Мартиросян, Л.Ю. Биосинтез каучука и инулина в зависимости от спектрального состава света и активности фотосинтетического аппарата при аэропонном культивировании *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin / Л.Ю. Мартиросян [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 2023. — Т. 58, № 1. — С. 100-113. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.1.100rus.
64. Мартиросян Л. Ю. Агробактериальная трансформация растений *Taraxacum kok-saghyz* методом вакуумной инфильтрации / Л. Ю. Мартиросян, Е. Р. Мягкова // Международная научная конференция молодых ученых и специалистов,

посвященная 135-летию со дня рождения А. Н. Костякова : [сборник статей]. — Москва, 6–8 июня 2022 г. — URL: <https://www.timacad.ru/announcements/mezhdunarodnaia-nauchnaia-konferentsiia-molodykh-uchionykh-i-spetsialistov> (дата обращения: 10.12.2024).

65. Мартиросян Л. Ю., Мартиросян Ю. Ц., Варфоломеев С. Д., Гольдберг В. М.; патентообладатели — ИБХФ РАН, ПАО "Татнефть", ООО "НТЦ Татнефть" / Способ аэропонного выращивания каучуконосного растения кок-сагыз, *Taraxacum kok-saghyz* R. // Патент № 2779988, Российская Федерация, МПК: A01G 31/00 (2006.01), заявл. 29.11.2021, опубл. 02.09.2022. — Текст: непосредственный.

66. Мартиросян, Ю.Ц. Аэропонное культивирование растений-новые источники ферментов / Ю.Ц. Мартиросян [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития. — 2017. — С. 52-54. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.1.100rus.

67. Мартиросян, Ю.Ц. Аэропонные технологии в безвирусном семеноводстве — преимущества и перспективы / Ю.Ц. Мартиросян, А.А. Кособрюхов, В.В. Мартиросян // Достижения науки и техники АПК. — 2016. — Т. 30, № 10. — С. 47-51. — EDN WWRMXX.

68. Мартиросян Ю. Ц., Мартиросян Л. Ю., Мартиросян Д. Ю.; заявитель — Мартиросян Ю. Ц. и др. / Универсальный фитотрон // Патент на полезную модель № 199457, Российская Федерация, МПК: A01G 31/06, заявл. 23.09.2019, опубл. 02.09.2020. — EDN BRAYOT. — Текст: электронный.

69. Мартиросян Ю. Ц., Варфоломеев С. Д., Гольдберг В. М., Мартиросян Л. Ю., Рязанцев Д. М., Миних А. А.; заявители — ИБХФ РАН, ПАО "Татнефть", ООО "НТЦ Татнефть" / Аэропонный фитотрон // Патент на полезную модель № 196013, Российская Федерация, МПК: A01G 31/02 (2006.01), заявл. 25.09.2019, опубл. 13.02.2020. — EDN NKWABH. — Текст: электронный.

70. Маскаева, Т.А. Генотоксичность фитогормонов в тестах *Allium* сера L / Т.А. Маскаева, М.В. Лабутина, Н.Д. Чегодаева // Современные проблемы науки и образования. — 2017. — № 6. — С. 246. — EDN YNXZCB.

71. Медведев, С.С. Физиология растений / С.С. Медведев. — СПб.: БХВ-Петербург, 2013. — 183 с. — ISBN 978-5-9775-0716-5.

72. Моисеева, В.П. О продуктивности форм кок-сагыза, цветущих и не цветущих в первом году вегетации / В.П. Моисеева // Бот. журн. — 1960. — Т. 45, № 8. — С. 1175-1180.

73. Монахос, С.Г. Связь пloidности с числом хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у диплоидных и амфидиплоидных видов *Brassica* / С.Г. Монахос [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 2014. — № 5. — С. 44-54. DOI: 10.15389/agrobiology.2014.5.44rus.

74. Навашин, М.С. Получение полиплоидов из листьев, обработанных колхицином / М.С. Навашин, Е.Н. Герасимова // Доклады Академии Наук СССР. — 1939. — Т. XXIV, № 9. — С. 942-944.

75. Навашин, М.С. Получение тетраплоидов у кок-сагыза и его практическое значение / М.С. Навашин, Е.Н. Герасимова // Докл. АН СССР. — 1941. — Т. 31. — С. 47-50.

76. Насыров, И.Ш. Натуральный и синтетический цис-полиизопрены часть 1. Современное состояние и перспективы развития производства / И.Ш. Насыров [и др.] // Промышленное производство и использование эластомеров. — 2020. — № 2. — С. 34-47. DOI: 10.24411/2071-8268-2020-10206.

77. Ничипорович, А.А. Основные результаты работ ВНИИК и Г по физиологии образования и накопления каучука каучуконосными растениями / А.А. Ничипорович [и др.] // Физиология и анатомия каучуконосов. — М.: Сельхозгиз, 1936. — С. 251.

78. Новиков, В. Ассимиляционная деятельность и каучукообразование у дикорастущего тау-сагыза / В. Новиков [и др.] // Известия Российской академии наук. Серия математическая. — 1933. — № 9. — С. 1353-1381.

79. Павлов, Н.В. Дикие полезные и технические растения СССР / Н.В. Павлов. — Алма-Ата: Казахский гос. университет им. С.М. Кирова и Каз. филиал АН СССР, 1942. — 640 с.

80. Пащенко, В.З. Нефотохимическое тушение флуоресценции в антенных комплексах ФС II катион-радикалом реакционного центра / В.З. Пащенко [и др.] // Биохимия. — 2016. — Т. 81, № 6. — С. 764-773. DOI: 10.1134/S0006297916060043.

81. Поддубная-Арнольди, В. Экспериментально полученные тетраплоиды кок-сагыза / В. Поддубная-Арнольди // Доклады Академии Наук СССР. — 1947. — Т. LVI, № 8. — С. 873-876.

82. Прокофьев, А.А. Анализ каучуконосных растений / А.А. Прокофьев. — М.: Онти. Глав. ред. хим. лит-ры, 1936. — 156 с.

83. Прокофьев, А.А. Локализация, образование и состояние каучука в растениях / А.А. Прокофьев. — М.: АН СССР, 1948. — 304 с.

84. Птушенко, В.В. Электронный парамагнитный резонанс в биологии / В.В. Птушенко // Природа. — 2011. — № 6. — С. 53-59. — EDN OEZAEN.

85. Радкевич, М.В. Проблемы поддержания кислотности растворов для гидропонного выращивания овощей / М.В. Радкевич, Н.В. Мягкова // Молодой ученый. — 2018. — № 48. — С. 356-360. — ISSN 2072-0297.

86. Рахимбаев, И.И. Индукция морфогенетических процессов в культуре тканей каучуконосного растения *Taraxacum kok-saghyz* Rodin [Электронный ресурс] / И.И. Рахимбаев [и др.] // Электронный каталог файлов Центральной Научной библиотеки, 2013. — URL: <http://nblib.library.kz/elib/library.kz/journal/vestnik-01-2013-Iskakova.pdf> (дата обращения: 07.08.2023).

87. Рахимбердиева, Ж.Ш. Молекулярно-генетический анализ растений рода *Artemisia* L. с использованием ISSR-маркеров / Ж.Ш. Рахимбердиева, А.Н. Калиева, Ғ.Д. Медеуова // Қазақстан Республикасы. — 2020. — Т. 119. — С. 40. — ISSN 2224-5227.

88. Рахманкулов, Д.Л. Исторические аспекты использования альтернативных видов углеводородного сырья для производства натурального каучука. Сообщение 2. Исторические аспекты зарождения и развития исследований в области поиска растительного сырья для получения натурального каучука / Д.Л. Рахманкулов, Е.А. Удалова, М.В. Курас // Башкирский химический журнал. — 2006. — Т. 13, № 4. — С. 165-167. — ISSN 0869-8406.

89. Рахманкулова, З.Ф. Физиологические аспекты взаимосвязи фотосинтеза и дыхания / З.Ф. Рахманкулова // Физиология растений. — 2019. — Т. 66, № 3. — С. 178-188. DOI: 10.1134/S0015330319030114.

90. Рогожин, В.В. Биохимия сельскохозяйственной продукции / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина. — СПб.: Гиорд, 2014. — С. 175-176. — ISBN 978-5-98879-162-1.

91. Романова, А.К. Физиолого-биохимические признаки и молекулярные механизмы адаптации растений к повышенной концентрации CO₂ в атмосфере / А.К. Романова // Физиология растений. — 2005. — Т. 52, № 1. — С. 129-145. — EDN HSEYAB.

92. Семенов, В.В. Полиалкоксифлавоноиды-ингибиторы деления клеток / В.В. Семенов, М.Н. Семенова // Успехи химии. — 2015. — Т. 84, № 2. — С. 134-158. DOI: 10.1070/RCR4449.

93. Сербасева, Э.Р. Инулин: природные источники, особенности метаболизма в растениях и практическое применение / Э.Р. Сербасева [и др.] // Биомика. — 2020. — Т. 12, № 1. — С. 57-79. — eISSN 2221-6197.

94. Смирнова, Е.Б. Особенности ценологических отношений в одновидовых и смешанных посевах Донника желтого (*Melilotus officinalis* L.) / Е.Б. Смирнова [и

др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. — 2013. — Т. 15, № 3-2. — С. 793-795. — EDN RVSHTR.

95. Соловьев, А.В. Сравнительная характеристика, терапевтическая и профилактическая эффективность новых противоэндометритных препаратов / А.В. Соловьев, В.В. Петров // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. — 2013. — Т. 49, № 1-1. — С. 64-66. — EDN SDCHWR.

96. Стахорская, Л.К. Влияние условий питания на биохимические показатели кок-сагыза: диссертация ... кандидата педагогических наук: 13.00.00 / Л.К. Стахорская. — Ленинград, 1953. — 152 с.

97. Тихонов, А.Н. Спиновые метки / А.Н. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 1. — С. 8-15.

98. Тихонов, Н.И. Влияние доз и соотношений минеральных удобрений на урожай и каучуконосность кок-сагыза: диссертация кандидата сельскохозяйственных наук / Н.И. Тихонов. — Москва, 1951. — 155 с.

99. Утеулин, К. Болезни *Taraxacum kok-saghyz* / К. Утеулин [и др.] // Казакстан Республикасы. — 2014. — Т. 2224. — С. 52. — ISSN 2224-5227.

100. Утеулин, К.Р. Казахстанские популяции одуванчика кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* LE Rodin) / К.Р. Утеулин // Bulletin of the Karaganda university Biology. Medicine. Geography series. — 2023. — Т. 110, № 2. — С. 151-161. DOI: 10.31489/2023BMG2/151-161.

101. Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет) [Электронный ресурс]. — 2025. — URL: <https://meteoinfo.ru/> (дата обращения: 17.04.2025).

102. Федорова, Ю.Н. Совместное влияние состава питательной среды и света на формирование микрорастений картофеля в условиях *in vitro* / Ю.Н. Федорова, Л.Н. Федорова // Традиции и инновации в развитии АПК. — 2019. — С. 53-59. — EDN EYXABQ.

103. Филиппов, Д.И. Культура кок-сагыза / Д.И. Филиппов // Каучук и каучуконосы. — 1953. — Т. 2. — С. 173-219.

104. Чалдаева, Д.А. Применение натурального и синтетического каучука в шинной промышленности / Д.А. Чалдаева, А.Д. Хусаинов // Вестник Казанского технологического университета. — 2013. — Т. 16, № 11. — С. 195-198. — EDN QIVTSR.

105. Чеботарь, В.К. Эндوفитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В.К. Чеботарь [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 2015. — № 5. — С. 648-654. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.648rus.

106. Черемисинов, Н.А. Патогенная микрофлора кок-сагыза / Н.А. Черемисинов // Ботанические материалы Института споровых растений Главного ботанического сада РСФСР. — 1951. — Т. 7. — С. 155-170. DOI: 10.31111/bmosr/1951.7.155.

107. Чжан, В. Влияние азотных, фосфорных и калийных удобрений на рост и урожайность *Taraxacum kok-saghyz* Rodin / В. Чжан [и др.] // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. — 2023. — Т. 184, № 1. — С. 70-78. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-1-70-78.

108. Abarca, L.F.S. Plant latex, from ecological interests to bioactive chemical resources / L.F.S. Abarca, P.G.L. Klinkhamer, Y.H. Choi // *Planta Medica*. — 2019. — Vol. 85, № 11/12. — P. 856-868. DOI: 10.1055/a-0923-8215.

109. Abdelouhahid, R.A. Open Phytotron: A New IoT Device for Home Gardening 2020 / R.A. Abdelouhahid [et al.] // 5th International Conference on Cloud Computing and Artificial Intelligence: Technologies and Applications (CloudTech). — 2020. — P. 1-8. DOI: 10.1109/CloudTech49835.2020.9365892.

110. Abdul Ghaffar, M.A. Latex agglomeration and coagulation in laticifers of live *Taraxacum kok-saghyz* (rubber dandelion) roots / M.A. Abdul Ghaffar, K. Cornish //

Rubber Chemistry and Technology. — 2024. — Vol. 97, № 2. — P. 133-144. DOI: 10.1017/S1431927616006012.

111. Adichirattle, N. Stress response crosstalk in plants-a review / N. Adichirattle, M. Munir, B. Thomas // Pak. J. Bot. — 2018. — Vol. 56. — P. 5. DOI: 10.30848/PJB2024-5(40).

112. Afshan, N.S. Puccinia subepidermalis sp. nov. and new records of rust fungi from Fairy Meadows, Northern Pakistan / N.S. Afshan [et al.] // Mycotaxon. — 2009. — Vol. 110, № 1. — P. 173-182. DOI: 10.5248/110.173.

113. Ahmed, H.A. Optimal control of environmental conditions affecting lettuce plant growth in a controlled environment with artificial lighting: A review / H.A. Ahmed, T. Yu-Xin, Y. Qi-Chang // South African Journal of Botany. — 2020. — Vol. 130. — P. 75-89. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.12.018.

114. Ainusyifa, F. A Review of Fungal Disease in Hevea brasiliensis (Willd. ex A. Juss.) Mull. Arg.: From Identification to Scientific Investigation for Control Strategies / F. Ainusyifa, R. Lestari, R. Yuniati // Jurnal Penelitian Pendidikan IPA. — 2024. — Vol. 10, № 12. — P. 977-987. DOI: 10.29303/jppipa.v10i12.9388.

115. Akhmetova, A.B. Studies on the root anatomy of rubber producing endemic of Kazakhstan, Taraxacum kok-saghyz L. E. Rodin / A.B. Akhmetova [et al.] // Journal of Animal & Plant Sciences. — 2018. — Vol. 28, № 5. — P. 1400-1403. — EDN VBLZZH.

116. Alhasawi, A. Glycine metabolism and anti-oxidative defence mechanisms in Pseudomonas fluorescens / A. Alhasawi [et al.] // Microbiological research. — 2015. — Vol. 171. — P. 26-31. DOI: 10.1016/j.micres.2014.12.001.

117. Aliyeva-Schnorr, L. A fast air-dry dropping chromosome preparation method suitable for FISH in plants / L. Aliyeva-Schnorr, L. Ma, A. Houben // Journal of Visualized Experiments: JoVE. — 2015. — № 106. DOI: 10.3791/53470.

118. Al-Mayahi, A.M.W. Effect of glutathione (GSH) on Date palm (L.) micropropagation / A.M.W. Al-Mayahi, O.N. Jafar, K.A. Mohsen // *Folia Oecologica*. — 2020. — Vol. 47, № 1. — P. 64-69. DOI: 10.2478/foecol-2020-0008.

119. AlShrouf, A. Hydroponics, aeroponic and aquaponic as compared with conventional farming / A. AlShrouf [et al.] // *American Academic Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*. — 2017. — Vol. 27, № 1. — P. 247-255. — ISSN 2313-4410.

120. Aluko, O.O. Sucrose utilization for improved crop yields: A review article / O.O. Aluko [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — Vol. 22, № 9. — P. 4704. DOI: 10.3390/ijms22094704.

121. Allakhverdiev, S.I. Optimising photosynthesis for environmental fitness / S.I. Allakhverdiev // *Functional Plant Biology*. — 2020. — Vol. 47, № 11. — P. 3-7. DOI: 10.1071/FPv47n11_FO.

122. Ao, G. First Report of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin Root Rot Caused by *Alternaria tenuissima* in Heilongjiang Province, China / G. Ao [et al.] // *Plant Disease*. — 2025. — № ja. DOI: 10.1094/PDIS-12-24-2759-PDN.

123. Appel, T.M. Microbiological and clinical aspects of *Raoultella* spp / T.M. Appel [et al.] // *Frontiers in public health*. — 2021. — Vol. 9. — P. 686789. DOI: 10.3389/fpubh.2021.686789.

124. Arias, M. First genetic linkage map of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin based on AFLP, SSR, COS and EST-SSR markers / M. Arias [et al.] // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6, № 1. — P. 31031. DOI: 10.1038/srep31031.

125. Arias, M. Evaluation of root biomass, rubber and inulin contents in nine *Taraxacum kok-saghyz* Rodin populations / M. Arias, J. Herrero, M. Ricobaraza [et al.] // *Industrial Crops and Products*. — 2016. — Vol. 83. — P. 316-321. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.01.023.

126. Ariyaratne, M. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of inulin biosynthesis in rubber dandelion / M. Ariyaratne [et al.] // *Journal of the American*

Society for Horticultural Science. — 2023. — Vol. 148, № 6. — P. 266-275. DOI: 10.21273/JASHS05311-23.

127. Azadi, S. Natural rubber identification and characterization in *Euphorbia macroclada* / S. Azadi [et al.] // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. — 2020. — Vol. 26, № 10. — P. 2047-2052. DOI: 10.1007/s12298-020-00880-5.

128. Azizan, F.A. Rubber leaf fall phenomenon linked to increased temperature / F.A. Azizan [et al.] // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. — 2023. — Vol. 352. — P. 108531. DOI: 10.1016/j.agee.2023.108531.

129. Bannan, M.W. Tetraploid *Taraxacum kok-saghyz*: I. Characters of the leaves and inflorescences in the parental colchicine-induced generation / M.W. Bannan // *Canadian Journal of Research*. — 1945. — Vol. 23, № 4. — P. 131-143. DOI: 10.1139/cjr45c-01.

130. Barashkova, I.I. EPR Spin Probe Study of Local Mobility at the Shungite/Elastomer Interface / I.I. Barashkova [et al.] // *Applied Magnetic Resonance*. — 2015. — Vol. 46, № 12. — P. 1421-1427. DOI: 10.1007/s00723-015-0709-9.

131. Berggren, I. Deleterious properties of certain rhizosphere bacteria on field pea (*Pisum sativum*) under gnotobiotic and non-sterile conditions / I. Berggren, S. Alström, A.M. Mårtensson // *Applied Soil Ecology*. — 2001. — Vol. 16, № 2. — P. 169-177. DOI: 10.1016/S0929-1393(00)00111-6.

132. Black, L.T. Gravimetric analysis for determining the resin and rubber content of guayule / L.T. Black [et al.] // *Rubber Chemistry and Technology*. — 1983. — Vol. 56, № 2. — P. 367-371. DOI: 10.5254/1.3538132.

133. Boguspaev, K.K. Investigation of Vermicompost Influence on Seed Germination of the Endangered Wild Rubber Species *Scorzonera tau-saghyz* / K.K. Boguspaev [et al.] // *Diversity*. — 2023. — Vol. 15, № 2. — P. 224. DOI: 10.3390/d15020224.

134. Bowler, C. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance / C. Bowler, R. Fluhr // *Trends in plant science*. — 2000. — Vol. 5, № 6. — P. 241-246. DOI: 10.1016/s1360-1385(00)01628-9.

135. Brader, G. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes / G. Brader [et al.] // *Annual Review of Phytopathology*. — 2017. — Vol. 55, № 1. — P. 61-83. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080516-035641.

136. Brenner, D.J. Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation / D.J. Brenner, J.T. Staley, N.R. Krieg // *Bergey's manual® of systematic bacteriology*. — Boston, MA: Springer, 2005. — P. 27-32. DOI: 10.1007/0-387-28021-9_4.

137. Brian, P.W. Effects of antibiotics on plants / P.W. Brian // *Annual Review of Plant Physiology*. — 1957. — Vol. 8, № 1. — P. 413-426. DOI: 10.1146/annurev.pp.08.060157.002213.

138. Buttery, B. Water deficits and flow of latex / B. Buttery // *Soil Water Measurement, Plant Responses, and Breeding for Drought Resistance*. — 2012. — Vol. 4. — P. 233. — eISBN: 9780323152273.

139. Carballo, M. Phytotoxic effects of antibiotics on terrestrial crop plants and wild plants: a systematic review / M. Carballo, A. Rodríguez, A. de La Torre // *Archives of environmental contamination and toxicology*. — 2022. — Vol. 82, № 1. — P. 48-61. DOI: 10.1007/s00244-021-00893-5.

140. Castellón, J. Regulation of initiation and polymer molecular weight of cis-1,4-polyisoprene synthesized in vitro by particles isolated from *Parthenium argentatum* (Gray) / J. Castellón, K. Cornish // *Phytochemistry*. — 1999. — Vol. 51, № 1. — P. 43-51. DOI: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2006.04.010.

141. Cifuentes-Torres, L. Hydroponics with wastewater: a review of trends and opportunities / L. Cifuentes-Torres [et al.] // *Water and Environment Journal*. — 2021. — Vol. 35, № 1. — P. 166-180. DOI: 10.1111/wej.12617.

142. Collins-Silva, J. Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TkSRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism / J. Collins-Silva [et al.] // *Phytochemistry*. — 2012. — Vol. 79. — P. 46-56. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.04.015.

143. Continental. Urban Taraxagum Made of dandelion rubber [Электронный ресурс]. — 2025. — URL: <https://www.continental-tires.com/products/b2c/bicycle/tires/urban-taraxagum/> (дата обращения: 23.04.2025).

144. Cornish, K. Alternative natural rubber crops: why should we care? / K. Cornish // *Technology & Innovation*. — 2017. — Vol. 18, № 4. — P. 244-255. DOI: 10.21300/18.4.2017.245.

145. Cornish, K. Temporal diversity of *Taraxacum kok-saghyz* plants reveals high rubber yield phenotypes / K. Cornish [et al.] // *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. — 2016. — Vol. 17, № 2. — P. 1-10. DOI: 10.13057/biodiv/d170262.

146. Cornish, K. The separate roles of plant cis and trans prenyl transferases in cis-1,4-polyisoprene biosynthesis / K. Cornish // *European Journal of Biochemistry*. — 1993. — Vol. 218, № 1. — P. 267-271. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18374.x.

147. Cornish, K. Rubber molecular weight regulation, in vitro, in plant species that produce high and low molecular weights in vivo / K. Cornish, J. Castellón, D.J. Scott // *Biomacromolecules*. — 2000. — Vol. 1, № 4. — P. 632-641. DOI: 10.1021/bm000034z.

148. Cornish, K. Hydroponic cultivation has high yield potential for TKS / K. Cornish, S. Kopicky, T. Madden // *Rubb. Plast. N.* — 2019. — Vol. 49. — P. 23-25.

149. Cornish, K. Latex quantification in homogenate and purified latex samples from various plant species using near infrared reflectance spectroscopy / K. Cornish, M.D. Myers, S.S. Kelley // *Industrial Crops and Products*. — 2004. — Vol. 19, № 3. — P. 283-296. DOI: 10.1021/bm000034z.

150. Costa-Gutierrez, S.B. *Pseudomonas putida* and its close relatives: mixing and mastering the perfect tune for plants / S.B. Costa-Gutierrez [et al.] // *Applied*

Microbiology and Biotechnology. — 2022. — Vol. 106, № 9. — P. 3351-3367. DOI: 10.1007/s00253-022-11881-7.

151. Chandrasekera, B.S.G. In vitro plant regeneration from ovules of *Taraxacum officinale* and *Taraxacum kok-saghyz* / B.S.G. Chandrasekera [et al.] // African Journal of Biotechnology. — 2017. — Vol. 16, № 34. — P. 1764-1775. DOI: 10.5897/AJB2017.16138.

152. Chen, X. FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles / X. Chen [et al.] // Food Hydrocolloids. — 2013. — Vol. 31, № 2. — P. 435-437. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.017.

153. Chen, Y. Fast determination of the rubber content in *Taraxacum kok-saghyz* fresh biomass using portable near-infrared spectroscopy and pyrolysis–gas chromatography / Y. Chen [et al.] // Journal of Analysis and Testing. — 2022. — Vol. 6, № 4. — P. 393-400. DOI: 10.21203/rs.3.rs-298105/v1.

154. Cherian, S. Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects / S. Cherian, S.B. Ryu, K. Cornish // Plant biotechnology journal. — 2019. — Vol. 17, № 11. — P. 2041-2061. DOI: 10.1111/pbi.13181.

155. Chiaranunt, P. Plant beneficial bacteria and their potential applications in vertical farming systems / P. Chiaranunt, J.F. White // Plants. — 2023. — Vol. 12, № 2. — P. 400. DOI: 10.3390/plants12020400.

156. da Costa, B.M.T. Magnesium ion regulation of in vitro rubber biosynthesis by *Parthenium argentatum* Gray / B.M.T. da Costa [et al.] // Phytochemistry. — 2006. — Vol. 67, № 15. — P. 1621-1628. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.04.010.

157. da Costa, B.M.T. Regulation of rubber biosynthetic rate and molecular weight in *Hevea brasiliensis* by metal cofactor / B.M.T. da Costa, J.D. Keasling, K. Cornish // Biomacromolecules. — 2005. — Vol. 6, № 1. — P. 279-289. DOI: 10.1021/bm049606w.

158. D'Amato, F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates / F. D'Amato, M.W. Bayliss // *Critical Reviews in Plant Sciences*. — 1985. — Vol. 3, № 1. — P. 73-112. DOI: 10.1080/07352688509382204.

159. Davis, M.C. Methods for quantifying rubber content in a plant with NMR: pat. 10578567 USA / M.C. Davis, Y. Huang. — 2020. — P. 1-21.

160. De Fay, E. Anatomical organization of the laticiferous system in the bark / E. De Fay, J.L. Jacob // *Physiology of rubber tree latex*. — CRC Press, 2018. — P. 3-14. — ISBN 9781351075695.

161. del Castillo, T. Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis / T. del Castillo [et al.] // *Journal of bacteriology*. — 2007. — Vol. 189, № 14. — P. 5142-5152. DOI: 10.1128/jb.00203-07.

162. del Castillo, T. A Set of Activators and Repressors Control Peripheral Glucose Pathways in *Pseudomonas putida* To Yield a Common Central Intermediate / T. del Castillo, E. Duque, J.L. Ramos // *Journal of Bacteriology*. — 2008. — Vol. 190, № 7. — P. 2331-2339. DOI: 10.1128/jb.01726-07.

163. del Castillo, T. Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways / T. del Castillo, J.L. Ramos // *Journal of bacteriology*. — 2007. — Vol. 189, № 18. — P. 6602-6610. DOI: 10.1128/jb.00679-07.

164. Doležel, J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants / J. Doležel // *Phytochemical analysis*. — 1991. — Vol. 2, № 4. — P. 143-154. DOI: 10.1002/pca.2800020402.

165. Domblides, E. Efficient Methods for Evaluation on Ploidy Level of *Cucurbita pepo* L. Regenerant Plants Obtained in Unpollinated Ovule Culture In Vitro / E. Domblides [et al.] // *Horticulturae*. — 2022. — Vol. 8, № 11. — P. 1083. DOI: 10.3390/horticulturae8111083.

166. Dos Santos, V.A.P.M. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440 / V.A.P.M. Dos Santos [et al.] // *Environmental microbiology*. — 2004. — Vol. 6, № 12. — P. 1264-1286. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00734.x.

167. Driesen, E. Influence of environmental factors light, CO₂, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review / E. Driesen [et al.] // *Agronomy*. — 2020. — Vol. 10, № 12. — P. 1975. DOI: 10.3390/agronomy10121975.

168. Duque, E. Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440 / E. Duque [et al.] // *Pseudomonas: A model system in biology*. — 2007. — P. 227-251. DOI: 10.1007/978-1-4020-6097-7_8.

169. Eddine Adjerid, H. Development of an electronic system for the control of climatic parameters in a phytotron / H. Eddine Adjerid, Y. Remram, M. Attari // 2020 1st International Conference on Communications, Control Systems and Signal Processing (CCSSP). — IEEE, 2020. — P. 417-421. DOI: 10.1109/CCSSP49278.2020.9151598.

170. Edwards, U. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA / U. Edwards [et al.] // *Nucleic acids research*. — 1989. — Vol. 17, № 19. — P. 7843-7853. DOI: 10.1093/nar/17.19.7843.

171. Eggert, M. Yield performance of wild *Taraxacum kok-saghyz* under different N regimes in the field / M. Eggert [et al.] // *Development of innovative alternative crops for the production of natural rubber*. Book of abstracts. — CIRAD, 2019. — P. 28. DOI: 10.1016/J.EJA.2017.12.003.

172. Eggert, M. Yield performance of Russian dandelion transplants (*Taraxacum koksaghyz* L. Rodin) in flat bed and ridge cultivation with different planting densities / M. Eggert, J. Schiemann, K. Thiele // *European journal of agronomy*. — 2018. — Vol. 93. — P. 126-134. DOI: 10.1016/j.eja.2017.12.003.

173. Ellenberger, J. Effect of UV radiation and salt stress on the accumulation of economically relevant secondary metabolites in bell pepper plants / J. Ellenberger [et al.] // *Agronomy*. — 2020. — Vol. 10, № 1. — P. 142. DOI: 10.3390/agronomy10010142.

174. Eng, W.H. Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review / W.H. Eng, W.S. Ho // *Scientia horticulturae*. — 2019. — Vol. 246. — P. 604-617. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.11.010.

175. Esmaili, M. CO₂ enrichment and increasing light intensity till a threshold level, enhance growth and water use efficiency of lettuce plants in controlled environment / M. Esmaili [et al.] // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. — 2020. — Vol. 48, № 4. — P. 2244-2262. DOI: 10.15835/nbha48411835.

176. Evans, L.T. The role of phytotrons in agricultural research / L.T. Evans // *Climate and rice*. — 1976. — P. 11-27.

177. Fabret, C. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world / C. Fabret, V.A. Feher, J.A. Hoch // *Journal of bacteriology*. — 1999. — Vol. 181, № 7. — P. 1975-1983. DOI: 10.1128/jb.181.7.1975-1983.1999.

178. Fernie, A.R. Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology / A.R. Fernie, L. Willmitzer, R.N. Trethewey // *Trends in plant science*. — 2002. — Vol. 7, № 1. — P. 35-41. DOI: 10.1016/s1360-1385(01)02183-5.

179. Ferreira, M.S. The role of somaclonal variation in plant genetic improvement: A systematic review / M.S. Ferreira [et al.] // *Agronomy*. — 2023. — Vol. 13, № 3. — P. 730. DOI: 10.3390/agronomy13030730.

180. Florence, U. Corynespora leaf fall of *Hevea brasiliensis*: Challenges and prospect / U. Florence [et al.] // *African Journal of Agricultural Research*. — 2018. — Vol. 13, № 40. — P. 2098-2103. DOI: 10.5897/AJAR2018.13352.

181. Fomicheva, M. Spontaneous and chemically induced genome doubling and polyploidization in vegetable crops / M. Fomicheva [et al.] // *Horticulturae*. — 2024. — Vol. 10, № 6. — P. 551. DOI: 10.3390/horticulturae10060551.

182. Fomicheva, M. Mastering DNA content estimation by flow cytometry as an efficient tool for plant breeding and biodiversity research / M. Fomicheva, E. Domblides // *Methods and Protocols*. — 2023. — Vol. 6, № 1. — P. 18. DOI: 10.3390/mps6010018.

183. Fricke, J. Absciscic acid-dependent regulation of small rubber particle protein gene expression in *Taraxacum brevicorniculatum* is mediated by TbbZIP1 / J. Fricke [et al.] // *Plant and cell physiology*. — 2013. — Vol. 54, № 4. — P. 448-464. DOI: 10.1093/pcp/pcs182.

184. Galbraith, D. Best practices in plant cytometry / D. Galbraith [et al.] // *Cytometry Part A*. — 2021. — Vol. 99, № 4. — P. 311-317. DOI: 10.1002/cyto.a.24295.

185. Ganeshan, S. Scaling-up production of plant endophytes in bioreactors: concepts, challenges and perspectives / S. Ganeshan, S.H. Kim, V. Vujanovic // *Bioresources and Bioprocessing*. — 2021. — Vol. 8. — P. 1-16. DOI: 10.1186/s40643-021-00417-y.

186. Gent, D.H. The use and role of predictive systems in disease management / D.H. Gent [et al.] // *Annual review of phytopathology*. — 2013. — Vol. 51, № 1. — P. 267-289. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102356.

187. Ghaffar, M.A.A. New developments in rubber particle biogenesis of rubber-producing species / M.A.A. Ghaffar, K. Cornish // *The Rubber Tree Genome*. — 2020. — P. 153-168. DOI: 10.1007/978-3-030-42258-5_10.

188. Ghaffar, M.A.A. Laticifer and rubber particle ontogeny in *Taraxacum kok-saghyz* (rubber dandelion) roots / M.A.A. Ghaffar, T. Meulia, K. Cornish // *Microscopy and Microanalysis*. — 2016. — Vol. 22, № S3. — P. 1034-1035. DOI: 10.1017/S1431927616006012.

189. Ghosh, H.P. Biosynthesis of starch in spinach chloroplasts / H.P. Ghosh, J. Preiss // *Biochemistry*. — 1965. — Vol. 4, № 7. — P. 1354-1361. — PMID: 14275162.

190. Gibson, K. Exploiting leaf starch synthesis as a transient sink to elevate photosynthesis, plant productivity and yields / K. Gibson [et al.] // *Plant science*. — 2011. — Vol. 181, № 3. — P. 275-281. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.06.001.

191. Glick, B.R. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria / B.R. Glick, D.M. Penrose, J. Li // *Journal of theoretical biology*. — 1998. — Vol. 190, № 1. — P. 63-68. DOI: 10.1006/jtbi.1997.0532.

192. Global Market Insights Inc. Размер и доля рынка инулина, Глобальный анализ 2024–2032 [Электронный ресурс]. — 2024. — URL: <https://www.gminsights.com/ru/industry-analysis/inulin-market> (дата обращения: 17.04.2025).

193. Głowacka, K. Impact of colchicine application during callus induction and shoot regeneration on micropropagation and polyploidisation rates in two *Miscanthus* species / K. Głowacka, S. Jeżowski, Z. Kaczmarek // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. — 2010. — Vol. 46. — P. 161-171. DOI: 10.1007/s11627-010-9282-y.

194. Goldstein, J.L. Regulation of the mevalonate pathway / J.L. Goldstein, M.S. Brown // *Nature*. — 1990. — Vol. 343, № 6257. — P. 425-430. DOI: 10.1038/343425a0.

195. Görke, B. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients / B. Görke, J. Stülke // *Nature Reviews Microbiology*. — 2008. — Vol. 6, № 8. — P. 613-624. DOI: 10.1038/nrmicro1932.

196. Gupta, N. In Vitro Synthetic Polyploidization in Medicinal and Aromatic Plants for Enhanced Phytochemical Efficacy—A Mini-Review / N. Gupta [et al.] // *Agronomy*. — 2024. — Vol. 14, № 8. — P. 2-13. DOI: 10.3390/agronomy14081830.

197. Guyot, J. A review of a century of studies on South American Leaf Blight of the rubber tree / J. Guyot, V. Le Guen // *Plant disease*. — 2018. — Vol. 102, № 6. — P. 1052-1065. DOI: 10.1094/PDIS-04-17-0592-FE.

198. Hansen, D.S. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests / D.S. Hansen [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. — 2004. — Vol. 42, № 8. — P. 3665-3669. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3665-3669.2004.

199. He, M. Comparative chloroplast genome analyses provide new insights into phylogeny of *Taraxacum* and molecular markers for distinguishing rubber producing

dandelions from their weedy relatives in China / M. He [et al.] // *Industrial Crops and Products*. — 2024. — Vol. 207. — P. 117712. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117712.

200. Heim, S. Caoutchouc - A Vital War Reserve / S. Heim // *Plant Breeding and Agrarian Research in Kaiser-Wilhelm-Institutes 1933-1945: Calories, Caoutchouc, Careers*. — Dordrecht : Springer Netherlands, 2008. — P. 97-153. — ISBN 978-1-4020-6717-4.

201. Hirsch, R.L. Peaking of world oil production and its mitigation / R.L. Hirsch, R. Bezdek, R. Wendling // *Driving climate change*. — Amsterdam : Academic Press, 2007. — P. 9-27. DOI: 10.1016/B978-0-12-369495-9.50003-6.

202. Hodgson-Kratky, K. Breeding for Improved Germination Under Water Stress, and Genetic Analyses of Flowering Habit and Male Sterility in Russian Dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*) : master's thesis / K. Hodgson-Kratky. — Guelph : University of Guelph, 2015. — 98 p.

203. Hodgson-Kratky, K.J.M. Harvest date, post-harvest vernalization and regrowth temperature affect flower bud induction in Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*) / K.J.M. Hodgson-Kratky, D.J. Wolyn, J. Strommer // *Canadian Journal of Plant Science*. — 2015. — Vol. 95, № 6. — P. 1221-1228. DOI: 10.4141/cjps-2015-020.

204. Holstein, S.A. Isoprenoids: remarkable diversity of form and function / S.A. Holstein, R.J. Hohl // *Lipids*. — 2004. — Vol. 39, № 4. — P. 293-309. — ISBN 978-1-4020-6717-4.

205. Hostettler, C. Analysis of starch metabolism in chloroplasts / C. Hostettler, K. Kölling, D. Santelia // *Chloroplast Research in Arabidopsis: Methods and Protocols, Volume II*. — New York : Humana Press, 2011. — P. 387-410. DOI: 10.1007/978-1-61779-237-3_21.

206. Hua, J. Modulation of plant immunity by light, circadian rhythm, and temperature / J. Hua // *Current opinion in plant biology*. — 2013. — Vol. 16, № 4. — P. 406-413. DOI: 10.1016/j.pbi.2013.06.017.

207. Hurtado Paez, U.A. Assembly and analysis of differential transcriptome responses of *Hevea brasiliensis* on interaction with *Microcyclus ulei* / U.A. Hurtado Paez, L. Sterck, N. Roux // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10, № 8. — P. e0134837. DOI: 10.1371/journal.pone.0134837.

208. Hussain, M.S. Current approaches toward production of secondary plant metabolites / M.S. Hussain, S. Fareed, S. Ansari // *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. — 2012. — Vol. 4, № 1. — P. 10-20. DOI: 10.4103/0975-7406.92725.

209. Iaffaldano, B. Hybridization potential between the rubber dandelion *Taraxacum kok-saghyz* and common dandelion *Taraxacum officinale* / B. Iaffaldano, J. Cardina, K. Cornish // *Ecosphere*. — 2018. — Vol. 9, № 2. — P. e02115. DOI: 10.1002/ecs2.2115.

210. Iaffaldano, B. CRISPR/Cas9 genome editing of rubber producing dandelion *Taraxacum kok-saghyz* using *Agrobacterium rhizogenes* without selection / B. Iaffaldano, Y. Zhang, K. Cornish // *Industrial Crops and Products*. — 2016. — Vol. 89. — P. 356-362. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.05.029.

211. Ivashchenko, A.A. Floristic analysis of plant communities with the participation of a narrow tien shan endemic, *Taraxacum kok-saghyz* L E Rodin / A.A. Ivashchenko, I.A. Ivasenko, K.T. Abidkulova // *For. Ideas*. — 2021. — Vol. 27. — P. 195-209. EDN: HOBVEH.

212. Janda, T. Interaction of temperature and light in the development of freezing tolerance in plants / T. Janda, I. Majláth, G. Szalai // *Journal of Plant Growth Regulation*. — 2014. — Vol. 33. — P. 460-469. DOI: 10.1007/s00344-013-9381-1.

213. Janeeshma, E. Modulations in chlorophyll a fluorescence based on intensity and spectral variations of light / E. Janeeshma, J.T. Puthur, A. Telesinski // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Vol. 23, № 10. — P. 5599. DOI: 10.3390/ijms23105599.

214. Kamilova, F. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria /

F. Kamilova, L.V. Kravchenko, A.I. Shaposhnikov // Molecular Plant-Microbe Interactions. — 2006. — Vol. 19, № 3. — P. 250-256. DOI: 10.1094/MPMI-19-0250.

215. Karimi, A.A. Inulin content and expression of related genes in different tissues and cell suspension culture of *Taraxacum kok-saghyz* / A.A. Karimi, F.A. Krens, R.G.F. Visser // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant. — 2021. — Vol. 57, № 6. — P. 1009-1017. DOI: 10.1007/s11627-021-10180-6.

216. Keane, P. Factors affecting disease development / P. Keane, A. Kerr // Plant pathogens and plant diseases. — Armidale : University of New England, 1997. — P. 287-298.

217. Keawmuangkham, S. Improvement of recovery and purification method of the rubber from skim natural rubber latex / S. Keawmuangkham, K. Nawamawat, J. Sakdapipanich // Preceeding of the pure and applied chemistry international conference. — 2017. — Vol. 2. — P. 1-6.

218. Khaldari, I. Expression patterns of the genes encoding fructan active enzymes (FAZYs) alongside fructan constituent profiles in chicory (*Cichorium intybus* L.): effects of tissue and genotype variations / I. Khaldari, M. Khodambashi, P. Ehsanzadeh // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. — 2018. — Vol. 27. — P. 453-462. DOI: 10.1007/s13562-018-0454-x.

219. King-Smith, N. Extractable latex yield from *Taraxacum kok-saghyz* roots is enhanced by increasing rubber particle buoyancy / N. King-Smith, T. Lin, T. Schmidt // Industrial Crops and Products. — 2023. — Vol. 206. — P. 117698. DOI: 10.1016/j.indcrop.2023.117698.

220. Kivisaar, M. Narrative of a versatile and adept species *Pseudomonas putida* / M. Kivisaar // Journal of medical microbiology. — 2020. — Vol. 69, № 3. — P. 324-338. DOI: 10.1099/jmm.0.001137.

221. Klimek-Szczykutowicz M. The influence of different wavelengths of LED light on the production of glucosinolates and phenolic compounds and the antioxidant potential in in vitro cultures of *Nasturtium officinale* (watercress) / M. Klimek-

Szczykutowicz [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). - 2022. - Vol. 149, № 1-2. - P. 113-122. - DOI: 10.1007/s11240-021-02148-6.

222. Koramutla M.K. Roles of glutathione in mediating abscisic acid signaling and its regulation of seed dormancy and drought tolerance / M.K. Koramutla, M. Negi, B.T. Ayele // Genes. - 2021. - Vol. 12, № 10. - P. 1620. - DOI: 10.3390/genes12101620.

223. Kremer M. Bacteria employ lysine acetylation of transcriptional regulators to adapt gene expression to cellular metabolism / M. Kremer [et al.] // Nature Communications. - 2024. - Vol. 15, № 1. - P. 1674. - DOI: 10.1038/s41467-024-46039-8.

224. Kreuzberger M. Seasonal pattern of biomass and rubber and inulin of wild Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz* L. Rodin) under experimental field conditions / M. Kreuzberger [et al.] // European Journal of Agronomy. - 2016. - Vol. 80. - P. 66-77. - DOI: 10.1016/j.eja.2016.06.011.

225. Kubica P. Production of verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids in callus, suspension, and bioreactor cultures of *Verbena officinalis* and biological properties of biomass extracts / P. Kubica [et al.] // Molecules. - 2020. - Vol. 25, № 23. - P. 5609. - DOI: 10.3390/molecules25235609.

226. Kunakh V.A. Genome variation in plant somatic cells and factors regulating this process / V.A. Kunakh // Tsitol Genet. - 1980. - Vol. 14, № 1. - P. 73-81.

227. Kurek J. Cytotoxic colchicine alkaloids: from plants to drugs / J. Kurek // Cytotoxicity. - 2018. - Vol. 6, № 45. - P. 10.5772. - DOI: 10.5772/intechopen.72622.

228. Kuzyakov Y. Sources of CO₂ efflux from soil and review of partitioning methods / Y. Kuzyakov // Soil Biology and Biochemistry. - 2006. - Vol. 38, № 3. - P. 425-448. - DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.08.020.

229. Lambers H. Photosynthesis, respiration, and long-distance transport: photosynthesis / H. Lambers [et al.] // Plant Physiological Ecology. - 2019. - P. 11-114. - DOI: 10.1007/978-3-030-29639-1_2.

230. Lange I. Comprehensive assessment of transcriptional regulation facilitates metabolic engineering of isoprenoid accumulation in *Arabidopsis* / I. Lange [et al.] // *Plant Physiology*. - 2015. - Vol. 169, № 3. - P. 1595-1606. - DOI: 10.1104/pp.15.00573.

231. Lastdrager J. Sugar signals and the control of plant growth and development / J. Lastdrager, J. Hanson, S. Smeekeens // *Journal of Experimental Botany*. - 2014. - Vol. 65, № 3. - P. 799-807. - DOI: 10.1093/jxb/ert474.

232. Lee Y.S. Assessing the genetic and chemical diversity of *Taraxacum* species in the Korean Peninsula / Y.S. Lee, J. Kim, S. Woo [et al.] // *Phytochemistry*. - 2021. - Vol. 181. - P. 112576. - DOI: 10.1016/j.phytochem.2020.112576.

233. Leisner C.P. Crosstalk and trade-offs: plant responses to climate change-associated abiotic and biotic stresses / C.P. Leisner, N. Potnis, A. Sanz-Saez // *Plant, Cell & Environment*. - 2023. - Vol. 46, № 10. - P. 2946-2963. - DOI: 10.1111/pce.14532.

234. Levitt J. A method of increasing the rate of seed germination of *Taraxacum kok-saghyz* / J. Levitt, P.C. Hamm // *Plant Physiology*. - 1943. - Vol. 18, № 2. - P. 288. - DOI: 10.1002/j.1537-2197.1945.tb05153.x.

235. Liang P.H. Structure, mechanism and function of prenyltransferases / P.H. Liang, T.P. Ko, A.H.J. Wang // *European Journal of Biochemistry*. - 2002. - Vol. 269, № 14. - P. 3339-3354. - DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03014.x.

236. Lieberei R. Physiological characteristics of *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. ARX. - a fungal pathogen of the cyanogenic host *Hevea brasiliensis* / R. Lieberei // *Journal of Applied Botany and Food Quality*. - 2012. - Vol. 80, № 1. - P. 63-68. - Corpus ID: 54537122.

237. Lim C.H. Near infrared spectroscopy as an alternative method for rapid evaluation of toluene swell of natural rubber latex and its products / C.H. Lim, P. Sirisomboon // *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. - 2018. - Vol. 26, № 3. - P. 159-168. - DOI: 10.1177/0967033518783269.

238. Liu F. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities / F. Liu [et al.] // *Environmental Pollution*. - 2009. - Vol. 157, № 5. - P. 1636-1642. - DOI: 10.1016/j.envpol.2008.12.021.

239. Liu J. The chromosome-based rubber tree genome provides new insights into spurge genome evolution and rubber biosynthesis / J. Liu [et al.] // *Molecular Plant*. - 2020. - Vol. 13, № 2. - P. 336-350. - DOI: 10.1016/j.molp.2019.10.017.

240. Liu S. Extraction process and characterization of *Taraxacum kok-saghyz* (TKS) latex / S. Liu [et al.] // *Heliyon*. - 2024. - Vol. 10, № 4. - P. 2-22. - DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e25351.

241. Lobo, A.K.M. Exogenous sucrose supply changes sugar metabolism and reduces photosynthesis of sugarcane through the down-regulation of Rubisco abundance and activity / A.K.M. Lobo, M.F. Martins, M.L.C. Carelli // *Journal of Plant Physiology*. — 2015. — Vol. 179. — P. 113-121. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.03.007.

242. Luo, Z. Colchicine-induced polyploidy has the potential to improve rubber yield in *Taraxacum kok-saghyz* / Z. Luo, B.J. Iaffaldano, K. Cornish // *Industrial Crops and Products*. — 2018. — Vol. 112. — P. 75-81. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.11.010.

243. Luo, Z. Polyploidy induced by colchicine in *Taraxacum kok-saghyz* and its effects on morphological and biochemical traits / Z. Luo, B.J. Iaffaldano, K. Cornish. — 2017. — P. 2-22. Corpus ID: 201918326.

244. March, P.E. Membrane-associated GTPases in bacteria / P.E. March // *Molecular Microbiology*. — 1992. — Vol. 6, № 10. — P. 1253-1257. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00845.x.

245. Martinez, M.E. Effect of the carbon source and plant growth regulators (PGRs) in the induction and maintenance of an in vitro callus culture of *Taraxacum officinale* (L) Weber Ex FH Wigg / M.E. Martinez, J. Jorquera, R. Castillo // *Agronomy*. — 2021. — Vol. 11, № 6. — P. 1181. DOI: 10.3390/agronomy11061181.

246. Martínez-García, E. *Pseudomonas putida* as a synthetic biology chassis and a metabolic engineering platform / E. Martínez-García, V. de Lorenzo // *Current Opinion in Biotechnology*. — 2024. — Vol. 85. — P. 103025. DOI: 10.1016/j.copbio.2023.103025.

247. Mazzocco, A. Enumeration of bacteriophages by the direct plating plaque assay / A. Mazzocco, T.E. Waddell, E. Lingohr // *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. — New York : Humana Press, 2009. — P. 77-80. DOI: 10.1007/978-1-60327-164-6_8.

248. McAssey, E.V. Population genetics of the rubber-producing Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*) / E.V. McAssey, J. Corbi, J.M. Burke // *PLoS One*. — 2016. — Vol. 11, № 1. — P. e0146417. DOI: 10.1371/journal.pone.0146417.

249. McCleary, B.V. Measurement of available carbohydrates in cereal and cereal products, dairy products, vegetables, fruit, and related food products and animal feeds: First action 2020.07 / B.V. McCleary, C. McLoughlin // *Journal of AOAC International*. — 2021. — Vol. 104, № 6. — P. 1465-1478. DOI: 10.1093/jaoacint/qsab019.

250. Mengistu, A.A. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism / A.A. Mengistu // *International Journal of Microbiology*. — 2020. — Vol. 2020. — P. 6927219. DOI: 10.1155/2020/6927219.

251. Mir, M.A. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale* / M.A. Mir, S.S. Sawhney, M.M.S. Jassal // *Wudpecker Journal of Pharmacy and Pharmacology*. — 2013. — Vol. 2, № 1. — P. 1-5.

252. Miyamoto, K. (ed.). *Renewable biological systems for alternative sustainable energy production*. — Rome : Food & Agriculture Organization, 1997. — 128 p. — (FAO Agricultural Services Bulletin). — ISBN 92-5-104059-1.

253. Miziorko, H.M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis / H.M. Miziorko // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 2011. — Vol. 505, № 2. — P. 131-143. DOI: 10.1016/j.abb.2010.09.028.

254. Mooibroek, H. Alternative sources of natural rubber / H. Mooibroek, K. Cornish // *Applied Microbiology and Biotechnology*. — 2000. — Vol. 53, № 4. — P. 355-365. DOI: 10.1007/s002530051627.

255. Moore, C.E. The effect of increasing temperature on crop photosynthesis: from enzymes to ecosystems / C.E. Moore, K. Meacham-Hensold, P. Lemonnier // *Journal of Experimental Botany*. — 2021. — Vol. 72, № 8. — P. 2822-2844. DOI: 10.1093/jxb/erab090.

256. Morales, F. Photosynthetic metabolism under stressful growth conditions as a bases for crop breeding and yield improvement / F. Morales, A. Ancín, H. Fakhret // *Plants*. — 2020. — Vol. 9, № 1. — P. 88. DOI: 10.3390/plants9010088.

257. Morison, J.I.L. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth / J.I.L. Morison, D.W. Lawlor // *Plant, Cell & Environment*. — 1999. — Vol. 22, № 6. — P. 659-682. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1999.00443.x.

258. Mortier, V. Never too many? How legumes control nodule numbers / V. Mortier, M. Holsters, S. Goormachtig // *Plant, Cell & Environment*. — 2012. — Vol. 35, № 2. — P. 245-258. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02406.x.

259. Moussavi, A. Establishing field stands of Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*) from seed in southern Ontario, Canada / A. Moussavi, S. Osborne, D. Llewellyn // *Canadian Journal of Plant Science*. — 2016. — Vol. 96, № 5. — P. 887-894. DOI: 10.1139/cjps-2015-0307.

260. Muhammed, R.A. In vitro micropropagation of *Taraxacum officinale* medicinal plant by direct and indirect organogenesis / R.A. Muhammed, D.S. Hassawi, N.K. Ibraheem // *Journal of Biological Sciences*. — 2018. — Vol. 18, № 2. — P. 2273-2284. ISSN: 0972-5210.

261. Munt, O. Fertilizer and planting strategies to increase biomass and improve root morphology in the natural rubber producer *Taraxacum brevicorniculatum* / O. Munt, K. Drossopoulos, A. Krokida // *Industrial Crops and Products*. — 2012. — Vol. 36, № 1. — P. 289-293. DOI: 10.1016/j.indcrop.2011.10.014.

262. Mutalkhanov, M. Determination of the correlation between the accumulation of pigments and natural rubber in Tau-saghyz / M. Mutalkhanov, A. Turasheva, A. Alibekov // *International Journal of Biology & Chemistry*. — 2021. — Vol. 14, № 2. — P. 12-20. DOI: 10.26577/ijbch.2021.v14.i2.02.

263. Nair, K.P. Rubber (*Hevea brasiliensis*) / K.P. Nair // *Tree Crops: Harvesting Cash from the World's Important Cash Crops*. — Cham : Springer, 2021. — P. 287-332. — ISBN 978-3-030-62139-1.

264. Nandiyanto, A.B.D. How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material / A.B.D. Nandiyanto, R. Oktiani, R. Ragadhita // *Indonesian Journal of Science and Technology*. — 2019. — Vol. 4, № 1. — P. 97-118. DOI: 10.17509/ijost.v4i1.15806.

265. Narayanan, C. Juvenile growth, rubber yield and putative tolerance to foliar diseases in interspecific hybrids and half-sibs of Para rubber tree (*Hevea* spp.) / C. Narayanan, J. Madhavan // *Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka*. — 2021. — Vol. 101. — P. 1-10. DOI: 10.4038/jrrisl.v101i0.1901.

266. Ngezahayo, F. Somaclonal variations and their applications in medicinal plant improvement / F. Ngezahayo // *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization* / ed. by N. Kumar. — Singapore : Springer, 2018. — P. 503-519. DOI: 10.1007/978-981-13-0535-1_23.

267. Nikel, P.I. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism / P.I. Nikel, V. de Lorenzo // *Metabolic Engineering*. — 2018. — Vol. 50. — P. 142-155. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.005.

268. Nomura, K. Reduced glutathione promotes callus growth and shoot development in a shoot tip culture of apple root stock M26 / K. Nomura, A. Komamine // *Plant Cell Reports*. — 1998. — Vol. 17. — P. 597-600. DOI: 10.1007/s002990050449.

269. Panara, F. Comparative transcriptomics between high and low rubber producing *Taraxacum kok-saghyz* R. plants / F. Panara, L. Lopez, L. Daddiego // *BMC Genomics*. — 2018. — Vol. 19, № 1. — P. 1-14. DOI: 10.1186/s12864-018-5287-4.

270. Pandit, M.A. Major biological control strategies for plant pathogens / M.A. Pandit, J. Kumar, S. Gulati // *Pathogens*. — 2022. — Vol. 11, № 2. — P. 273. DOI: 10.3390/pathogens11020273.

271. Parkinson, J.S. Communication modules in bacterial signaling proteins / J.S. Parkinson, E.C. Kofoed // *Annual Review of Genetics*. — 1992. — Vol. 26. — P. 71-112. DOI: 10.1146/annurev.ge.26.120192.000443.

272. Patterson, D.T. Phenotypic and physiological comparisons of field and phytotron grown plants / D.T. Patterson // *Crop Reactions to Water and Temperature Stresses in Humid, Temperate Climates* / ed. by C.D. Raper Jr., P.J. Kramer. — Boca Raton : CRC Press, 2019. — P. 299-314. — ISBN 978-0-367-16908-4.

273. Pearson, C.H. Extraction of natural rubber and resin from guayule using an accelerated solvent extractor / C.H. Pearson, K. Cornish, D.J. Rath // *Industrial Crops and Products*. — 2013. — Vol. 43. — P. 506-510. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.06.052.

274. Peng, C. An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin (Russian dandelion) / C. Peng, X. Zhang, J. Wang // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. — 2023. — P. 1-11. DOI: 10.1007/s11627-023-10352-6.

275. Phillips, R.L. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls / R.L. Phillips, S.M. Kaeppler, P. Olhoft // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1994. — Vol. 91, № 12. — P. 5222-5226. DOI: 10.1073/pnas.91.12.5222.

276. Premachandra, D. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth / D. Premachandra, L. Hudek, L. Brau // *Journal of Biotechnology & Biomaterials*. — 2016. — Vol. 6, № 3. — P. 236. DOI: 10.4172/2155-952X.1000236.

277. Prioul, J.L. Partitioning of transfer and carboxylation components of intracellular resistance to photosynthetic CO₂ fixation: a critical analysis of the methods used / J.L. Prioul, P. Chartier // *Annals of Botany*. — 1977. — Vol. 41, № 4. — P. 789-800. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a085354.

278. Priyadarshan, P.M. Breeding hevea rubber: formal and molecular genetics / P.M. Priyadarshan, A. Clément-Demange // *Advances in Genetics*. — 2004. — Vol. 52. — P. 51-116. DOI: 10.1016/S0065-2660(04)52003-5.

279. Priyadarshan, P.M. Latex production, diagnosis and harvest / P.M. Priyadarshan // *Biology of Hevea Rubber*. — Cham : Springer, 2017. — P. 51-82. DOI: 10.1007/978-3-319-54506-6_5.

280. Puskas, J.E. Natural rubber biosynthesis — a living carbocationic polymerization? / J.E. Puskas [et al.] // *Progress in Polymer Science*. — 2006. — Vol. 31, No. 6. — P. 533-548. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.05.002.

281. Rakhmankulova, Z.F. Effect of Elevated CO₂ and Temperature on Plants with Different Type of Photosynthesis: Quinoa (C₃) and Amaranth (C₄) / Z.F. Rakhmankulova [et al.] // *Russian Journal of Plant Physiology*. — 2023. — Vol. 70, No. 6. — P. 117. DOI: 10.31857/S0015330323600353.

282. Ramos, J.L. Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida* / J.L. Ramos [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2015. — Vol. 39, No. 4. — P. 555-566. DOI: 10.1093/femsre/fuv006.

283. Ramos, M.V. Laticifers, latex, and their role in plant defense / M.V. Ramos, D. Demarco, I.C.C. Souza [et al.] // *Trends in Plant Science*. — 2019. — Vol. 24, No. 6. — P. 553-567. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.03.006.

284. Rauf, S. Induced polyploidy: A tool for forage species improvement / S. Rauf [et al.] // *Agriculture*. — 2021. — Vol. 11, No. 3. — P. 210. DOI: 10.3390/agriculture11030210.

285. Reed, M.L.E. Plant growth-promoting bacteria facilitate the growth of the common reed *Phragmites australis* in the presence of copper or polycyclic aromatic hydrocarbons / M.L.E. Reed, B.G. Warner, B.R. Glick // *Current Microbiology*. — 2005. — Vol. 51. — P. 425-429. DOI: 10.1007/s00284-005-4584-8.

286. Regalado, J.J. Study of the somaclonal variation produced by different methods of polyploidization in *Asparagus officinalis* L / J.J. Regalado [et al.] // *Plant Cell*,

Tissue and Organ Culture (PCTOC). — 2015. — Vol. 122. — P. 31-44. DOI: 10.1007/s11240-015-0747-x.

287. Ren, H.L. First Report of a Rust Disease Caused by *Puccinia hieracii* on *Taraxacum kok-saghyz* in China / H.L. Ren [et al.] // *Plant Disease*. — 2021. — Vol. 105, No. 1. — P. 229. DOI: 10.1094/PDIS-06-20-1294-PDN.

288. Repac Antić, D. Chelation in antibacterial drugs: From nitroxoline to cefiderocol and beyond / D. Repac Antić [et al.] // *Antibiotics*. — 2022. — Vol. 11, No. 8. — P. 1105. DOI: 10.3390/antibiotics11081105.

289. Rodgers, B. The science of rubber compounding / B. Rodgers, W. Waddell // *Science and Technology of Rubber*. — 2005. — P. 401-454. DOI: 10.1016/B978-012464786-2/50012-2.

290. Rogowska, A. Enhancement of phytosterol and triterpenoid production in plant hairy root cultures-simultaneous stimulation or competition? / A. Rogowska, A. Szakiel // *Plants*. — 2021. — Vol. 10, No. 10. — P. 2028. DOI: 10.3390/plants10102028.

291. Rombouts, S. Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri* / S. Rombouts [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — Vol. 7. — P. 279. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00279.

292. Ruan, Y.L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling / Y.L. Ruan // *Annual Review of Plant Biology*. — 2014. — Vol. 65, No. 1. — P. 33-67. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040251.

293. Saba, B. Rubber accumulation and rubber transferase activity during root development of *Taraxacum kok-saghyz* dandelion / B. Saba [et al.] // *Discover Plants*. — 2025. — Vol. 2, No. 1. — P. 2. DOI: 10.21203/rs.3.rs-5132399/v1.

294. Salehi, M. Rubber and latex extraction processes for *Taraxacum kok-saghyz* / M. Salehi [et al.] // *Industrial Crops and Products*. — 2022. — Vol. 178. — P. 114562. DOI: 10.1016/j.indcrop.2022.114562.

295. Salehi M., Cornish K., Bahmankar M. et al. Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of *Taraxacum kok-saghyz* // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 170. – P. 113667. – DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.113667
296. Salgotra R. K., Chauhan B. S. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources // *Genes*. – 2023. – Vol. 14. – №. 1. – P. 174. – DOI: 10.3390/genes14010174
297. Salvucci M. E., Coffelt T. A., Cornish K. Improved methods for extraction and quantification of resin and rubber from guayule // *Industrial Crops and Products*. – 2009. – Vol. 30. – №. 1. – P. 9–16. – DOI: 10.1016/j.indcrop.2008.12.006
298. Salvucci M. E., Crafts-Brandner S. J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis // *Physiologia plantarum*. – 2004. – Vol. 120. – №. 2. – P. 179–186. – DOI: 10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x
299. Sarkar P., Bhowmick A. K. Sustainable rubbers and rubber additives // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2018. – Vol. 135. – №. 24. – P. 45701. – DOI: 10.1002/APP.45701
300. Schicklberger M. et al. Draft genome sequence of *Raoultella terrigena* R1Gly, a diazotrophic endophyte // *Genome announcements*. – 2015. – Vol. 3. – №. 3. – P. 1-2. – DOI:10.1128/genomea.00607-15.
301. Schmidt T. et al. Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum kok-saghyz* // *BMC biochemistry*. – 2010. – Vol. 11. – P. 1-11. – DOI:10.1186/1471-2091-11-11
302. Sekar N., Ramasamy R. P. Recent advances in photosynthetic energy conversion // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. – 2015. – Vol. 22. – P. 19–33. – DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2014.09.004

303. Sękowska A. The many faces of *Raoultella* spp //Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej. – 2019. – Vol. 73. – P. 713–720. – DOI: 10.5604/01.3001.0013.6377
304. Setianto W. B. et al. Characterization of natural rubber, styrene butadiene rubber, and nitrile butadiene rubber monomer blend composites loaded with zinc stearate to be used in the solid tire industry //Applied Sciences. – 2023. – Vol. 13. – №. 3. – P. 1277. – DOI:10.3390/app13031277
305. Shah D. A. et al. An auxin secreting *Pseudomonas putida* rhizobacterial strain that negatively impacts water-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* //Rhizosphere. – 2017. – Vol. 3. – P. 16–19. – DOI: 10.1016/j.rhisph.2016.11.002
306. Shah I. H. et al. Exploring the role of nitrogen and potassium in photosynthesis implications for sugar: Accumulation and translocation in horticultural crops //Scientia Horticulturae. – 2024. – Vol. 327. – P. 112832. – DOI: 10.1016/j.scienta.2023.112832
307. Siano D. et al. Application of near infrared spectroscopy for quality evaluation in Para rubber industry //IOP conference series: Materials science and engineering. – IOP Publishing. – 2022. – Vol. 1234. – №. 1. – P. 012037. – DOI: 10.1088/1757-899X/1234/1/012037
308. Singh A., Malhotra S., Subban R. Phcog Rev.: Plant review dandelion (*Taraxacum officinale*)-hepatoprotective herb with therapeutic potential //Pharmacognosy Reviews. – 2008. – Vol. 2. – №. 3. – P. 5.
309. Skillman J. B. et al. Photosynthetic productivity: can plants do better //Thermodynamics–systems in equilibrium and non-equilibrium. – 2011. – P. 35–68. – DOI: 10.5772/20192
310. Spalholz H., Hernández R. Transplant lettuce response to different blue: red photon flux ratios in indoor LED sole-source lighting production //International Symposium on New Technologies for Environment Control, Energy-Saving and Crop

Production in Greenhouse and Plant 1227. – 2017. – P. 555–562. – DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1227.70

311. Spano D. et al. Extraction and characterization of a natural rubber from *Euphorbia characias* latex //Biopolymers. – 2012. – Vol. 589–594. – №. 8. – P. 97. – DOI: 10.1002/bip.22044

312. Stock J. B., Ninfa A. J., Stock A. M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria //Microbiological reviews. – 1989. – Vol. 53. – №. 4. – P. 450–490. – DOI: 10.1128/mr.53.4.450-490.1989

313. Stolze A. et al. Development of rubber-enriched dandelion varieties by metabolic engineering of the inulin pathway //Plant biotechnology journal. – 2017. – Vol. 15. – №. 6. – P. 740–753. – DOI: 10.1111/pbi.12672

314. Sysoeva M. I., Markovskaya E. F., Shibaeva T. G. Plants under continuous light: a review //Plant stress. – 2010. – Vol. 4. – №. 1. – P. 5–17.

315. Tanaka Y. Structure and biosynthesis mechanism of natural polyisoprene //Progress in Polymer Science. – 1989. – Vol. 14. – №. 3. – P. 339–371. – DOI: 10.5254/1.3538125

316. Taurines M. et al. Determination of natural rubber and resin content of guayule fresh biomass by near infrared spectroscopy //Industrial Crops and Products. – 2019. – Vol. 134. – P. 177–184. – DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.03.073

317. Thorn A. D., Robinson R. A. Commercially available rubbers //Rubber Products Manufacturing Technology. – 2018. – P. 1. – DOI: 10.1201/9780203740378

318. Torabi M., Mokhtarzadeh A., Mahlooji M. The role of hydroponics technique as a standard methodology in various aspects of plant biology researches //Hydroponics—a standard methodology for plant biological researches. InTech. – 2012. – P. 113–134. – DOI: 10.5772/36612

319. Tripodi P. et al. Sensing technologies for precision phenotyping in vegetable crops: current status and future challenges //Agronomy. – 2018. – Vol. 8. – №. 4. – P. 57.

320. Uddin M. A. et al. Recent progress in EPR study of spin labeled polymers and spin probed polymer systems // *Journal of Polymer Science*. – 2020. – Vol. 58. – №. 14. – P. 1924–1948. – DOI:10.1002/pol.20200039

321. Uteulin K. R. Clone Selection of Kok-Saghyz (*Taraxacum kok-saghyz*), A Source of Natural Rubber // *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. – 2021. – P. 509–515.

322. Uteulin K. R. et al. Table of contents and localization of rubber in the roots of kok-saghyz (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) // *Научный журнал «Доклады НАН РК»*. – 2020. – №. 6. – P. 42–48.

323. Uteulin K. R. Reintroduction of Kok-saghyz (*Taraxacum Kok-saghyz* L. Rodin) // *Revista Geintec-Gestao Inovacao E Tecnologias*. – 2021. – Vol. 11. – №. 2. – P. 240–249. – DOI: 10.47059/revistageintec.v11i2.1657

324. Uteulin K., Suleimenov B., Pachikin K. The Soils of Natural (In Situ) Coenopopulations of *Taraxacum kok-saghyz* LE Rodin in Kazakhstan // *Agronomy*. – 2023. – Vol. 13. – №. 11. – P. 2737. – DOI: 10.3390/agronomy13112737

325. Uteulin K. et al. Introduction to in vitro culture of isolated *Taraxacum kok-saghyz* roots // *Введение в культуру in vitro изолированных корней Taraxacum kok-saghyz* // *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. – 2015. – Т. 65. – №. 3. – С. 364–367. – ISSN: 1563-0218

326. Vági, P. Structure of plants and fungi / P. Vági [et al.] // *Eötvös Loránd University*. — 2013. — P. 1–109.

327. Van Beilen, J.B. Guayule and Russian dandelion as alternative sources of natural rubber / J.B. Van Beilen, Y. Poirier // *Critical Reviews in Biotechnology*. — 2007. — Vol. 27, No. 4. — P. 217–231. — DOI: 10.1080/07388550701775927.

328. Vanderwall, M. HEXOKINASE1 and glucose-6-phosphate fuel plant growth and development / M. Vanderwall, J.M. Gendron // *Development*. — 2023. — Vol. 150, No. 20. — P. dev202346. — DOI: 10.1242/dev.202346.

329. Velázquez, F. Genetic evidence that catabolites of the Entner-Doudoroff pathway signal C source repression of the σ^{54} Pu promoter of *Pseudomonas putida* / F. Velázquez, I. Di Bartolo, V. De Lorenzo // *Journal of Bacteriology*. — 2004. — Vol. 186, No. 24. — P. 8267–8275. — DOI: 10.1128/jb.186.24.8267-8275.2004.

330. Verbitskaya, A.A. The creation of a *Taraxacum kok-saghyz* high frequency regeneration system / A.A. Verbitskaya [et al.] // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. — 2021. — Vol. 843, No. 1. — P. 012041. — DOI: 10.1088/1755-1315/843/1/012041.

331. Vorob'ev, V.N. The effect of lanthanides on the accumulation of rubber (1, 4-Cis-polyisoprene) in Dandelion Crimean-Sagyz (*Taraxacum hybernum*) Under adverse climate, and its environmental consequences / V.N. Vorob'ev [et al.] // *Caspian Journal of Environmental Sciences*. — 2020. — Vol. 18, No. 5. — P. 397–404. — DOI: 10.22124/CJES.2020.4464.

332. Wahler, D. Proteomic analysis of latex from the rubber-producing plant *Taraxacum brevicorniculatum* / D. Wahler [et al.] // *Proteomics*. — 2012. — Vol. 12, No. 6. — P. 901–905. — DOI: 10.1002/pmic.201000778.

333. Wang, L. Genome-Wide Identification of the Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase (GGPS) Gene Family Associated with Natural Rubber Synthesis in *Taraxacum kok-saghyz* L. Rodin / L. Wang [et al.] // *Plants*. — 2024. — Vol. 13, No. 19. — P. 2788. — DOI: 10.3390/plants13192788.

334. Warmke, H.E. Experimental polyploidy and rubber content in *Taraxacum kok-saghyz* / H.E. Warmke // *Botanical Gazette*. — 1945. — Vol. 106, No. 3. — P. 316–324. — DOI: 10.1086/335301.

335. Warmke, H.E. Macrosporogenesis, fertilization, and early embryology of *Taraxacum kok-saghyz* / H.E. Warmke // *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. — 1943. — P. 164–173. — DOI: 10.2307/2481367.

336. Whited, G.M. Technology update: development of a gas-phase bioprocess for isoprene-monomer production using metabolic pathway engineering / G.M. Whited

[et al.] // *Industrial Biotechnology*. — 2010. — Vol. 6, No. 3. — P. 152–163. — DOI: 10.1089/ind.2010.6.152.

337. Wilhelm, C. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: the physiological limits of improved photosynthesis / C. Wilhelm, D. Selmar // *Journal of Plant Physiology*. — 2011. — Vol. 168, No. 2. — P. 79–87. — DOI: 10.1016/j.jplph.2010.07.012.

338. Wollenweber, T.E. Microscopic and transcriptomic analysis of pollination processes in self-incompatible *Taraxacum koksaghyz* / T.E. Wollenweber [et al.] // *Plants*. — 2021. — Vol. 10, No. 3. — P. 555. — DOI: 10.3390/plants10030555.

339. Xin, S. Comparative analysis of latex transcriptomes reveals the potential mechanisms underlying rubber molecular weight variations between the *Hevea brasiliensis* clones RRIM600 and Reyan7-33-97 / S. Xin [et al.] // *BMC Plant Biology*. — 2021. — Vol. 21, No. 1. — P. 244. — DOI: 10.1186/s12870-021-03022-5.

340. Xue, S. A new strategy for smoking cessation: characterization of a bacterial enzyme for the degradation of nicotine / S. Xue, J.E. Schlosburg, K.D. Janda // *Journal of the American Chemical Society*. — 2015. — Vol. 137, No. 32. — P. 10136–10139. — DOI: 10.1021/jacs.5b06605.

341. Yamamoto, S. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes / S. Yamamoto [et al.] // *Microbiology*. — 2000. — Vol. 146, No. 10. — P. 2385–2394. — DOI: 10.1099/00221287-146-10-2385.

342. Yamamoto, S. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes / S. Yamamoto, S. Harayama // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 1998. — Vol. 48, No. 3. — P. 813–819. — DOI: 10.1099/00207713-48-3-813.

343. Yamashita, S. Molecular mechanisms of natural rubber biosynthesis / S. Yamashita, S. Takahashi // *Annual Review of Biochemistry*. — 2020. — Vol. 89, No. 1. — P. 821–851. — DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111107.

344. Yang Y. Construction of the first high-density SNP genetic map and identification of QTLs for the natural rubber content in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin / Y. Yang [et al.] // *BMC Genomics*. - 2023. - Vol. 24, № 1. - P. 13. - DOI: 10.1186/s12864-022-09105-3.

345. Yang, Y. Comparative full-length transcriptome analysis provides novel insights into the regulatory mechanism of natural rubber biosynthesis in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin roots / Y. Yang, B. Qin, Q. Chen [et al.] // *Industrial Crops and Products*. — 2022. — Vol. 175. — P. 114278. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114278.

346. Yokozawa, T. Chain-growth polycondensation for well-defined condensation polymers and polymer architecture / T. Yokozawa, A. Yokoyama // *The Chemical Record*. — 2005. — Vol. 5, No. 1. — P. 47–57. — DOI: 10.1002/tcr.20032.

347. Yuan, B. Comparison of morphological characteristics and determination of different patterns for rubber particles in dandelion and different rubber grass varieties / B. Yuan [et al.] // *Plants*. — 2020. — Vol. 9, No. 11. — P. 1561. — DOI: 10.3390/plants9111561.

348. Zakharchenko, N.S. Effect of Photoluminophore Light-Correcting Coatings and Bacterization by Associative Microorganisms on the Growth and Productivity of *Brassica juncea* L. Plants / N.S. Zakharchenko [et al.] // *Microbiology Research*. — 2024. — Vol. 15, No. 4. — P. 1957–1972. — DOI: 10.3390/microbiolres15040131.

349. Zhang, L. Genome-Wide Analysis of the Cis-Prenyltransferase (CPT) Gene Family in *Taraxacum kok-saghyz* Provides Insights into Its Expression Patterns in Response to Hormonal Treatments / L. Zhang [et al.] // *Plants*. — 2025. — Vol. 14, No. 3. — P. 386. — DOI: 10.3390/plants14030386.

350. Zhang, Y. Rapid and hormone-free *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in rubber producing dandelions *Taraxacum kok-saghyz* and T.

brevicorniculatum / Y. Zhang [et al.] // Industrial Crops and Products. — 2015. — Vol. 66. — P. 110–118. — DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.12.013.

351. Zhen, S. Photosynthesis in sun and shade: the surprising importance of far-red photons / S. Zhen, M.W. van Iersel, B. Bugbee // New Phytologist. — 2022. — Vol. 236, No. 2. — P. 538–546. — DOI: 10.1111/nph.18375.

352. Zheng, H.H. First report of *Alternaria* blight of potato caused by *Alternaria tenuissima* in China / H.H. Zheng, X.H. Wu // Plant Disease. — 2013. — Vol. 97, No. 9. — P. 1246. — DOI: 10.1094/PDIS-08-12-0763-PDN.

353. Zheng, J. Green and Efficient Extraction of *Taraxacum kok-saghyz* Natural Rubber and Its Structural Analysis / J. Zheng [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2025. — Vol. 26, No. 3. — P. 920. — DOI: 10.3390/ijms26030920.

354. Zhuo, Y. Composition properties of rubber from parts of *Taraxacum kok-saghyz* roots / Y. Zhuo [et al.] // Journal of Rubber Research. — 2021. — P. 1–7. — DOI: 10.1007/s42464-021-00141-4.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Технические характеристики аэропонного фитотрона

Система управления	Правосторонняя панель управления
Внешние размеры, Ш×Г×В,мм	1388×745×1918
Внутренние размеры, Ш×Г×В,мм	1378×735×1200
Площадь выращивания	0,96 м ²
Объем полезного пространства, л	Объем 1 секции: для вегетативной части 736 л, для корневой части 264 л. Суммарный полезный объем камеры (две секции): 1000л.
Высота выращивания, мм	610
Интенсивность освещения	6000 мкмоль·м ⁻² ·с ⁻¹ при 25°C
Программирование и управление освещением	Независимое, 2 уровня программирования.
Точность измерений	0,05%.
Циклический опрос датчиков	Каждые 15 секунд
Диапазон температуры	10-35°C при вкл. свете
Воздушный поток	Равномерный восходящий
Отделка	Внешняя отделка: нержавеющая сталь AISI 304. Подставка под камеру – черный металл с зеленым эмалевым покрытием. Внутренняя отделка: зеркальная нержавеющая сталь AISI 304
Двери	Две двери с предохранительной защелкой, полное открытие, (Ш×Г = 1100×372 мм)
Посадочное поле	Полка с круглыми отверстиями, д.32 мм, для закрепления посадочного материала, 96 лунок для растений
Поддон	Под всей корневой зоной выращивания растений установлен поддон из нержавеющей стали AISI 304. Поддон имеет наклон по всей длине в сторону питательного бака. Дренажный штуцер устанавливается и подсоединяется к внешней сливной трубе для слива питательного раствора.
Технологические отверстия	- Два порта диаметром 25 мм, оснащены светонепроницаемыми колпаками; - 1 порт диаметром 29 мм, для подведения трубок с питательным раствором; - 8 портов диаметром 16 мм, для гермовводов; - снабженные заглушками отверстия для естественной вентиляции.
Электропитание	220V -50Гц
Вес, кг	600

Фитотронная установка состоит из следующих систем:

1. Модуль подготовки и рециркуляции воздуха. В его состав входят следующие устройства:

1) Циркуляционный вентилятор – осуществляет забор воздуха из камеры фитотрона, с дальнейшей подачей его в охладитель-нагреватель и увлажнитель. После чего он опять подается в камеру фитотрона.

2) Нагреватель/охладитель – представляет собой термоэлектрическую установку, с реверсивной системой питания, что позволяет производить как охлаждение, так и нагрев подаваемого воздуха. Мощность данной установки составляет 144 Вт.

3) Увлажнитель – представляет собой ультразвуковой испаритель влаги.

4) Клапан CO_2 – осуществляет подачу углекислого газа из баллона во внутренний объем камеры фитотрона. Нужен для регулировки уровня CO_2 .

5) Приточный вентилятор – осуществляет подачу свежего воздуха извне камеры, необходим для регулировки уровня CO_2 .

2. Модуль подачи питательной смеси «БАК»

1) Насос – осуществляет подачу питательной смеси на корневую систему растений по заданной циклической программе, управляемой с контроллера.

2) Датчик pH – контролирует уровень pH питательной смеси, данные полученные с датчика, передаются в контроллер.

3) Датчик электропроводности – контролирует содержание ионов в питательном растворе. В измерительной схеме применение эталонного датчика обеспечивает компенсацию изменения химического состава и температуры исследуемого питательного раствора. Данные, полученные с датчика, передаются в контроллер.

3. Основной бокс фитотронной камеры

4) Тензодатчики – система из четырех независимых датчиков, установленных по углам поддона для выращивания растений. Данные, полученные с датчиков, суммируются и вычисляется усредненное значение; результаты передаются в контроллер.

5) Датчик CO₂ – контролирует уровень углекислого газа внутри камеры фитотрона; данные, полученные с датчика, передаются в контроллер. После чего происходит регулировка уровня CO₂ при помощи клапана CO₂ или приточного вентилятора.

6) Датчик влажности – контролирует уровень влажность воздуха внутри камеры фитотрона; данные, полученные с датчика, передаются в контроллер, после чего происходит регулировка уровня влажности при помощи ультразвукового увлажнителя.

7) Датчик температуры – замеряет температуру воздуха внутри камеры фитотрона; данные, полученные с датчика, передаются в контроллер, после чего происходит регулировка температуры при помощи термоэлектрической сборки.

8) Датчик отслеживания открывания дверей – контролирует факт открывания дверей камеры с регистрацией времени и даты в контроллере.

1. Светодиодный светильник

Выполнен независимо от камеры фитотрона, во избежание паразитирующего нагрева внутреннего объема камеры.

Состоит из светодиодов разного спектра, управление которыми осуществляется с контроллера по заданной программе. Каждый спектр можно регулировать в пределах от 0 до 100 %.

5. Модуль контроллера

Модуль состоит из:

- a. контроллера – Segnetics 2G-4222-01-2;
- b. модуля расширения вводов/выводов – MC-402;
- c. модуля расширения вводов/выводов – MR-504;
- d. блоков питания с выходным напряжением 24 вольта для питания светодиодных светильников, термоэлектрической сборки, контроллера, датчиков, вентиляторов;

е. исполнительных устройств, которые выполнены в виде твердотельных реле, управляемых с контроллера. При помощи них производится включение таких элементов, как насос, вентиляторы, термоэлектрический модуль, увлажнитель.

Принципиальная блок-схема управления установкой «Фитотрон»:

