

Мартиросян Левон Юрьевич

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

Специальность: 1.5.6 – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025 г.

Работа выполнена в лаборатории биохимической физики и инженерии метаболизма растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте биохимической физики им Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Научный руководитель: **Варфоломеев Сергей Дмитриевич,**
доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель института, заведующий лабораторией кинетики и механизмов ферментативных и каталитических реакций, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Митрофанова Ирина Вячеславовна,**
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, заведующая научно-исследовательским отделом экспериментальной биологии и патологии растений, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Камионская Анастасия Михайловна,
кандидат биологических наук, руководитель группы биоинженерии растений, заместитель директора по научной работе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Защита состоится 18 сентября 2025 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.016.01 (Д 006.027.01) на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» по адресу 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499)976-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ: <http://www.vniisb.ru/ru/council/>

Автореферат разослан _____ 2025 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Дудников Максим Васильевич

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Натуральный каучук (НК) – востребованный биополимер, используемый для производства большого количества 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 (*Hevea 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 *Taraxacum kok-saghyz* R. (далее кок-сагыз). Кок-сагыз – травянистое растение, произрастающее в Казахстане и Китае, и его каучук очень похож по качеству на каучук *H. brasiliensis*.

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 аэропонтном 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 периодической 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 входят 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).

Содержание работы

1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены сведения о применении, свойствах и источниках НК; описаны проблемы дефицита НК; рассмотрен объект исследования – источник НК и инулина, *T. kok-saghyz* R. – его физиологические и биохимические особенности, в частности биосинтез НК и инулина, влияние элементов минерального питания и спектрального состава света на рост и развитие *T. kok-saghyz* R.; описаны методы селекции высокопродуктивных форм, в т. ч. полиплоидизация и геновая инженерия; описаны методы выделения и анализа НК, обзревается фитотронные технологии контролируемого выращивания растений.

2. Материалы и методы

Растительный материал. 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.

Аэропонный фитотрон. Для исследований использовался аэропонный фитотрон, разработанный нами, патент № RU 2019130109. Представляет собой вегетационную камеру с полностью регулируемые условиями выращивания, где водно-минеральное питание растений осуществляется по принципу aeroponics.

Разработка устройства для измерения массы растений в фитотроне в режиме реального времени. Разработанное нами устройство, патент № RU 212577, относится к средствам для взвешивания, а именно к устройствам для неразрушающего определения, в режиме реального времени, массы растений, выращиваемых в условиях фитотрона.

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-тетраметил-пиперидин-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.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением частных средних и оценки с использованием критериев Дункана, Даннета с использованием программ «Prism» («GraphPad»), «Statistica» («StatSoft»). Результаты экспериментов представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Глава 3. Результаты и обсуждение

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

У имеющихся образцов, полученных из коллекции ВИР и из мест естественного произрастания, оценивали такие ключевые параметры, как содержание НК и инулина. Исходя из полученных результатов, оптимальными по содержанию целевых веществ являются коллекционные образцы кок-сагыза В-242 (НК 7,42%, инулин 15,0%), В-247 (НК 7,6%, инулин 14,4%), В-391 (НК 10,8%, инулин 23,0%) и К-31 (НК 11,9%, инулин 24,3%), которые мы использовали в дальнейших исследованиях.

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

Эффективность каллусогенеза (%) рассчитывали, как процент эксплантов с признаками каллусогенеза от общего количества эксплантов. При использовании корневых эксплантов оптимальными являлись варианты с добавлением 1,25 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК (93%) и 3,0 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК (90%). При использовании листовых эксплантов также самыми эффективными были 1,25 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК (89%) и 3,0 мг/л 6-БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК (86%).

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

Эффективность листового морфогенеза рассчитывали, как процент каллусов с образованием листовой розетки от общего количества каллусов, высаженных на среду для

морфогенеза. 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.

Полученные регенеранты были пересажены на среду для ризогенеза, содержащую ауксины. После 4 недель культивирования на средах для укоренения было подсчитано количество укоренившихся растений; эффективность рассчитывали, как процентное количество укоренившихся эксплантов. Максимальную эффективность ризогенеза (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.

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

Была выдвинута гипотеза о том, что глутатион (GSH) способен положительно сказываться на приросте массы каллусных тканей и, соответственно, на увеличении регенерационного потенциала кок-сагыза. Добавление GSH в питательную среду стимулирует образование гидроксикоричных кислот (метаболитов биосинтеза лигнина) в растении и, возможно, способствует увеличению его биомассы. Наибольший прирост каллусной массы, образования корней и уменьшения доли потемневших каллусов наблюдался при концентрации 1 мМ GSH в питательной среде.

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

При работе *in vitro* с культурой растительных тканей проявление бактериальной контаминации 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 – в условиях *in vitro*, в аэропном фитотроне и при выращивании в почве, поэтому методы оздоровления применялись на всех этапах работы.

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

При получении единичных колоний бактерий, 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. Для подтверждения патогенности использовался анализ на пектиназную активность, оба образца показали интенсивный рост на метиловом эфире поли-D-галактуроновой кислоты (яблочный пектин). Исследование методом повторного заражения подтвердило тот факт, что бактерии могут являться патогенами растений.

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*, а второй, по способности расти на орнитиндекарбоксилазе и отсутствию способности к утилизации аминокислоты – к роду *Raoultella*.

Далее для идентификации использовали методы молекулярной диагностики, такие как ПЦР и секвенирование. ПЦР-амплификация и анализ последовательности (сравнение с базой данных GenBank) переменных 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 граммотрицательный вид бактерий рода *Raoultella*, ранее классифицированный как род *Klebsiella*, *Raoultella ornithinolytica*, или *Klebsiella aerogenes*.

Затем для увеличения точности идентификации мы ПЦР-амплифицировали и секвенировали фрагменты генов *gyrB* и *rpoD*. Сравнение с базой данных GeneBank убедительно показало, что Ksz-1 – это *P. putida*, а Ksz-2 – *R. terrigena*.

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

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 антибиотика, в течение 3 суток (табл. 3.1), 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 3.1 – 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.

3.3.3 Оздоровление растений *T. kok-saghyz* R. с помощью 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 изолированных корней кок-сагыза наблюдали осветление культуральной жидкости, появление вновь образованных корней без признаков бактериальных поражений и образование регенерантов. Такие же морфологические изменения наблюдали у кок-сагыза на твердой среде. В дальнейшем, в вегетационных опытах, было установлено, что причиной «летнего покоя» (дефолиации) растений *T. kok-saghyz* R., не прошедших цикла оздоровления, является эндогенная микрофлора. Её фитопатогенные свойства особенно проявляются при высоких температурах окружающей среды. 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.

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

Первоначальный состав питательного раствора для выращивания в аэропонном фитотроне был разработан на основе анализа содержания химических элементов в верхнем слое (20–25 см) почвы, взятой в районе озера Тузколь (Соленое озеро). Раствор характеризовался повышенным содержанием ионов Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , микроэлементов, Ес до 2,5, рН до 8,0.

Нами также изучалось влияние дополнительного внесения, по отдельности, коллоидных растворов Ag, Zn и Cu, а также KI на морфогенез растений кок-сагыза и накопление ими целевых веществ. Наилучшим образом с точки зрения увеличения биомассы до $(54,36 \pm 0,2)$ г действовал 0,05 % раствор KI; примечательно, что данная его концентрация также положительно сказалась на увеличении биомассы корней (до $43,3 \pm 1,2$ г). На содержание НК наиболее положительно сказывалось внесение в питательный раствор коллоидного раствора Cu (0,0025 %), Zn (0,0016 %) и 0,05 % 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 изменялись, однако содержание каучука увеличивалось с 9,78 % до 12,25 %, а инулина – с 17,55 % до 20,63 %. Под влиянием Zn содержание каучука увеличивалось с 9,58 % до 12,56 %, а инулина – с 21,66 % до 23,71%, морфобиометрические параметры практически не менялись. Ag положительно сказывалось на росте растений и содержании инулина, однако его внесение несущественно влияло на содержание НК.

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. При добавлении N, до 32 мМ/л, содержание НК достигало $13,28 \pm 1,07$ %, также отметим положительное влияние добавочного калия (3 мМ/л), приводящее к увеличению содержания НК до $13,18 \pm 1,06$ %, а также фосфора (14 мМ/л), увеличивавшего содержание НК до $12,15 \pm 0,98$ %. 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 $13,15 \pm 0,98$ % и $12,46 \pm 1,06$ %, соответственно.

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 полноспектральными СД (светодиодными облучателями) с уровнем интенсивности света 400 ± 6 мкмоль $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ фотонов и при насыщающей (теоретической) интенсивности света 1200 ± 10 мкмоль $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ фотонов.

Большая скорость фотосинтеза при интенсивности света во время выращивания (400 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 мкмоль $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), т. е. могут показать высокую продуктивность при высоких уровнях интенсивности света.

Далее определены параметры переменной флуоресценции хлорофилла *a* и *b* (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Параметры переменной флуоресценции листьев кок-сагыза различных коллекционных образцов, выращенных в аэропном фитотроне, при интенсивности света 400 ± 6 мкмоль·м⁻²·с⁻¹

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

Оценка активности первичных процессов фотосинтеза с использованием метода переменной флуоресценции показала, что низкая скорость фотосинтеза коллекционного образца B-242 ($2,9 \pm 0,2$ мкмоль·м⁻²·с⁻¹ CO₂), по сравнению с B-391 ($4,4 \pm 0,2$ мкмоль·м⁻²·с⁻¹ CO₂), может быть связана с низкой скоростью транспорта электронов (ETP) в электрон-транспортной цепи хлоропластов. Также, исходя из значения Fv/Fm (табл. 3.2), видно, что в этих световых условиях образец B-391, по сравнению с другими образцами, наименее подвержен стрессу в условиях аэропного культивирования. При этом, однако, высокая скорость потока электронов у растений коллекционных образцов B-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.

В наших опытах (табл. 3.3) повышение CO₂ в дневное время на протяжении всего времени выращивания растений при низкой интенсивности света (200 мкмоль·м⁻²·с⁻¹) и одной и той же температуре не приводило к накоплению каучука и инулина в корнях по сравнению с контролем (400 мкмоль·м⁻²·с⁻¹). Дополнительно отмечали, что растения, выращенные в обогащенной углекислым газом атмосфере, имели более крупный габитус (большая корневая масса, более крупные листья).

Таблица 3.3 – 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	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)

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.

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

Повышение доли синего или красного света при выращивании растений кок-сагыза в камерах аэропного 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 · м⁻² · с⁻¹ СО₂ при начальном КС и 10,9 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ СО₂ при начальном СС.

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. 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.

Для более детального выяснения характера влияния смены спектрального режима на активность фотосинтетического аппарата были получены световые кривые скорости фотосинтеза растений.

При смене режима облучения с СС на КС наблюдалось снижение скорости фотосинтеза с 26,7 до 15,2 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ СО₂ на плато световой кривой (при световом насыщении). При переходе с СС на КС также происходило снижение скорости темнового дыхания с 2,80 до 2,38 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ СО₂ и квантового выхода фотосинтеза с 0,066 до 0,055. 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.

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. Через 3ч показатели были сопоставимы с таковыми у растений, облучаемых преимущественно КС, до смены светового режима.

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.

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 (рис. 3.1).

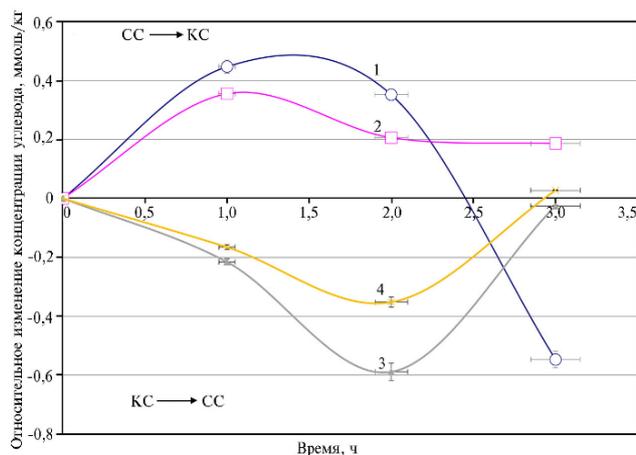


Рисунок 3.1 – Динамика изменения концентрации глюкозы (1, 3) и сахарозы (2, 4) в листьях растений кок-сагыза при длительном выращивании методом аэропоники в камерах аэропонного фитотрона. Интенсивность света 400 мкмоль фотонов/м²/с1 с преобладанием красного (КС) или синего (СС) света после изменении спектра облучения с СС на КС (1, 2) и с КС на СС (3, 4) (M±SEM, n = 8)

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 свидетельствует 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·м⁻²·с⁻¹ CO₂ (при световом насыщении), скорость темнового дыхания – с 2,80 до 2,38 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ CO₂, 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.

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

3.6.1 Получение культуры изолированных корней «hairy roots»

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 (рис. 3.2).

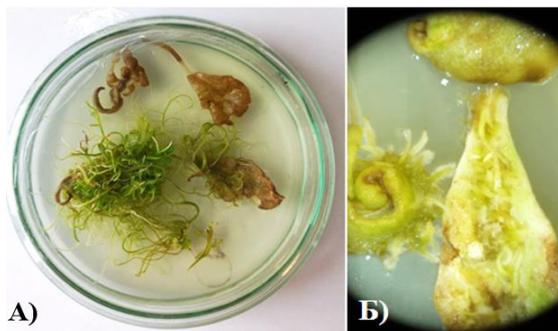


Рисунок 3.2 – Индукция ризогенеза на трансформированных листовых эксплантах кок-сагыза: А) общий вид; Б) образование корней из центральной жилки листового экспланта

Через 20 суток корни переносили в жидкую питательную среду для дальнейшей культивации и исследования роста. Трансформированные линии корней отбирались на основе ПЦР анализа на наличие *rol*-генов и отсутствие *vir*-генов, в качестве отрицательного контроля использовали корни интактных растений. 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%.

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

Индекс роста и динамика накопления НК и инулина в процессе культивирования трансформированных корней кок-сагыза представлены на рисунке 3.3.

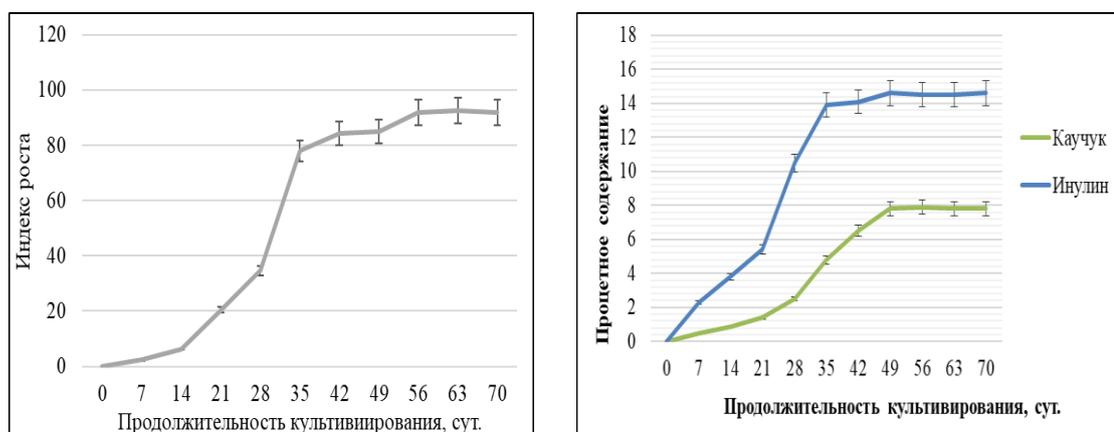


Рисунок 3.3 – Слева: индекс роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 70 суток; справа: динамика изменения удельного содержания НК и инулина в процессе роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 70 суток

Лаг-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.

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.

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

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. Через 4 суток культивирования был отмечен каллусогенез. На 12-е сутки была отмечена вторичная дифференцировка с образованием листьев и новых корней. Таким образом, нами были получены композитные растения кок-сагыза с фенотипом «*hairy roots*».

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) (табл. 3.4).

Таблица 3.4 – 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, %
Интактные растения	32,3±1,5	20,6±0,9	7,9±0,6	39,5±0,1	32,4±0,1	7,2±0,2	8,4±0,6	14,9±0,3
Композитные растения « <i>hairy roots</i> »	33,9±0,6	25,9±0,4	7,8±0,5	62,2±1,5	56,3±1,2	5,9±1,3	8,8±1,2	16,5±0,9

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.

3.7 Оценка уровня плоидности 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

Выживаемость семянкок-сагыза, обработанных более высокими концентрациями колхицина (0,05%, 0,1%) с более длительной экспозицией (48 ч, 72 ч), была значительно ниже. Показатель эффективности полиплоидизации, рассчитанный как процентное соотношение количества обработанных семянкок к количеству полученных из них растений-полиплоидов кок-сагыза, был наибольшим в варианте с использованием 0,1% раствора колхицина в течение 12 ч (75%).

Наибольшую выживаемость каллуса наблюдали при использовании 0,01% и 0,05% колхицина в течение 12 ч. При использовании каллусных масс кок-сагыза для полиплоидизации наибольшая эффективность полиплоидизации относительно общего количества эксплантов была получена при использовании 0,01% раствора колхицина в течение 12 ч (84%).

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

Цитометрический анализ клеточных ядер колхицинированных растений выявил несколько различных по плоидности форм кок-сагыза: диплоидные, триплоидные, тетраплоидные, гексаплоидные и миксоплоидные (рис. 3.4).

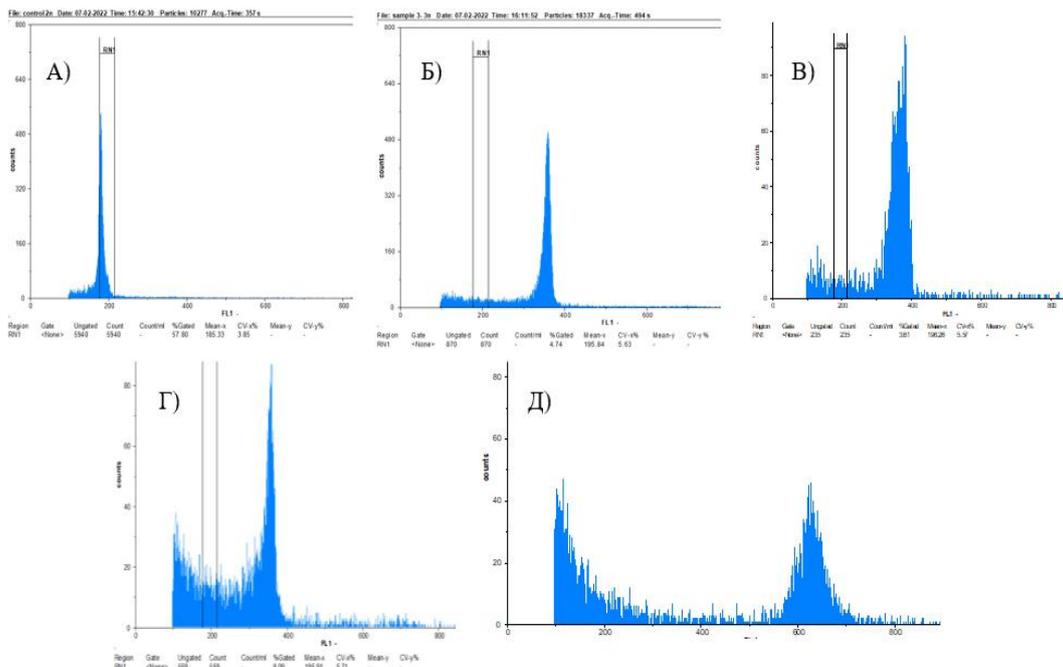


Рисунок 3.4 – Результаты анализа растений-регенерантов кок-сагыза с использованием проточной цитометрии: А) диплоидная форма (2n); Б) триплоидная форма (3n); В) тетраплоидная форма (4n); Г) миксоплоидная форма; Д) гексаплоидная форма (6n)

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

Нами была проведена оценка растений-полиплоидов по основным показателям абаксимального эпидермиса. Длина, ширина и площадь устьиц были значительно больше у 4n-растений и 6n-растений, чем у 2n-растений, но у 4n-растений наблюдалось меньше устьиц на единицу площади листа, чем у 2n. Средняя плотность устьиц у контрольных диплоидов составила 56,9 шт./мм², у 3n-растений была 54,15шт./мм², у 4n-растений 43,55шт./мм², а у 6n-растений 35,7шт./мм². При этом миксоплоидные формы достоверно не отличались от диплоидных по всем вышеописанным параметрам.

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

Мы оценивали количество листьев и их параметры, а также биомассу корней и диаметр основания корня у 2n-, 3n-, 4n-, и 6n-растений кок-сагыза спустя 3 месяца выращивания в вегетационных сосудах *ex vitro*. 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).

Параметры габитуса 2n- и 3n-растений кок-сагыза в значительной степени не различались, тогда как 4n- и 6n-растения имели увеличенный листовой индекс, количество листьев и большую ширину листьев, по сравнению с контрольными растениями. Диаметр основания корня также был большим у 4n- и у 6n-растений кок-сагыза.

Значительные различия наблюдались между 4n-, 6n- и 2n-растениями кок-сагыза по всем показателям, кроме процентного содержания инулина, от сухой биомассы корней, оно составляло 20±1,5 для всех растений. Процентное содержание каучука, от сухой биомассы, у 4n- и 6n-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 и увеличенного каудекса, общее содержание каучука на одно растение у 4n- и 6n-растений было выше в 1,35 раза, а содержание инулина – в 1,82 раза (табл. 3.5).

Таблица 3.5 – Ростовые и биохимические параметры растений-полиплоидов кок-сагыза

	2n	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 72±1 (A)
Масса сухих корней (г)	6,24±0,5 (B)	6,4±0,36 (B)	10,4±0,5 (A)	11,52±0,5 72±1 (A)
Масса сырых листьев (г)	7,8±0,25 (C)	8±0,32 (C)	13±0,25 (B)	14,4±0,25 72±1 (A)
Масса сухих листьев (г)	1,56±0,36 (B)	1,6±0,24 (B)	2,6±0,36 (A)	2,88±0,36 72±1 (A)
Содержание НК (% от сух. массы корней)	11,6±1,2 (A)	11,5±1,1 (A)	9,2±1,2 (B)	9,5±1,2 72±1 (B)
Содержание инулина (% от сух. массы корней)	19,8±1,5 (B)	19,5±1,62 (B)	20,4±1,5 (B)	24,5±1,5 72±1 (A)
Содержание НК (мг/на сух. массу корней)	723,84±5,2 (C)	736±2,6 (C)	956,8±5,2 (B)	1094,4±5,2 72±1 (A)
Содержание инулина (мг/ на сух. массу корней)	1236±10,5 (C)	1248±8,2 (C)	2122±10,5 (B)	2327±10,5 72±1 (A)

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

В эксперименте использовали оздоровленные растения кок-сагыза коллекционного образца К-31, выращенные из семян в условиях *in vitro*. Растения вегетировали на протяжении 270 суток. Срезку опытных вариантов проводили каждые 30 суток. Всего было 4 срезки. Эффективность способа периодической срезки корней оценивали как разницу между опытными и контрольными образцами по сырой биомассе корней и содержанию целевых веществ (НК и инулина) (табл. 3.6).

Контрольные растения, выращенные в почве в вегетационных сосудах, за 270 дней выращивания накопили 59±7,8 г сырой биомассы корня, 1,75 ±0,01 г НК 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 НК и в 1,66 раза больше инулина. Наилучший результат по накоплению сырой биомассы корней получили в варианте с периодической срезкой. Суммарная масса корней, полученных в процессе роста и частичной срезки, была в 4,4 раза больше, чем у контрольных растений в почве. 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.

Таблица 3.6 – Эффективность накопления сырой биомассы корней, общая продуктивность по каучуку и инулину при разных вариантах выращивания кок-сагыза, за 270 дней вегетации

Варианты	Масса сырого корня, г	Эффективность накопления биомассы сырого корня, %	Общая продуктивность по НК, г/растение	Эффективность продуктивности по НК, %	Общая продуктивность по инулину, г/растение	Эффективность продуктивности по инулину, %
Кок-сагыз (почва) контроль без срезки	59,2±7,8	1,00	1,75±0,01	1,00	3,16±0,08	1,00
Кок-сагыз (аэропоника) контроль без срезки	127,3±3,1	2,16	2,79±0,02	1,63	5,25±0,07	1,66
Кок-сагыз (аэропоника) 4 срезка	261,7±20,3	4,44	4,83±0,01	2,82	11,28±0,04	3,57

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.

Методом гель-проникающей хроматографии было получено молекулярно-массовое распределение НК из кок-сагыза и НК из гевеи бразильской. Показано, что молекулярно-массовые распределения обоих образцов практически совпадают по основному максимуму распределения, молекулярная масса которого около 1,6 млн Да. В таблице 3.7 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.

Среднемассовая молекулярная масса (M_w), среднечисленная молекулярная масса (M_n), пиковая молекулярная масса (M_p), индекс полидисперсности (PDI)

В образце каучука из кок-сагыза, выращенного в фитотроне, присутствует низкомолекулярная часть, по молекулярной массе примерно в 1000 раз меньше, чем высокомолекулярная. Низкомолекулярная фракция может быть как результатом неполной полимеризации, так и деградации высокомолекулярных цепей или наличия альтернативных путей биосинтеза.

Таблица 3.7 – 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	Mr (г/моль)	Mw (г/моль)	Mn (г/моль)	PDI
Контроль (гевея)	1,04*10 ⁶	0,99*10 ⁶	4,11*10 ⁵	2,41
Почва (кок-сагыз)	1,16*10 ⁶	1,61*10 ⁶	6,72*10 ⁵	2,40
Фитотрон (кок-сагыз) без срезки корней	1,14*10 ⁶	1,52*10 ⁶	6,14*10 ⁵	2,48
Фитотрон (кок-сагыз) периодическая срезка корней	0,99*10 ⁶	0,85*10 ⁶	7,5*10 ⁵	1,13

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 всех видов каучука сделано в виде одного рисунка (рис. 3.5).

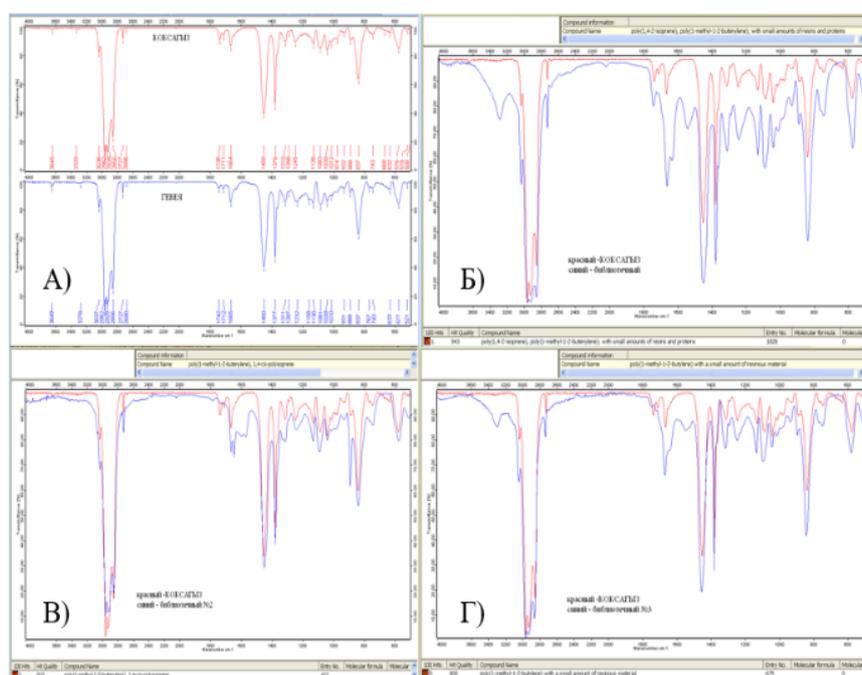


Рисунок 3.5 – А) Сравнение ИК-спектров каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, и каучука из гевеи, (марка SIR, Estate Brown Crepes, сорт LX). Б) Сравнение ИК-спектра каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, с ИК-спектром каучука бразильской гевеи марки SMR CV 60. В) Сравнение ИК-спектра каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне, с библиотечным ИК-спектром синтетического полиизопренового каучука. Г) Сравнение ИК-спектров каучука из растений кок-сагыза, выращенных в фитотроне с библиотечным ИК-спектром натурального каучука из бразильской гевеи марки SMR-5

На рисунке 3.5 А синим цветом показан спектр ИК-поглощения НК из гевеи. 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). На рисунке 3.5 Б 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.

На рисунке 3.5 В показало ожидаемое для синтетического каучука отсутствие пиков, соответствующих связям $\text{N}-\text{H}$ в протеинах, и неожиданное их отсутствие в натуральном каучуке, полученном из растений кок-сагыза. 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.

На рисунке 3.5 Г подтвердилось неожиданное отсутствие $\text{N}-\text{H}$ 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.

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 «летного 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.

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Мартиросян Л.Ю., Гольдберг В.М., Барашкова И.И., Каспаров В.В., Мартиросян Ю.Ц., Мотякин М.В., Гайдамака С.А., Варфоломеев С.Д. Количественное определение содержания натурального каучука в растениях *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin методом ЭПР спинового зонда // Биофизика. 2023. – Т. 68. – № 4. – С. 730–735. – DOI: 10.31857/S0006302923040130
2. Мартиросян Л.Ю., Мартиросян Ю.Ц., Кособрюхов А.А., Гольдберг В.М., Гачок И.В., Мартиросян В.В., Гладченко М.А., Гайдамака С.Н., Америк А.Ю., Миних А.А., Варфоломеев С. Д. Биосинтез каучука и инулина в зависимости от спектрального состава света и активности фотосинтетического аппарата при аэропонном культивировании *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 1. – С. 100–113. – DOI: 10.15389/agrobiology.2023.1.100rus
3. Америк А.Ю., Мартиросян Л.Ю., Мартиросян В.В., Мартиросян Ю.Ц. *Parthenium argentatum* A. Gray, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse как альтернативные источники натурального каучука: нужны ли они нам? // Сельскохозяйственная биология. – 2022. – Т. 57. – № 1. – С. 3–26. – DOI: 10.15389/agrobiology.2022.1.3eng
4. Мартиросян Л.Ю., Рубцова Н.А., Смурова Л.А., Мартиросян Ю.Ц., Зинатуллина К.М., Лобанов А.В., Касаикина О.Т. Влияние экзогенного глутатиона на регенерационный потенциал каллусных тканей *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin // Химическая безопасность. – Т. 6. – № 1. – С. 198–207. – DOI: 10.25514/CHS.2022.1.21014
5. Мартиросян Л.Ю., Америк А.Ю., Мартиросян Ю.Ц., Мартиросян Л.Ю., Гольдберг В.М., Утеулин К.Р., Варфоломеев С.Д. Молекулярно-генетический анализ биосинтеза натурального каучука // Физиология растений. – 2021. – Т. 68. – № 1. – С. 36–52. – DOI: 10.1134/S1021443721010039

Патенты

1. Патент на изобретение RU 2779988 C1 Способ аэропонного выращивания каучуконосного растения кок-сагыз, *Taraxacum kok-saghyz* R. / Мартиросян Л.Ю., Мартиросян Ю.Ц., Варфоломеев С.Д., Гольдберг В.М. Патентообладатели ИБХФ РАН, ПАО «ТАТНЕФТЬ», ООО «НТЦ ТАТНЕФТЬ», заявл. 01.02.2022, опубл. 16.09.2022.
2. Патент на изобретение RU 2805229 C1 Способ определения содержания каучука в тканях каучуконосных растений / Гольдберг В.М., Барашкова И.И., Мартиросян Л.Ю., Мартиросян Ю.Ц., Мотякин М.В., Гайдамака С.Н., Варфоломеев С.Д. Патентообладатель ИБХФ РАН., заявл. 20.10.2022, опубл. 12.10.2023.
3. Патент на полезную модель RU 196013 U1 Аэропонный фитотрон / Мартиросян Ю.Ц., Мартиросян Л.Ю., Варфоломеев С.Д., Гольдберг В.М., Миних А.А., Рязанцев Д.М. Патентообладатели ИБХФ РАН, ПАО «ТАТНЕФТЬ», ООО «НТЦ ТАТНЕФТЬ», заявл. 25.09.2019, опубл. 13.02.2020.
4. Патент на полезную модель RU 212577 U1 Устройство для измерения веса растений в фитотроне в режиме реального времени / Гольдберг В.М., Гусейнов Т.М., Соловьев А.А., Мартиросян Ю.Ц., Мартиросян Л.Ю. Патентообладатель ИБХФ РАН., заявл. 01.04.2022, опубл. 29.07.2022.

Публикации в других изданиях, тезисы докладов

1. Мартиросян Л.Ю., Мягкова Е.Р., Филатова С.И., Мартиросян Ю.Ц. Влияние наночастиц серебра на бактериальные патогены растений *Taraxacum kok-saghyz*. // XXII Всероссийская международная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», Москва, 07–09 ноября 2022 г. Тезисы докладов.- 2022.- С. 91-92.
2. Мартиросян Л.Ю., Мягкова Е.Р., Мартиросян В.В. Анализ и математическое моделирование ростовой активности культуры изолированных трансформированных корней *Taraxacum kok-saghyz* и определение содержания в ней целевых веществ (каучука и инулина). // XIII Международная конференция ученых-биологов «СИМБИОЗ-РОССИЯ 2022», Пермь, 24–25 октября 2022 г. Сборник трудов.- 2023.- С. 571-577.
3. Мартиросян Л.Ю., Мягкова Е.Р., Мартиросян Ю.Ц. Влияние повышенной концентрации углекислого газа на активность фотосинтеза, ростовые процессы и биосинтез каучука и инулина у трансформированных растений *Taraxacum kok-saghyz*. // Всероссийская студенческая научно-практическая конференция «Эколого-физиологические аспекты формирования агро- и биоценозов», посвященная памяти профессора М.Н. Кондратьева, Москва, 28 октября 2022 г. Сборник трудов.- 2022.- С. 139-141.
4. Филатова С.И., Мартиросян Л.Ю., Мягкова Е.Р., Мартиросян Ю.Ц. Исследование действия наночастиц и коллоидного серебра на морфогенез растений кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* R.) в культуре *in vitro* // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков, Новосибирск, 27–30 сентября 2022 г. Тезисы докладов.- 2022.- С. 275-276.
5. Мягкова Е.Р., Мартиросян Л.Ю., Мартиросян Ю.Ц. Получение культуры корней hairy roots кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* R.) и изучение влияния сульфатов меди и цинка на рост биомассы корней, содержание каучука и инулина // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков, Новосибирск, 27–30 сентября 2022 г. Тезисы докладов.- 2022.- С. 216-217.
6. Мартиросян Л.Ю., Барашкова И.И., Мартиросян Ю.Ц., Мотякин М.В., Гольдбер В.М. Определение содержания натурального каучука в растениях *Taraxacum kok-saghyz* R. методом ЭПР-спинового зонда // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков, Новосибирск, 27–30 сентября 2022 г. Тезисы докладов.- 2022.- С. 368.
7. Мартиросян Л.Ю., Лукьянова А.Л., Мирошников К.А., Америк А.Ю. Поиск бактериофагов, эффективных при борьбе с фитопатогенными бактериями семейства *Pseudomonas* и *Raoultella*, поражающих кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) – перспективный источник натурального каучука // IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков, Новосибирск, 27–30 сентября 2022 г. Тезисы докладов.- 2022.- С. 207.
8. Мартиросян Л.Ю., Мягкова Е.Р. Агробактериальная трансформация растений *Taraxacum kok-saghyz* методом вакуумной инфльтрации. // Международная научная конференция молодых ученых и специалистов, посвященная 135-летию со дня рождения А. Н. Костякова, Москва, 6–8 июня 2022 г. Труды конференции.- 2022.- С. 328-332.
9. Мартиросян Л.Ю., Эсембаева М.А., Мягкова Е.Р. [и др.] Микрклональное размножение кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) – перспективного источника натурального каучука. // XXI-я Всероссийская молодежная научная конференция

«Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», Москва, 19–21 октября 2021 г. Тезисы докладов.- 2021.- С. 106-108.

10. Мартиросян Л.Ю, Гольдберг В.М., Мартиросян Ю.Ц. Кособрюхов А.А. Влияние спектрального состава света на морфофизиологические параметры и активность фотосинтетического аппарата растений кок-сагыза. XIII Международная конференция «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», Сочи – Москва, 4–8 июня 2018 г. // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования.- 2018.- № 13.- С. 297-300.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, член-корреспонденту РАН, д.х.н. Сергею Дмитриевичу Варфоломееву за руководство данной работой и д.х.н. Владимиру Михайловичу Гольдбергу за всестороннюю методическую и моральную поддержку. Искренняя благодарность директору НТЦ «ТАТНЕФТЬ» Александру Антоновичу Миниху, за поддержку данных исследований. Искренняя благодарность член-корреспонденту РАН Константину Анатольевичу Мирошникову и научному коллективу под его руководством за возможность работы с бактериофагами. Огромная благодарность д.х.н. Михаилу Викторовичу Мотякину и к.б.н. Роману Александровичу Комахину за методическую помощь. Огромная благодарность акад. РАН, д.б.н. Алексею Владимировичу Кочетову и к.б.н. Ольге Геннадьевне Силаевой за цитологические исследования. Искренняя благодарность к.б.н. Михаилу Георгиевичу Дивашуку к.б.н. Ольге Владимировне Разумовой, к.б.н. Елене Алексеевне Домблидес за содействие в проведении цитометрических исследований и к.б.н. Ярославу Юрьевичу Голиванову. Искренняя благодарность д.х.н. Ольге Тарасовне Касаикиной и к.х.н. Наталье Анатольевне Рубцовой, за методическую поддержку. Большая благодарность к.х.н. Ирине Владимировне Гачок, к.х.н. Сергею Николаевичу Гайдамаке и к.х.н. Марине Александровне Гладченко. Огромная благодарность сотрудникам отдела полимеров и композиционных материалов Института катализа и лично Вадиму Владимировичу Болотникову. Огромная благодарность сотрудникам компании «Синтол» к.б.н. Якову Игоревичу Алексееву и Олегу Петровичу Малюченко. Безграничная благодарность Юрию Александровичу Рыбакову. Огромная благодарность сотрудникам группы аэропных технологий выращивания растений, д.б.н. Анатолию Александровичу Кособрюхову, к.х.н. Александру Юрьевичу Америку. Огромная благодарность сотрудникам ФГБНУ ВНИИСБ и сотрудникам ИБХФ РАН, способствовавших выполнению данной работы.