



## ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУР ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ КОК-САГЫЗА И АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ В НИХ НАТУРАЛЬНОГО КАУЧУКА

Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Заикина Е.А., Мусин Х.Г., Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054, Проспект Октября, 71, Уфа, E-mail: [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

### Резюме

Кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) является альтернативным гевее бразильской источником высококачественного натурального каучука, который способен произрастать в условиях умеренного климата. Однако полевое выращивание кок-сагыза сопряжено с рядом проблем, таких как необходимость в стратификации семян, очень чувствительные к внешнему воздействию проростки, трудоемкость в борьбе с сорняками и вредителями, неравномерность созревания семян, отсутствие специальной техники для посева, сбора корней и семян. В связи с этим, перспективным представляется использование волосовидных (бородатых) корней кок-сагыза в качестве сырья для получения натурального каучука. Целью нашей работы было получение культур волосовидных корней кок-сагыза и определение в них содержания натурального каучука гексановым методом. В ходе работы было получено 10 линий волосовидных корней кок-сагыза способных к росту в изолированных культурах. Было показано, что эти волосовидные 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. Полученные нами данные говорят о перспективности использования волосовидных корней кок-сагыза для промышленного получения натурального каучука.

**Ключевые слова:** *Taraxacum kok-saghyz*, волосовидные корни, бородатые корни, адвентивные корни, гексановый экстракт, полиизопрен

**Цитирование:** Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Заикина Е.А., Мусин Х.Г., Чемерис А.В. Получение культур волосовидных корней кок-сагыза и анализ содержания в них натурального каучука // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 449-454. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-36

© Авторы

### Obtaining of hairy roots cultures of kok-saghyz and analysis of the content of natural rubber

Kuluev B.R., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Zaikina E.A., Musin Kh.G., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054, 71 Prospect Oktyabrya, E-mail: [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

### Resume

Kok-saghyz (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) is an alternative to *Hevea brasiliensis* source of high quality natural rubber that is able to grow in temperate climates. However, the field cultivation of kok-saghyz is associated with a number of problems, such as the need for seed stratification, seedlings that are very sensitive to stress factors, laboriousness in the fight against weeds and pests, uneven maturation of seeds, the lack of special equipment for sowing, collecting roots and seeds. In this regard, the use of hairy roots of kok-saghyz as a raw material for obtaining natural rubber seems to be promising. The aim of our work was to obtain of hairy roots cultures of kok-saghyz and to determine the content of natural rubber in them by the hexane method. In the course of the work, 10 lines of hairy roots of kok-saghyz were obtained, capable of growing in isolated cultures. It has been shown that these hairy roots accumulate an average of 7.5% hexane extract (rubber-like substances) per dry weight, which is about 1.5 times more than the roots of field

kok-saghyz. Our data indicate that the use of the hairy roots of kok-saghyz is promising for the industrial production of natural rubber.

**Key words:** *Taraxacum kok-saghyz*, hairy roots, adventitious roots, hexane extract, polyisoprene

**Citation:** Kuluev B.R., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Zaikina E.A., Musin Kh.G., Chemeris A.V. Obtaining of hairy roots cultures of kok-saghyz and analysis of the content of natural rubber. *Biomics*. V.12(4). P. 449-454. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-36 (In Russian)

© The Authors

### Введение

Кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin) является одним из самых перспективных каучуконосных растений, которые можно выращивать в умеренной зоне. Содержание натурального каучука в корнях кок-сагыза колеблется в широких пределах: от 3% до 28% на сухую массу [Гаршин и др. (Garshin et al.), 2017]. Такой разброс данных может быть связан не только с генетическими особенностями той или иной популяции или линии, но еще и с периодом вегетации, при котором отбирались корни, а также особенностями использованного для выделения каучука метода [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2019]. Но самым главным достоинством кок-сагыза является то, что он продуцирует высококачественный каучук с большой молярной массой, около 1,5 млн г/моль [Zhang et al., 2019]. Для промышленного получения корней кок-сагыза предлагается, прежде всего, метод полевого возделывания данного растения. Однако при этом существует ряд проблем, которые способствуют увеличению стоимости получаемого сырья. Прежде всего, агротехника кок-сагыза в основном остается не разработанной. Это частично связано с тем, что данный одуванчик не является культурным растением. Вот лишь некоторые проблемы, которые еще только предстоит решить: необходимость в стратификации семян, очень чувствительные к внешнему воздействию проростки, трудоемкость в борьбе с сорняками и вредителями, неравномерность созревания семян, отсутствие специальной техники для посева, сбора корней и семян [Половенко и др. (Polovenko et al.), 1950]. Эти и многие другие нерешенные проблемы пока делают производство кок-сагызного каучука экономически невыгодным. Второй подход в получении сырья для производства кок-сагызного каучука предполагает использование гидропонного метода выращивания растений [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2017]. Минусами такого способа являются необходимость дополнительной подсветки и разработки методов отделения корней от листвы, а также неравномерность плодоношения растений, слабость и медленный рост молодых проростков. Еще одним способом получения растительного сырья может стать использование культур волосовидных (бородатых) корней, которые можно выращивать в биореакторах в строго контролируемых условиях

[Мусин и др. (Musin et al.), 2020]. Очевидными плюсами такого подхода является отсутствие всех перечисленных выше проблем, которые характерны для полевого и гидропонного способов выращивания кок-сагыза. Ранее нами была показана возможность создания волосовидных корней кок-сагыза [Knyazev et al., 2017], также недавно был опубликован патент «Способ получения культуры корня растения одуванчик кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin)» [Степанова, Соловьева (Stepanova, Solovyova), 2019]. Несмотря на все эти результаты, пока остается без ответа вопрос о проценте содержания каучука в этих волосовидных корнях. Чем больше данные корни будут нарабатывать каучук, тем рентабельнее может оказаться их культивирование в биореакторах в промышленных масштабах. Исходя из этого, целью нашей работы было получение культур волосовидных корней кок-сагыза и определение в них содержания натурального каучука гексановым методом.

### Материалы и методы

Для работы использовали кок-сагыз линии L2, любезно предоставленный нашим коллегой Габитом Бари из Казахского национального аграрного университета. Для стерилизации семян кок-сагыза вначале их замачивали в воде с добавлением твина 80 в течение 6 часов. Затем семена последовательно обрабатывали 70% этиловым спиртом (5 мин) и 20% белизной (10 мин), после чего семена промывали 5 раз стерильной водой и засеивали их на стандартную агаризованную среду МС. Через 1,5-2 месяца полученные растения использовали для генетической трансформации. Процедуру агробактериальной трансформации проводили следующим образом. *Agrobacterium rhizogenes* штамма А4 проращивали на среде LB в течение суток, затем на среде minA с добавлением ацетосирингона в течение 1-2 часов. Подготовка растений к опыту заключалась в удалении нескольких нижних листьев и корней, а также царапании гипокотилей инсулиновым шприцем. Далее на раны при помощи бактериологической петли наносили агробактериальную суспензию. Сокультивирование растений и агробактерий проводили при температуре 23°C в течение трех суток, затем проростки пересаживали на среду МС с цефатоксимом (250 мг/л) без добавления

фитогормонов. Первые корни начинали индуцироваться через 7 дней после инокуляции. Изоляцию предполагаемых волосовидных корней проводили спустя месяц после их появления. После этого корни выращивали на жидкой питательной среде МС в колбах в течение 1 месяца и использовали полученный материал (12 линий корней) для ПЦР-анализа на наличие *rol*-генов и выделения из него каучука. ДНК из волосовидных корней выделяли стандартным СТАВ-методом. Для ПЦР-анализа генов *rolA* и *rolB* использовали подобранные нами ранее праймеры AATTGCTACGAGGGGACGCTTTGT и ACGCTCCGCCGGTGGTCATACTTA, которые позволяют идентифицировать наличие этих двух *rol*-генов. Для доказательства отсутствия агробактериальной контаминации проводили ПЦР-анализ на наличие хромосомного гена *A. rhizogenes* зарегистрированного в GenBank под номером WP\_034523040 при помощи праймеров CCCGCACCCGATCCAAGACAAACTCA и CGCCCGAAGCCTCACCCACGAAC.

В дальнейшем собранный растительный материал высушивали в проветриваемом помещении при комнатной температуре в течение 10 дней для перевода всего каучука в коагулированное состояние. Для работы по выделению каучука использовали 10 культур волосовидных корней, а также адвентивные корни и молодые корни дикого типа, растущие в условиях *in vitro*. Растительный материал помещали в керамические ступки с пестиком, которые в дальнейшем замораживали в течение двух часов при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Затем растирали растительный материал и переносили в предварительно взвешенные микропробирки на 1,5 мл (эппендорфы). Взвешивали массу растительного порошка и проводили процедуру выделения из него каучука с использованием полярных растворителей - дистиллированной воды и ацетона, а также неполярного растворителя гексана, основываясь на методах, описанных в литературе [Ramirez-Cadavid et al., 2017]. Всю процедуру выделения каучука проводили при комнатной температуре. Модифицированный нами способ микровыделения каучука из растительного материала состоял в следующем. В растительный порошок добавляли 1 мл дистиллированной воды, перемешивали образцы в течение 30 минут, центрифугировали 12 тыс. об./мин. в течение 20 мин., надосадов удаляли. Процедуру водной экстракции проводили дважды для более полного удаления водорастворимых компонентов. Затем в образцы добавляли по 1 мл ацетона и перемешивали их в течение 3 часов (на встряхивателе «Ротамикс»), центрифугировали при 12 тыс. об./мин., в течение 20 мин., надосадов удаляли. Таким образом, из растительного порошка убирали водный и ацетоновый

экстракты, а каучук благодаря его переходу при сушке в коагулированное состояние и нерастворимость в полярных растворителях преимущественно продолжал оставаться в этих образцах. Последующую экстракцию каучука проводили при помощи гексана, который добавляли в количестве 1 мл, образцы перемешивали 16 часов (на встряхивателе «Ротамикс»). Затем образцы центрифугировали при 12 тыс./об. мин., в течение 20 мин., надосадов переносили в новые заранее взвешенные микропробирки на 1,5 мл. Гексановый экстракт высушивали в термостате при  $+50^{\circ}\text{C}$  в течение 2,5 часов в вытяжном шкафу. Определяли массу высушенного экстракта. Результаты выражали в виде процента гексанового экстракта к сухой массе растительного материала. Выборка составила 3 образца для каждой линии анализируемых корней. Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни.

#### Результаты исследования

В целом в экспериментальной работе по генетической трансформации было использовано 143 растения, растущих в условиях *in vitro*, из которых в течение одного месяца индуцировалось 62 предположительно волосовидных корней (рис. 1а, б). Через один месяц культивирования совместно с материнским растением некоторые предположительно волосовидные корни из-за интенсивного роста занимали большую площадь чашки Петри (рис. 1в, г). На этом этапе для дальнейшей работы были отобраны 37 хорошо растущих линий корней. Апикальные части этих корней пересаживались на чашки Петри для предварительного наблюдения. 25 линий корней продолжали интенсивно расти и в изолированной культуре. При этом наблюдалась спонтанная регенерация побегов и плагиотропный рост, характерный для волосовидных корней (рис. 1д). Далее эти 25 линий корней были пересажены на жидкую среду МС и культивировались на орбитальном шейкере при постоянном перемешивании при температуре  $+25^{\circ}\text{C}$  (рис. 1е). В течение 1 месяца такого культивирования 13 линий корней прекратили рост, потемнели и погибли. В итоге осталось 12 линий предположительно волосовидных корней. Необходимо отметить, что нами также в изолированных культурах выращивались корни кок-сагыза дикого типа, однако они не росли в таких условиях и погибали уже через 1 неделю культивации. Далее все 12 отобранных линий предположительно волосовидных корней высушивали, выделяли из них ДНК и проводили ПЦР-анализ на наличие генов *rolA* и *rolB*.



Рис. 1. Получение волосовидных корней кок-сагыза: а, б – индукция волосовидных корней на гипокотылях кок-сагыза через две недели после инокуляции агробактериями. в, г – разрастание волосовидных корней через 1 месяц после инокуляции агробактериями. д – рост изолированных культур волосовидных корней на агаризованной среде МС. е – рост изолированных культур волосовидных корней на жидкой среде МС.

Fig. 1. Obtaining of kok-saghyz hairy roots:

а, б - induction of hairy roots on hypocotyls of kok-saghyz two weeks after inoculation with *Agrobacteria*. в, г - growth of hairy roots 1 month after inoculation with *Agrobacteria*. д - growth of isolated cultures of hairy roots on agar MS medium. е - growth of isolated cultures of hairy roots in liquid MS medium.

ПЦР-анализ показал, что все 12 линий корней содержат гены *rolA* и *rolB* (рис. 2а). Однако две линии корней при этом оказались ПЦР-положительными по гену под номером WP\_034523040 (рис. 2б). Это может означать наличие агробактериальной контаминации, поэтому эти две линии корней в дальнейшей работе не использовались.

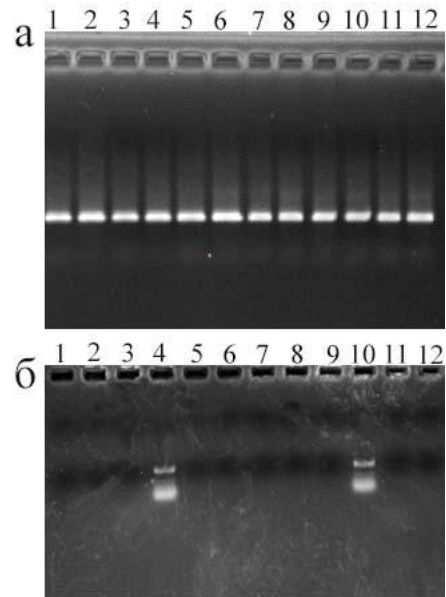


Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа волосовидных корней. а – электрофореграмма результатов ПЦР на наличие генов *rolA* и *rolB*. б - электрофореграмма результатов ПЦР на наличие хромосомного гена *A. rhizogenes*. 1-12 – номера образцов предположительно волосовидных корней.

Fig. 2. Results of PCR analysis of hairy roots. а - electrophoregram of PCR results for the presence of *rolA* and *rolB* genes. б - electrophoregram of PCR results for the presence of the chromosomal gene of *A. rhizogenes*. 1-12 - numbers of samples of putative hairy roots.

Десять отобранных линий волосовидных корней далее были пронумерованы от 1 до 10 и использовались для выделения из них гексанового экстракта. В качестве контроля были использованы корни кок-сагыза дикого типа, выращенные на агаризованной среде МС в условиях *in vitro*. Также гексановый экстракт выделяли из адвентивных корней кок-сагыза, которые спонтанно образовывались на гипокотылях по ходу эксперимента, но фенотипически не были похожи на волосовидные и не росли в изолированной культуре. Содержание гексанового экстракта в адвентивных корнях кок-сагыза составило в среднем 2,3% (рис. 3). В корнях дикого типа *in vitro* содержалось в среднем 2,7% каучукоподобных веществ (такое название используется в связи с тем, что качественный анализ выделяемого каучука не проводился). Что касается волосовидных корней, то для всех десяти линий было характерно гораздо большее содержание гексанового экстракта. Наибольшее содержание каучукоподобных веществ было обнаружено у линии 10, для которой оно составило 10,5% в среднем на сухую массу (рис. 3). Наименьшее содержание гексанового экстракта было

характерно для линии 6, однако даже у этой линии оно было достоверно больше, чем в адвентивных корнях и корнях дикого типа кок-сагыза, растущих в условиях *in vitro*. В среднем для всех линий волосовидных корней содержание каучукоподобных

веществ составило 7,5%. Это в среднем в 3,3 раза больше, чем в адвентивных корнях кок-сагыза и в 2,7 раза больше, чем в корнях дикого типа, растущих в условиях *in vitro*.

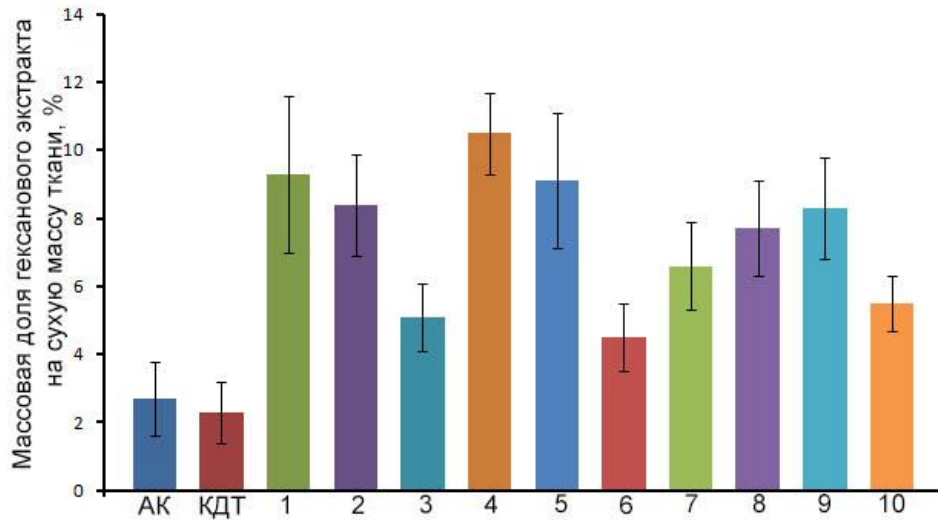


Рис. 3. Содержание гексанового экстракта в корнях кок-сагыза выращенных в условиях *in vitro* на сухую массу.

АК – адвентивные корни; КДТ – молодые корни дикого типа (*in vitro*); 1-10 – линии волосовидных корней.

Fig. 3. The content of hexane extract in the roots of kok-saghyz grown *in vitro* on dry weight. АК - adventitious roots; КДТ - wild type young roots (*in vitro*); 1-10 - lines of hairy roots.

Все проанализированные в работе 10 линий волосовидных корней использовались для дальнейшей пересадки их апикальных частей на свежую среду МС. В течение 1 месяца эти корни также продолжали рост, однако к концу этого срока начинали темнеть. Еще через 1-2 недели потемневшие волосовидные корни переставали расти и постепенно погибали. Для преодоления этой проблемы нами были использованы добавки в среду активированного угля и аскорбиновой кислоты, однако это не приводило к положительным результатам. Все изучаемые линии волосовидных корней в итоге погибли в течение 5-6 недель культивирования.

### Обсуждение

Кок-сагыз можно выращивать в полевых условиях, на гидропонике или в виде культур волосовидных корней. Однако оставалось неизвестным, способны ли последние к накоплению полиизопренового каучука. Ранее нами с использованием такого же гексанового метода выделения каучука было показано, что для кок-сагыза, выращенного в полевых условиях (опытный участок УФИЦ РАН в Уфе), содержание каучукоподобных веществ в среднем составляет 4,9% [Кулуев и др.

(Kuluev et al., 2019)]. В той экспериментальной работе максимальное содержание гексанового экстракта в корнях кок-сагыза достигало 8%. Сейчас нами было показано, что молодые корни кок-сагыза в условиях *in vitro* накапливают каучукоподобные вещества примерно в 2 раза меньше, чем корни, растущие в почве. С другой стороны волосовидные корни содержали в среднем в 1,5 раза больше гексанового экстракта, чем корни кок-сагыза, выращенных на опытном участке. Нельзя исключить того, что причиной большего содержания каучукоподобных веществ в волосовидных корнях является функционирование *rol*-генов. Действительно, адвентивные корни кок-сагыза растущие в тех же условиях накапливали в 3,3 раза меньше гексанового экстракта. Таким образом, полученные нами данные говорят о том, что волосовидные корни кок-сагыза могут продуцировать каучукоподобные вещества, вероятнее всего даже в больших количествах, чем корни, выращенные в полевых условиях. Это может говорить о перспективности реализации идеи выращивания волосовидных корней кок-сагыза в биореакторах для получения натурального каучука. Однако на сегодняшний день качество каучука волосовидных корней кок-сагыза остается неизвестным, как

минимум следует определить его молекулярную массу. Другой нерешенной проблемой является то, что все полученные нами линии волосовидных корней погибли в течение двух месяцев культивирования. Нельзя исключать того, что причиной гибели этих волосовидных корней был продуцируемый ими же каучук. Для ответа на все эти вопросы необходимо продолжение исследований волосовидных корней кок-сагыза и их вторичных метаболитов, включая инулин, который тоже представляет большую ценность [Сербаева и др. (Serbaeva et al.), 2020].

Работа выполнена с использованием оборудования РЦКП «Агидель» и УНУ «КОДИНК» в рамках госзадания АААА-А19-119021190011-0 при поддержке грантов Главы Республики Башкортостан (проект 7ГР) и УМНИК (договор №15721ГУ/2020).

### Литература

1. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Чемерис А.В. Гидропонное и аэропонное выращивание одуванчика *Taraxacum kok-saghyz* Rodin // Биомика. 2017. Т. 9. №2. С. 96–100.
2. Кулуев Б.Р., Мулдашев А.А., Минченков Н.Д., Чемерис А.В. Поиск потенциальных каучуконосов во флоре Республики Башкортостан // Растительные ресурсы. 2019. Т. 55, № 3. С. 317–333. doi:10.1134/S0033994619030105
3. Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р., Якупова А.Б., Сагитов А.М., Чемерис А.В. Рост культур бородатых корней в колбах и прототипах биореакторов дождевального типа. Естественные и технические науки. 2020. №4. С. 19–31.
4. Половенко И.С., Филиппов Д.И., Правдин Ф.Н., Фурман Л.М. Кок-сагыз. Москва: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы. 1950. 167 с.
5. Сербаева Э.Р., Якупова А.Б., Магасумова Ю.Р., Фархутдинова К.А., Ахметова Г.Р., Кулуев Б.Р. Инулин: природные источники, особенности метаболизма в растениях и практическое применение // Биомика. 2020. Т.12. С. 57–79. doi:10.31301/2221-6197.bmcs.2020-5
6. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. Plant Root. 2017. V. 11. P. 64–69. doi:10.3117/plantroot.11.64
7. Ramirez-Cadavid D.A., Cornish K., Michel F.C. Jr. *Taraxacum kok-saghyz* (TK): compositional analysis of a feedstock for natural rubber and other bioproducts. Industrial Crops and Products. 2017. V. 107. P. 624–640. doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.043
8. Zhang N., Guo T., Ma X. Rational rubber extraction and simultaneous determination of rubber content and molecular weight distribution in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin by size-exclusion chromatography. Chromatographia. 2019. V. 82. P. 1459–1466. doi:10.1007/s10337-019-03773-2

### References

1. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. Plant Root. 2017. V. 11. P. 64–69. doi:10.3117/plantroot.11.64
2. Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Chemeris A.V. Hydroponic and aeroponic growing of Russian dandelion *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. Biomics. 2017. V. 9. N. 2. P. 96–100.
3. Kuluev B.R., Muldashev A.A., Minchenkov N. D., Chemeris A. V. Searching for potential rubber-bearing plants in the flora of the Republic of Bashkortostan. Rastitelnye resursy. 2019. V. 55. No. 3. P. 317–333.
4. Musin Kh.G., Kuluev B.R., Yakupova A.B., Sagitov A.M., Chemeris A.V. Growth of cultures of hairy roots in flasks and prototypes of bioreactors of sprinkling type. Natural and technical sciences (Yestestvennyye i tekhnicheskiye nauki). 2020. No. 4. P. 19–31.
5. Polovenko I.S., Filippov D.I., Pravdin F.N., Furman L.M. *Kok-saghyz*. Moscow: State Publishing House of Agricultural Literature. 1950. 167 p.
6. Ramirez-Cadavid D.A., Cornish K., Michel F.C. Jr. *Taraxacum kok-saghyz* (TK): compositional analysis of a feedstock for natural rubber and other bioproducts. Industrial Crops and Products. 2017. V. 107. P. 624–640. doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.043
7. Serbaeva E.R., Yakupova A.B., Magasumova Yu.R., Farkhutdinova K.A., Akhmetova G.R., Kuluev B.R. Inulin: natural sources, features of metabolism in plants and practical application Biomics. 2020. V.12(1). P. 57–79. doi:10.31301/2221-6197.bmcs.2020-5
8. Zhang N., Guo T., Ma X. Rational rubber extraction and simultaneous determination of rubber content and molecular weight distribution in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin by size-exclusion chromatography. Chromatographia. 2019. V. 82. P. 1459–1466. doi:10.1007/s10337-019-03773-2