

КОК-САГЫЗ (*TARAXACUM KOK-SAGHYZ* RODIN): МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КАУЧУКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Кулуев Б. Р.¹, Минченков Н. Д.², Гумерова Г. Р.¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН,
450054, Россия, Уфа, пр. Октября, д. 71;
✉ kuluev@bk.ru

²Гимназия № 39, 450077, Россия, Уфа, ул. Достоевского, д. 67

Натуральный каучук является стратегическим природным сырьем, который широко применяется при производстве шин, военной техники, в медицине и в других отраслях. Около 90% добычи каучука высокого качества приходится на *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. Однако этот природный источник каучука весьма уязвим к грибным заболеваниям. Синтетический каучук уступает по физико-химическим и механическим свойствам натуральному, в связи с чем существует необходимость в поиске альтернативных источников данного сырья. Наиболее перспективным альтернативным гевеем каучуконосом является одуванчик кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin). В его корнях накапливается каучук, не уступающий по качеству гевейному, содержание которого у высокопродуктивных линий достигает 27% к сухой массе корней. В связи с этим целью данной статьи является описание хозяйственно ценных компонентов *T. kok-saghyz*, некоторых методов выделения натурального каучука из корней этого растения, а также подходов по микроклональному размножению и генетической трансформации кок-сагыза и близких видов. В СССР в середине XX века в основе промышленного метода выделения каучука из кок-сагыза лежала предварительная обработка корней 2% раствором щелочи, которая может оказывать негативное влияние на качество каучука. Поэтому разработка новых, но в то же время недорогих промышленных методов выделения каучука из корней кок-сагыза весьма актуальна. Одновременно в некоторых странах мира ведется селекционная работа, направленная на увеличение как размеров корней кок-сагыза, так и содержания каучука в них. В связи с этим возникает необходимость в разработке лабораторных экспресс-методов выделения каучука. Нами был отработан и оптимизирован лабораторный метод выделения каучука из сухой растительной ткани при помощи воды и ацетона, с финальной экстракцией гексаном. Разработанный нами протокол экстракции каучука показал результаты, сопоставимые с литературными данными. Для выведения более продуктивных форм проводятся также эксперименты по микроклональному размножению и генетической трансформации кок-сагыза, однако число таких работ пока небольшое, что, видимо, связано с низкими регенерационными способностями данного вида одуванчиков.

Ключевые слова: натуральный каучук, *Taraxacum kok-saghyz*, инулин, экстракция каучука, микроклональное размножение, волосовидные корни, трансгенные растения.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-2-33-43>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

RUSSIAN DANDELION (*TARAXACUM KOK-SAGHYZ* RODIN): RUBBER EXTRACTION METHODS AND PROSPECTS FOR BIOTECHNOLOGICAL METHODS APPLICATION

Kuluev B. R.¹, Minchenkov N. D.², Gumerova G. R.¹

¹Institute of Biochemistry and Genetics
of the Ufa Research Center of RAS,
71 Prospect Oktyabrya, Ufa 450054, Russia;
✉ kuluev@bk.ru

²Ufa Gymnasium No. 39, 67 Dostoevsky St., Ufa 450077, Russia

Natural rubber is a strategic natural raw material, which is used in the production of tires and military equipment, in medicine and other industries. An alternative to *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. and the most promising rubber plant is the Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin). The rubber that accumulates in the roots of this dandelion is not inferior in quality to the natural rubber from *H. brasiliensis*, and its content reaches 27% of the dry weight of roots. The purpose of this paper is to describe the economically important components of *T. kok-saghyz* roots, the main methods for extracting natural rubber from the roots, as well as the approaches to micropropagation and genetic transformation of *kok-saghyz* and related species. In the middle of the 20th century, the industrial method of isolating rubber from Russian dandelion in the USSR was based on preliminary treatment of the roots with a 2% solution of alkali, which could negatively affect rubber quality. Therefore, it is important to develop new, rapid, but at the same time, inexpensive methods of rubber extraction from *T. kok-saghyz*. Some of them are considered in this paper. The breeding of Russian dandelion should be aimed at both increasing the root size and the content of rubber. In this regard, the development of laboratory express methods for rubber extraction is also important. The authors have developed and optimized a method for extracting rubber from dry plant tissue using polar solvents (water and acetone), with the final extraction with a non-polar solvent (hexane). The developed rubber extraction protocol showed results comparable to the literature data. In order to create more productive plant forms, experiments are also being conducted on *T. kok-saghyz* micropropagation and genetic transformation. However, the number of such works is still very small, probably due to the low regenerative abilities of this dandelion species.

Keywords: natural rubber, *Taraxacum kok-saghyz*, inulin, rubber extraction, micropropagation, hairy roots, transgenic plants.

Для цитирования: Кулуев Б. Р., Минченков Н. Д., Гумерова Г. Р. Кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin): методы выделения каучука и перспективы использования биотехнологических подходов. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(2):33-43. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-33-43

For citation: Kuluev B. R., Minchenkov N. D., Gumerova G. R. Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin): rubber extraction methods and prospects for biotechnological methods application. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(2):33-43. (In Russ.) DOI: 10.30901/2658-6266-2019-2-33-43

ORCID:

Гумерова Г. Р. orcid.org/0000-0003-2789-174X

Кулуев Б. Р. orcid.org/0000-0002-1564-164X

УДК 58.08:633.91

Поступила в редакцию: 07.02.2019

Принята к публикации: 11.06.2019

Введение

Натуральный каучук на сегодняшний день является незаменимым сырьем, прежде всего для шинной промышленности, где его доля в составе смеси для легкой покрышки составляет 15–20%, а для грузовой доходит до 85% (Chaldaeva, Khusainov, 2013). Достоинство натурального каучука в отличие от синтетического – его высокая износостойкость и способность выдерживать серьезные вертикальные нагрузки, что особенно важно для авиационных шин, которые делают исключительно из натуральной резины. Натуральный каучук также широко применяется в военной промышленности, медицине и многих других отраслях, поэтому в мире наблюдается постоянное увеличение спроса на данный вид природного сырья (Korzinov, 2008).

Основным источником натурального каучука в мире является гевея бразильская *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg., которая выращивается плантационным способом преимущественно в странах Юго-Восточной Азии (Kuluev et al., 2015). Российская империя начиная с XIX века, а затем и СССР полностью зависели от зарубежных поставщиков гевейного каучука. Но в 1931 году перед советскими учеными была поставлена задача провести поиск растений-каучуконосов на всей территории страны. В СССР в течение всего двух лет (1931–1932 гг.) на каучуконосность было исследовано 1048 видов растений из 316 родов, входящих в 95 семейств (Larin, 1936). Среди этих растений свыше 50 показали довольно высокое содержание каучука. Наибольший показатель наблюдался у кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz* Rodin), крым-сагыза (*T. hybernum* Steven) и тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) из семейства Asteraceae (Астровые). Из этих трех растений в СССР широко возделывался в промышленных масштабах только кок-сагыз. Первые исследования не показали существенной разницы между накоплением каучука у кок-сагыза и крым-сагыза, однако следует учесть, что кок-сагыз накапливал то же самое количество сырья за один вегетационный цикл, а крым-сагыз за два (Ignatiev, 1939). К тому же, крым-сагыз оказался более требователен к климату, чем кок-сагыз, так как может расти как многолетнее растение исключительно в средиземноморской зоне (Philippov et al., 1948; Polovenko et al., 1950).

Начиная с 2010-х годов в мире наблюдается новая волна интереса к кок-сагызу, особенно в США и Европе (Schmidt et al., 2010; Collins-Silva et al., 2012). Это связано как с потенциальной уязвимостью плантаций гевеи в Юго-Восточной Азии, прежде всего к грибным заболеваниям, так и привлекательной возможностью производства натурального каучука на больших территориях с умеренным климатом, что весьма актуально в условиях постоянного роста спроса на данный вид сырья (Garshin et al., 2016; Kuluev et al., 2017). Несмотря на большие

усилия по доместикации кок-сагыза (Luo et al., 2018), эти работы еще далеки от завершения. Потенциал по увеличению урожайности и улучшению качества каучука кок-сагыза пока еще не реализован. В связи с этим возрастает актуальность выбора методов выделения каучука и изучения его основных физико-химических свойств. Эти методы нужны для отбора наиболее продуктивных линий кок-сагыза, получаемых при использовании традиционных методов селекции, химического и радиационного мутагенеза, генетической трансформации и геномного редактирования (Iaffaldano et al., 2016). Целью данной статьи является описание хозяйственно ценных компонентов корней *T. kok-saghyz*, некоторых методов выделения каучука из этого растения, как в лабораторных условиях, так и в промышленных масштабах, а также подходов по микрোকлональному размножению и генетической трансформации кок-сагыза и близких видов. Также здесь приводится краткое описание разработанного нами протокола выделения каучука из корней кок-сагыза при помощи гексана.

Хозяйственно ценные компоненты корней кок-сагыза

В корнях кок-сагыза накапливается высококачественный каучук, причем содержание его по отношению к сухой массе корней по данным разных источников варьирует в довольно широких диапазонах: 12–15% (Polovenko et al., 1950), 2,98–27,89% (Keller, 1936), 6–24% (Kobelev, 1937), 10–27% (Pavlov, 1942). В 1940-е годы были также получены тетраплоидные формы кок-сагыза (Navashin, Gerasimova, 1941; Warmke, 1945; Navashin, Gerasimova-Navashina, 1951), однако они характеризовались в основном увеличенным размером корней и семян, тогда как по содержанию каучука высокие значения не были зафиксированы. В одной из недавних работ сообщается, что в однолетнем корне кок-сагыза (в сухом состоянии) содержится до 7,6% каучука (хлороформенный экстракт), до 35,9% водорастворимых углеводов (главным образом инулина), 25% смолы (ацетоновый экстракт) и около 54% некаучуковых компонентов (лигнин, белки, клетчатка и пр.) (Khairullin et al., 2014). Основным показателем высокого качества каучука является его молекулярная масса. Лучший растительный каучук с молекулярной массой около 1,3 млн г/моль получают из гевеи (Swanson et al., 1979). Такая же высокая молекулярная масса каучука (более 1 млн г/моль) характерна лишь для нескольких каучуконосных растений (Collins-Silva et al., 2012; Bushman et al., 2006), среди которых именно кок-сагыз занимает особое место, так как его каучук характеризуется высокой износостойкостью и это растение можно культивировать в условиях умеренного пояса.

Вторым по хозяйственной ценности компонентом кор-

ней кок-сагыза считается инулин. Это вещество является основной составляющей водного экстракта корней кок-сагыза, который можно отделить на первых стадиях выделения каучука. Инулин не переваривается в желудочно-кишечном тракте человека и относится к группе пищевых волокон, в связи с этим применяется в медицине в качестве пребиотика (Ladnova, Merkulova, 2008). Также инулин служит исходным материалом для промышленного получения фруктозы и этилового спирта. Для получения фруктозы инулин обрабатывается кислотами, а фруктоза, в свою очередь, при сбраживании дрожжами дает этиловый спирт, способ получения которого из корней кок-сагыза описывается в статье П. К. Бобкова (Bobkov, 1939). Этот метод основан на выделении инулина из разрезанных корней путем экстракции на диффузионной батарее (водная экстракция). Полученный диффузионный сок смешивают с кислотой, вызывая осахаривание инулина до фруктозы, затем фруктозу сбраживают в этанол. В свою очередь этанол может быть использован для производства одного из видов синтетического каучука – бутадиенового с формулой $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$. Первый этап – превращение этанола в бутадиен, второй – полимеризация бутадиена. Таким образом, корни кок-сагыза могут быть использованы не только для продуцирования натурального каучука, но и для получения искусственного каучука (рис. 1). После отделения инулина и каучука все растительные остатки от корней кок-сагыза можно использовать для изготовления кормовых добавок. Возможность одновременного получения из корней кок-сагыза каучука, инулина и кормовых добавок способствует повышению рентабельности промышленного выращивания данной культуры и переработки растительного материала. Однако ввиду того, что такие технологии обработки корней кок-сагыза до сих пор не реализованы, производство натурального каучука из одуванчиков как в России, так и в мире до сих пор считается менее рентабельным, чем выработка каучука из гевеи в тропических странах.

Технологии экстракции каучука из кок-сагыза для промышленности

Каучук в корнях кок-сагыза находится как в жидком некоагулированном состоянии в виде латекса, так и в твердом коагулированном состоянии в виде нитей (Keller, 1936, Koyalovich, 1939). Существуют методы получения каучука как путем его извлечения из латекса, так и путем непосредственного выделения из растительной ткани. Непосредственное выделение каучука из растительной ткани может быть проведено с помощью обработки органическими растворителями или разрушением клетчатки реактивами и последующей агломерацией каучука. Существуют также механические методы выделе-

ния каучука (Keller, 1936). В кок-сагызе основная часть каучука содержится в млечниках, пронизывающих ткани корня. Стенки клеток млечников состоят в основном из целлюлозы, гемицеллюлозы (связующие гликаны) и лигнина. При обработке корней кок-сагыза водой в диффузионной батарее из них выделяется большинство водорастворимых веществ, в первую очередь, инулин. Процесс выделения каучука в таком случае выглядит так: клетчатка и все остальные вещества, которые нужно отделить, растворяются, и каучук освобождается от примесей. На советских предприятиях для разрушения тканей растений чаще всего использовали гидроксид натрия (рис. 1). Гемицеллюлозы под воздействием щелочи гидролизуются до молочной, муравьиной и сахарной кислот. Лигнины растворяются в щелочи в виде натриевых соединений. При воздействии образующихся в ходе выделения кислот целлюлоза гидролизует до глюкозы, гемицеллюлозы – до сахара. Однако полного растворения кислотами и щелочами ненужных частей корня добиться невозможно. Но в целом такого разрушения тканей корня вполне было достаточно, чтобы отделить нити каучука. Поэтому вышеописанный метод был принят за основу в отечественном производстве. В то же время, по некоторым данным (Bobkov, 1939), щелочь все же отрицательно влияла на качество каучука и поэтому были предложены и другие подходы для обработки растительного материала.

К примеру, существуют еще методы отделения каучука, основанные на механическом разрушении тканей корня при помощи измельчителей и на микробиологическом разрушении (сбраживании) (Bobkov, 1939). При микробиологическом способе для обогащения сырья вводятся специальные микроорганизмы, разрушающие углеводы. В таком случае выделение инулина должно предшествовать экстракции каучука. В целом же были сделаны выводы о малоэффективности данного метода ввиду его длительности, примитивности существовавшей в то время технологии, а также того, что полученный каучук приобретал специфический неприятный запах, который невозможно было устранить даже в процессе дальнейшей обработки (Kogan, 1939).

В результате использования описанных выше методов экстракции после разрушения растительной ткани получается так называемая пульпа, содержащая каучук. Так, в пульпе содержалось углеводорода каучука (в % к сухим веществам) при щелочной подготовке – 8,9%, механическом измельчении – от 12 до 15%, микробиологической подготовке (сбраживании) – от 20 до 30% (Bobkov, 1939). Пульпа состоит из воды (96–97%), смол и каучука (до 1%), сухих веществ (2–3%). Каучук и смолы в пульпе содержатся в виде глобул. Удельный вес частиц каучука несколько меньше веса остатков ткани. Однако разница удельных весов настолько мала, что каучук вместе с другими частицами всплывает на поверхность. Для отделения каучука от частиц ткани корня пульпу центрифугируют (см. рис. 1), и она разделяется на три слоя: на стен-

ках барабана осаждаются частицы тканей корня, затем идет слой воды и на ее поверхности скапливается каучук. Каучук отделяют от остатков тканей и сушат в термостате и на вальцах.

Таким образом, исходя из приведенной выше информации, можно сформулировать общий алгоритм экстракции каучука из корней кок-сагыза, применявшийся в промышленности до середины XX века в СССР (см. рис. 1):

- 1) Промывка корней.
- 2) Нарезка корней.
- 3) Отделение латекса, в котором содержится до 30% некоагулированного каучука. Пропуск данного этапа выделения приводил к большим потерям каучука при экстракции. Методики отделения латекса в промышленности СССР были основаны на разрезании корня на тонкие пластинки и естественном стекании латекса с периодическим встряхиванием. «Большая энциклопедия нефти и газа» (<http://ngpedia.ru/>) предлагает использовать следующий метод более эффективного выделения латекса из кок-сагыза. Чисто отмытые свежие корни кок-сагыза режут поперек на куски тол-

щиной 1 см. Эти куски помещают в мешалку, наполненную так называемой приемочной жидкостью, являющейся 1%-ным водным раствором аммиака NH_3 с небольшим количеством защитных веществ – декстрина, казеина, агара, альбумина или экстракта мыльного корня. Под действием естественного тургора латекс выделяется из нарезки в раствор. Но это выделение является неполным, так что приемочную жидкость несколько раз меняют, чтобы добиться полного извлечения латекса. Этот раствор, ввиду малой концентрации растворенных веществ, неудобен для дальнейшего выделения из него каучука, поэтому он подвергается концентрированию в молочном сепараторе. Полученный концентрат содержит 40% сухого вещества.

4) Четвертый этап заключается в отделении водорастворимых веществ, среди которых особое место занимает инулин (см. рис. 1).

5) Разрушение тканей корня щелочью.

6) Центрифугирование и отделение каучука.

7) Сушка каучука на вальцах или в термостате.

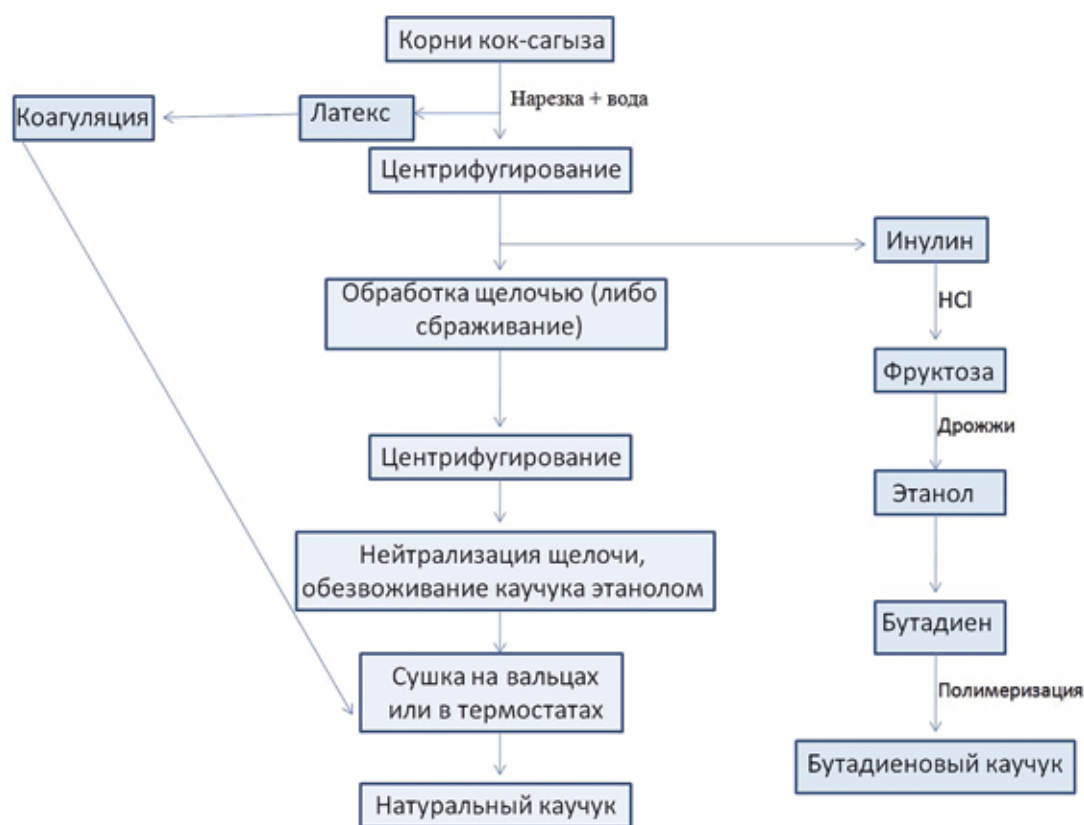


Рис. 1. Общая схема получения из корней кок-сагыза натурального каучука, инулина, фруктозы, этилового спирта и бутадиенового каучука в промышленных масштабах

Fig. 1. General diagram of natural rubber, inulin, fructose, ethyl alcohol and butadiene rubber industrial production from *kok-saghyz* roots

Из-за неблагоприятного влияния щелочи на свойства получаемого каучука, еще в 30-е годы XX века велись исследования по разработке методов экстракции каучука полярными и неполярными растворителями (Tverskaya, Iossa, 1938). Различные органические растворители начали применять для экстракции каучука еще в XIX веке. К примеру, в качестве экстрагентов каучука использовали бензин, сероуглерод, толуол (Keller et al., 1936). При этом предлагалась предварительная обработка исходного сырья соляной кислотой, аммиачным раствором окиси меди и хлористым цинком для лучшего растворения клетчатки. В недавнем исследовании (Rzymiski, 2014) для выделения каучука из кустарника гваюлы (*Parthenium argenteum* L.) использовали ацетон (полярный растворитель), в котором каучук не растворяется, ацетонитрил (среднеполярный растворитель) и циклогексан (неполярный растворитель), в которых каучук растворяется. Похожий подход был использован также для выделения каучука из молочая *Euphorbia characias* L. (Spano et al., 2012). Учитывая общую схожесть химических составов клеток растений, можно предположить, что эти методы подойдут и для кок-сагыза, к тому же в гваюле каучук, как и часть каучука в кок-сагызе, накапливается в паренхиме. В цитируемом исследовании (Rzymiski, 2014) также описаны интересные способы сушки растительной ткани, что необходимо для перевода всего каучука в коагулированное состояние. В начале предлагается проведение лиофилизации при температуре -80°C , затем последовательная сушка в печи при температуре 60°C и при комнатной температуре. D. Ramirez-Cadavid et al. (2017) предлагают разрезать корни кок-сагыза на небольшие куски (2 см) и сушить их в течение 4–7 дней в воздушной печи при температуре 50°C . Благодаря такому способу высушивания, из 752 кг свежих корней получалось 188 кг сухих.

Стоит отметить, что работа с сушеными и со свежими корнями имеет как свои достоинства, так и недостатки. Работая с сухими корнями, можно миновать этап выделения латекса, так как весь каучук в данном случае находится в коагулированном состоянии, что позволяет экономить реактивы и ускорить технологический процесс. С другой стороны, на сушку корней уходит довольно много времени и энергии для работы воздушных печей или термостатов. К тому же повышение температуры может неблагоприятно влиять на свойства каучука.

Процесс выделения каучука из сухих корней идет в два этапа. В первом пробу ткани смешивают с ацетоном (полярный растворитель) и центрифугируют, во втором – с циклогексаном (неполярный растворитель). Центрифугирование после обработки ацетоном длится пять минут, при этом каучук в ацетоне не растворяется. Исследования проводились при температуре от 24 до 100°C . Экспериментальные исследования W. Rzymiski (2014) также показали, что ацетон должен быть комнатной температуры, а циклогексан нагрет до температуры 100°C . Кроме

того, было установлено, что обработка тканей растений кипящей водой вызывает деградацию каучука, что является еще одним доказательством того, что классический щелочной метод экстракции каучука требует альтернативы. Показано, что для более полного разрушения тканей и растворения некаучуковых компонентов один и тот же растительный материал следует обрабатывать ацетоном трижды (Ramirez-Cadavid et al. 2017).

Еще один способ получения пульпы (блендерный) описан в исследовании (Buranov, Elmuradov, 2010) и заключается в следующем. В течение двух дней после сборки урожая корни кок-сагыза разрезают на части массой примерно 0,5 г. Куски корней помещали в блендер, содержащий 90 мл холодного водного экстракционного буфера ($0,1\%$ Na_2SO_3 и $0,2\%$ NH_3) и измельчали в течение 30 секунд. Затем суспензию фильтровали через сетку диаметром 1 мм. Оставшиеся на сетке частицы вновь измельчали в таком же растворе и фильтровали. Полученный гомогенат центрифугировали и осаждение частиц происходило так же, как описано в исследовании П. К. Бобкова (Bobkov, 1939).

Как говорилось выше, в кок-сагызе до 30% всего каучука содержится в виде латекса (Koyalovich, 1939), и он может теряться в процессе рассмотренного метода выделения при использовании сырых корней. Самый простой метод получения каучука из латекса практикуется при выращивании гевеи и заключается в следующем: собранный латекс заливают в неглубокий поддон и отстаивают в течение одной недели. В результате отстаивания латекс превращается в плотную массу, которую потом пропускают через пресс, чтобы отжать воду. Полученные листы каучука сушат несколько часов в тени, в процессе чего каучук окисляется и коричневеет.

В настоящее время наибольшее распространение получил способ выделения каучука из латекса на лентоотливочной машине, похожей на установку, которую используют при производстве бумаги. В этом процессе латекс с антиокислителями и коагулянтами (CaCl_2 , CH_3COOH и др.) проходит через короткую трубу диаметром 2,5 см при температуре 40°C , в которой и происходит коагуляция. После этого смесь поступает на крутящуюся стальную ленту с множеством мелких отверстий (примерно 400 на 1 см^2). Жидкие вещества просачиваются через них, а каучук остается на ленте.

Специально для кок-сагыза был разработан метод радиокоагуляции латекса (Sandomirskij, 1938). Этот метод основан на том, что при воздействии на латекс высокочастотным электрическим полем, он начинает нагреваться и частицы каучука переходят в быстрые колебательные движения, в результате чего происходит коагуляция. Основным достоинством этого способа является то, что он достаточно экономичен и не требует использования химикатов, вредных как для структуры глобул каучука, так и для работников производства.

Лабораторные методы определения содержания каучука в корнях кок-сагыза

Современная селекция каучуконосов направлена, в том числе, на повышение содержания в них каучука. Чтобы определить среднюю урожайность растений, нужно взять множество препаратов тканей с разных экземпляров и исследовать их в короткий срок. В 1935 году сотрудником Устиновской НИС П. А. Столбиным был предложен экспресс-метод количественного определения каучука (Koyalovich, 1939). Суть этого метода состоит в обработке сырых отрезков корней весом в 1,2 грамма в 3-процентном растворе щелочи, растиранием отрезков на стекле, обработке в течение четырех часов концентрированной H_2SO_4 , нейтрализации кислоты 3% раствором щелочи в течение ночи, промывке, сушке пленок в термостате при температуре $70^\circ C$ и взвешивании. Во всех случаях проверки этого метода были получены сильно заниженные результаты. Во-первых, это происходило вследствие того, что автор работал с сырыми отрезками корней, не учитывая потерю каучука в виде латекса. Во-вторых, H_2SO_4 , используемая для разрушения клетчатки, плохо влияет на каучук, окисляя его. В результате этого до 93,5% каучука переводится в хрупкий порошок, состоящий из двух частей – растворимой и нерастворимой в ацетоне. Растворимая часть имеет состав $C_{20}H_{30}O$, а нерастворимая – $C_{10}H_{16}$ (Koyalovich, 1939).

Все корни кок-сагыза могут быть разделены на три группы – с одним стержневым корнем, со стержневыми и боковыми корнями и с мочковатой корневой системой. Известно, что разные части корня содержат неодинаковое

количество каучука, поэтому, чтобы получить наиболее точные результаты нужно исследовать такой участок корня, где содержание каучука наиболее приближено к общему проценту. Поэтому были разработаны методы взятия средней пробы, которые сводятся к следующему (Koyalovich, 1939):

1) В случае использования корневой системы с выраженным стержневым корнем он делится на три части и берется средняя.

2) У растений с мочковатой корневой системой берутся 3-4 корешка, также делятся на три части, и исследуется средняя.

3) Конечный результат представляет собой среднее арифметическое из всех проанализированных проб.

Выбор средней части объясняется тем, что участки из корневой шейки содержат наименьший процент каучука, нижние – наибольший. Кроме того, в боковых корешках процент каучука всегда выше (Koyalovich, 1939). Взятые изложенным выше способом средние отрезки подвергаются сушке в термостате при температуре $50^\circ C$. Сушка является обязательной, так как, во-первых, вызывает полную коагуляцию каучука, оставшегося в виде латекса, а, во-вторых, позволяет хранить пробы неопределенно долгое время. Процесс извлечения каучука из высушенных проб состоит из стадий обработки 3% щелочью, прогрева в кипящей водяной бане, нейтрализации на часовом стекле соляной кислотой, обезвоживания при помощи 96% этилового спирта и сушки в термостате при $50^\circ C$. Количество каучука в заданном объеме можно также определять в ацетонитриловом растворе посредством метода измерения поглощения УФ-лучей (Rzymiski, 2014).

Исходя из литературных данных следует, что наибо-



Рис. 2. Выращивание кок-сагыза на опытном участке ИБГ УФИЦ РАН: а – розетка листьев кок-сагыза; б – общий вид растения; в – корни кок-сагыза.

Fig. 2. *Kok-saghyz* grown at an experimental plot of IBG UFRC RAS: a – rosette of leaves; b – general view of the plant; c – *kok-saghyz* roots.

лее подходящими лабораторными методами выделения каучука являются технологии последовательного применения различных растворителей. Нами, к примеру, был отработан метод гексановой экстракции каучука из корней одуванчиков в лабораторных условиях. В течение двух лет мы выращиваем кок-сагыз в опытном участке Института биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН (ИБГ УФИЦ РАН) (рис. 2а, б). Наши исследования проводятся с целью доместикации кок-сагыза, увеличения размеров корней и повышения содержания каучука в них методами классической селекции. В этой связи нами была поставлена задача разработать протокол для лабораторного выделения каучука из корней этого растения.

Для процедуры выделения каучука осенью у растений кок-сагыза откапывали корни (рис. 2в) и высушивали их при комнатной температуре в течение трех недель, размельчали ножницами, замораживали в фарфоровой ступке с пестиком при температуре -80°C . Далее корни растирали до порошкообразного состояния и переносили в пробирки эппендорф (1,5 мл), затем взвешивали сухую массу порошка корней. В растительный порошок добавляли 1 мл дистиллированной воды, перемешивали образцы в течение 30 минут, центрифугировали при 12 тыс. об./мин в течение 20 мин., надосадочную жидкость 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, надосадочную жидкость 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, надосадочную жидкость переносили в новые заранее взвешенные микропробирки объемом 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. При этом надо учитывать, что в гексановом экстракте содержание каучука составляет в среднем 80% (Keller, 1936), то есть окончательный продукт обычно содержит примеси. Также надо иметь в виду, что отработанный нами метод не подходит для работы с сырыми корнями, так как при этом некоагулированный каучук будет теряться вместе с латексом.

Нами было показано, что однолетние растения кок-сагыза, выращенные на опытном участке ИБГ УФИЦ РАН,

накапливают в корнях в среднем 5% каучука (гексановый экстракт) на сухую массу корней. В целом в рамках всего эксперимента содержание каучука в разных корнях варьировало от 3,4 до 10,5%. Согласно литературным данным, содержание каучука на сухую массу корней в однолетней культуре кок-сагыза варьирует от 2,7 до 11,5% (Filipov et al., 1948). Исходя из этого, мы заключили, что используемый нами протокол выделения каучука из корней кок-сагыза дает результаты, довольно близкие с описанными в литературе.

В дальнейшем, используя вышеописанный метод, мы выделили каучук из 15-ти крупных корней кок-сагыза и получили шар диаметром 1,7 см (рис. 3) который по всем внешним признакам проявлял качества натурального каучука: эластичность, пластичность, прыгучесть, нерастворимость в воде и этаноле. Модификации предложенного нами метода должны быть направлены на уменьшение количества примесей в выделяемом каучуке, что может быть осуществлено дополнительными стадиями очистки при помощи этилового спирта, ацетона и других полярных растворителей. Таким образом, представленный нами гексановый метод микровыделения каучука в будущем (при дальнейших улучшениях) может быть предложен для лабораторных исследований каучуконосных растений, однако вряд ли подойдет для промышленности ввиду относительной дороговизны используемых реактивов.



Рис. 3. Шар из гексанового экстракта, полученный из 15-ти корней кок-сагыза. Масштаб: 1 см

Fig. 3. Ball of hexane extracted from 15 roots of *T. kok-saghyz*. Scale: 1 cm

Культивирование *in vitro* и генетическая трансформации растений рода *Taraxacum* L.

Для успешной доместикации и выведения культурных сортов кок-сагыза кроме методов экспресс-анализа содержания каучука также существует необходимость в разработке методов микрклонального размножения и генетической трансформации данного вида растений. Культивирование изолированных тканей и органов на искусственных питательных средах в регулируемых асептических условиях является важным этапом в биотехнологии каучуконосных растений, поскольку открывает новые возможности для их прикладных и фундаментальных исследований. *In vitro* системы растений являются удобными модельными объектами для изучения сложных механизмов, лежащих в основе клеточной дифференциации, органогенеза, соматического эмбриогенеза и т. д. Возможность получения целых растений (регенерантов) из трансформированной культуры клеток или тканей является ключевым этапом в современной генной инженерии и биотехнологии растений. В этой связи, способам легко воспроизводимого *in vitro* культивирования целевых растений уделяется особое внимание. Однако по отношению к представителям рода *Taraxacum* в литературе имеются весьма немногочисленные данные по культивированию изолированных тканей.

В первых работах по индукции каллусогенеза использовали изолированные корневые экспланты *T. officinale* F. H. Wigg. (Bowes, 1970, 1971; Booth, Satchuthananthavale, 1974), на которых изучали влияние различных фитогормонов на эффективность каллусогенеза и органогенеза (листьев и корней). В большинстве случаев из таких каллусов регенерировали тератоматозные побеги, поэтому дальнейшие исследования были направлены именно на получение здоровых побегов. В связи с ограниченностью природного растительного сырья, в первую очередь, для биотехнологических целей необходима разработка эффективного способа *in vitro* микроразмножения. Так, с использованием оптимального соотношения ауксинов и цитокининов были получены регенеранты *T. mongolicum* Hand.-Mazz из корневой культуры (Song et al., 1999) и листовых эксплантов (Grout., 2010), *T. platycarpum* Dahlst также из корневой культуры (Lee et al., 2004) и листовых эксплантов (Bae et al., 2005), *T. officinale* из каллусной ткани (Jamshieed et al., 2010) и из листовых и черешковых эксплантов (Кныазев et al., 2007). Недавно было проведено разностороннее изучение регенерационной способности разных типов эксплантов (листьев, черешков и корней), полученных из *in vivo* и *in vitro* растений *T. officinale* в результате воздействия различных комбинаций фитогормонов (Rawat et al., 2018). Результаты этого исследования показали, что черешки из *in vitro* растений являются наиболее пригодными для прямого органогенеза, в то время как для

непрямого более предпочтительными являются корневые экспланты. Сообщается также о том, что и для кок-сагыза ведутся работы по разработке методов микрклонального размножения (Gavrilova et al., 2015), однако авторы не сообщают, какие для этого были использованы питательные среды и концентрации фитогормонов. По нашим собственным неопубликованным данным, кок-сагыз гораздо менее отзывчив к стимуляции микрклонального размножения в отличие от *T. officinale*, *T. brevicorniculatum* Korol. и *T. hybernum*.

Получение и дальнейшее культивирование трансгенных волосовидных (бородатых) корней (hairy roots), индуцированных в результате заражения *Agrobacterium rhizogenes*, является особой перспективной технологией для масштабного биотехнологического производства корневых метаболитов. Такой большой интерес обусловлен появлением у трансформированной корневой культуры способности к неограниченному изолированному росту на безгормональной среде и сверхпродукции корневых метаболитов. В случае с кок-сагызом, это в первую очередь каучук и инулин. В первых работах по индукции волосовидных корней растений рода *Taraxacum* использовали различные типы эксплантов *T. platycarpum*, которые инфицировали штаммом 15834 *A. rhizogenes* (Lee et al., 2004). Выяснилось, что эффективность трансформации была наиболее высокой при использовании корневых эксплантов по сравнению со стеблевыми или семядольными листьями. Также было показано, что такие трансформированные корни активно регенерировали в здоровые побеги в три раза лучше, чем интактные корни (Lee et al., 2004). В другом исследовании (Mahesh, Jeyachandran, 2011) для получения волосовидных корней *T. officinale* помимо штамма 15834, использовали штамм A4, инфицирование листовых эксплантов которым оказалось более эффективным. Более того, количественный анализ показал, что эти корни оказались сверхпродукентами сесквитерпеновых лактонов по сравнению с корнями дикого типа. Ранее с успехом осуществлено редактирование генома кок-сагыза путем доставки с помощью *A. rhizogenes* CRISPR/Cas-компонентов в составе бинарного вектора для нокаутирования одного из генов биосинтеза инулина (Iaffaldano et al., 2016). В целях изучения возможности биотехнологического продуцирования натурального каучука были разработаны методы индукции волосовидных корней не только у *T. kok-saghyz*, но и у *T. hybernum* (Кныазев et al., 2017a; Кныазев et al., 2017b). В данных работах использовали различные типы эксплантов, которые инфицировали штаммами A4 и 15834 *A. rhizogenes* при разнообразных условиях инокуляции. Наибольшая эффективность трансформации обоими штаммами наблюдалась при укалывании иглой, содержащей суспензию из агробактерий в область подсемядольного колена (гипокотилей).

Параллельно с *A. rhizogenes*-опосредованной индукцией корневых культур ведутся работы по генетиче-

ской трансформации растений рода *Taraxacum* с помощью *A. tumefaciens* с целью получения их трансгенных форм. Так, Y. H. Song et al. (1999) и S. E. Yeo с K. S. Roh (2001) показали возможность агробактериальной трансформации *T. mongolicum*, используя в качестве эксплантов фрагменты листьев. *T. platycarpum* также был генетически трансформирован вышеописанным способом (Bae et al., 2005). В работе T. W. Bae et al. (2005) были получены растения *T. platycarpum*, в геном которых добавили ген 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы. Продукт этого гена является ключевым ферментом в регуляции биосинтеза изопrenoидов, сверхэкспрессия которого приводит к увеличению накопления многих вторичных метаболитов. В данном случае листовые экспланты трансформировали с помощью штамма EHA105 *A. tumefaciens* (Bae et al., 2005). В работе А. В. Князева и А. В. Чемерис (Knyazev, Chemeris, 2012) показано, что *T. officinale* может быть трансформирован с использованием также штамма AGL0 *A. tumefaciens*. Для кок-сагыза известны лишь единичные работы в данном направлении, к примеру, ранее были созданы трансгенные растения кок-сагыза путем трансформации листовых дисков штаммом EHA105 *A. tumefaciens*, где для регенерации растений использовали 6-бензиламинопурин и индолилуксусную кислоту (Collins-Silva et al., 2012).

Заключение

Значительная часть резины в мире производится из искусственного каучука, получаемого полимеризацией различных углеводородов. Однако натуральный каучук остается незаменимым природным сырьем из-за ряда его уникальных свойств и спрос на него во всем мире продолжает расти (Dykman et al., 2011). Так как натуральный каучук превосходит по некоторым характеристикам искусственный, то его используют в местах с повышенной нагрузкой, особенно в военной отрасли. Немаловажно его значение в медицине. Каучук является основой для некоторых лекарствовосодержащих пластырей, из него и его производных делают имплантаты различных органов человека. Следовательно, натуральный каучук является очень ценным стратегическим сырьем для любого государства. Обеспечить нашу страну отечественным каучуком вполне возможно, выращивая растение кок-сагыз, дающее достаточное количество высококачественного сырья. Кроме того, это растение является довольно неприхотливым к климату и почве, в отличие от других каучуконосов юга России и Средней Азии, таких как крым-сагыз и тау-сагыз, требующих более теплого климата, приближенного к средиземноморскому и среднеазиатскому, соответственно. Благодаря этой особенности кок-сагыз можно выращивать в средней полосе России, в том числе и в Республике Башкортостан, которая была

одним из лидеров по производству кок-сагыза и натурального каучука в СССР. Более того, учитывая большую территорию нашей страны, производство и экспорт натурального каучука и инулина из кок-сагыза в будущем способно принести бюджету России немалый доход. Однако выведение высокопродуктивных линий и сортов кок-сагыза сдерживается недостаточной разработанностью методов количественного и качественного экспресс-анализа каучука, а также генетической трансформации данного вида растения.

Интерес к данной тематике вызван проводимыми исследованиями по теме государственного задания № АААА-А19-119021190011-0.

References/Литература

- Bae TW, Park HR, Kwak YS, Lee HY, Ryu SB (2005) *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of a medicinal plant *Taraxacum platycarpum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 51–57.
- Bobkov PK (1939) Poluchenie kauchuka iz kornej kok-sagyz. *Kauchuk i rezina* 8: 67–70 [in Russian] (Бобков П.К. Получение каучука из корней кок-сагыза // Каучук и резина. 1939. № 8. С. 67–70).
- Bol'shaya entsiklopediya nefti i gaza. Available from: <https://www.ngpedia> [in Russian] (Большая энциклопедия нефти и газа. URL: <https://www.ngpedia>).
- Booth A, Satchuthanathavale R (1974) Regeneration in root cuttings in *Taraxacum officinale*. II. Effects of exogenous hormones on root segments and root callus cultures. *New Phytol.* 73: 453–460.
- Bowes BG (1970) Preliminary observations on organogenesis in *Taraxacum officinale* tissue cultures. *Protoplasma* 71 (1): 97–202.
- Bowes BG (1971) The occurrence of shoot teratomata in tissue cultures of *Taraxacum officinale*. *Planta* 100 (3): 272–276.
- Buranov AU, Elmuradov BJ (2010) Extraction and characterization of latex and natural rubber from rubber-bearing plants. *J. Agric. Food. Chem.* 58: 734–743. DOI: 10.1021/jf903096z
- Bushman BS, Scholte AA, Cornish K, Scott DJ, Brichta JL, Vederas JC, Ochoa O, Michelmore RW, Shintani DK, Knapp SJ (2006) Identification and comparison of natural rubber from two *Lactuca* species. *Phytochemistry* 67: 2590–2596. DOI: [org/10.1016/j.phytochem.2006.09.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.012)
- Chaldaeva DA, Khusainov AD (2013) Primenenie naturalnogo i sinteticheskogo kauchuka v proizvodstve шин. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta – Bulletin of Kazan Technological University* 16 (11): 195–198 [in Russian] (Чалдаева Д. А., Хусаинов А. Д. Применение натурального и синтетического каучука в производстве шин // Вестник Казанского технологического университета. 2013. Т. 16. № 11. С. 195–198).
- Collins-Silva J, Nural AT, Skaggs A, Scott D, Hathwaik U, Woolsey R, Schegg K, McMahan C, Whalen M, Cornish K, Shintani D (2012) Altered levels of the *Taraxacum kok-saghyz* (Russian dandelion) small rubber particle protein, TksRPP3, result in qualitative and quantitative changes in rubber metabolism. *Phytochemistry* 79: 46–56. DOI: [10.1016/j.phytochem.2012.04.015](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.015)
- Dykman AS, Gil'manov HH, Fedorcova EV, Busygin VM, Moiseev II (2011) Perspektivnye vozmozhnosti mirovogo proizvodstva natural'nogo i izoprenovogo kauchukov. *Ekonomika i upravlenie* 10: 46–51 [in Russian] (Дыкман А. С., Гильманов Х.Х., Федорцова Е. В., Бусыгин В. М., Моисеев И.И. Перспективные возможности мирового производства натурального и изопренового каучуков // Экономика и управление. 2011. № 10. С. 46–51).
- Filippov DI, Nichiporovich AA, Aksel'rod DM (eds) (1948) Kul'tura kauchukonosov v SSSR. Moscow: OGIZ-Sel'hozgiz. p. 90–93.

- [in Russian] (Филиппов Д.И., Ничипорович А.А., Аксельрод Д.М. Культура каучуконосов в СССР. М.: ОГИЗ-Сельхозгиз, 1948. С. 90–93).
- Garshin MV, Kartuha AI, Kuluev BR (2016) Kok-sagyz: osobennosti kul'tivirovaniya, perspektivy vozdel'yvaniya i vnedreniya v sovremennoe proizvodstvo. *Biomika – Biomics* 8 (4): 323–333. [in Russian] (Гаршин М.В., Картуха А.И., Кулueв Б.Р. Кок-сагыз: особенности культивирования, перспективы возделывания и внедрения в современное производство // Биомика. 2016. Т. 8. № 4. С. 323–333).
- Gavrilova VA, Pendinen GI, Petrosyan IA, Kon'kova NG, Kutuzova SN, Vakhrusheva TYe, Sirotinkin NV, Brach NB, Dunayeva SYe, Zhuravlev YeV, Gavrilenko TA (2015) Mikroklonal'noye razmnzheniye kok-sagzya - istochnika natural'nogo kauchuka i lateksa. In: *Biotehnologiya: sostoyaniye i perspektivy razvitiya: materialy VIII Moskovskogo mezhdunarodnogo kongressa Pt 2, Moscow, p. 26–28.* [in Russian] (Гаврилова В.А., Пендинен Г.И., Петросян И.А., Конькова Н.Г., Кутузова С.Н., Вахрушева Т.Е., Сиrotинкин Н.В., Брач Н.Б., Дунаева С.Е., Журавлев Е.В., Гавриленко Т.А. Микроклональное размножение кок-сагыза – источника натурального каучука и латекса // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы VIII Московского международного конгресса. М., 2015. Ч. 2. С. 26–28).
- Grout BWW (2010) Evaluation of total antioxidant production in seed and in vitro populations of *Taraxacum mongolicum* and *T. officinale*. *Acta Hort.* 925: 275–280. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.925.41
- Iaffaldano B, Zhang Y, Cornish K (2016) CRISPR/Cas9 genome editing of rubber producing dandelion *Taraxacum kok-saghyz* using *Agrobacterium rhizogenes* without selection. *Ind. Crops Prod.* 30: 356–362. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.05.029
- Ignatiev AM (1939) O kauchuke iz krym-sagzya. *Kauchuk i rezina* 6: 41–44 [in Russian] (Игнатиев А.М. О каучуке из крым-сагыза // Каучук и резина. 1939. № 6. С. 41–44).
- Jamshied S, Das S, Sharma MP, Srivastava PS (2010) Difference in in vitro response and esculin content in two populations of *Taraxacum officinale* Weber. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 16 (4): 353–358.
- Keller AB (1936) *Kauchuk i kauchukonosy*. Moscow ; Leningrad: Izdatel'stvo Akademii nauk SSSR. 487 p. [in Russian] (Келлер А.Б. Каучук и каучуконосы. М. ; Л.: Издательство Академии наук СССР, 1936. 487 с.).
- Khajrullin RZ, Vlasova YuS, Yanov VV (2014) Perspektivy ispol'zovaniya al'ternativnykh vidov rastitel'nogo syr'ya dlya proizvodstva natural'nogo kauchuka. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* 17 (13): 205–206 [in Russian] (Хайруллин Р.З., Власова Ю.С., Янов В.В. Перспективы использования альтернативных видов растительного сырья для производства натурального каучука // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 13. С. 205–206).
- Knyazev AV, Chemeris AV, Vahitov VA (2007) Kallusoobrazovanie i morfogenez u *Taraxacum officinale* Weber v kul'ture in vitro. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-himicheskoy biologii im. Y.A. Ovchinnikova* 3 (3): 5–9 [in Russian] (Князев А.В., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Каллусообразование и морфогенез у *Taraxacum officinale* Weber в культуре in vitro // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2007. Т. 3. № 3. С. 5–9).
- Knyazev AV, Chemeris AV (2012) Oposredovannaya *Agrobacterium tumefaciens* transformatsiya oduvanchika *Taraxacum officinale* Weber. *Biomika – Biomics* 2 (2): 47–53 [in Russian] (Князев А.В., Чемерис А.В. Опосредованная *Agrobacterium tumefaciens* трансформация одуванчика *Taraxacum officinale* Weber // Биомика. 2012. Т. 2. № 2. С. 47–53).
- Knyazev AV, Kuluev BR, Mikhaylova EV, Yasybaeva GR, Chemeris AV (2017a) Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. *Plant Root.* 11: 64–69. DOI: 10.3117/plantroot.11.64
- Knyazev AV, Kuluev BR, Fateriya AV, Yasybaeva GR, Chemeris AV (2017b) Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum hybernum* Steven. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 27 (2): 141–151. DOI: 10.3329/ptcb.v27i2.35019
- Kobeleve VK (1937) *Selekciya kauchukonosnykh rastenij* 3: 641–670 [in Russian] (Кобелев В.К. Селекция каучуконосных растений. 1937. Т. 3. С. 641–670).
- Kogan LM (1939) Tekhnologiya izvlecheniya natural'nogo kauchuka. *Kauchuk i rezina* 8: 32 [in Russian] (Козан Л.М. Технология извлечения натурального каучука // Каучук и резина. 1939. № 8. С. 32).
- Korzinov N (2008) Bitva za rezinu. S chego nachinaetsya shina. *Populyarnaya mekhanika – Popular mechanics* 2 [in Russian] (Корзинов Н. Битва за резину. С чего начинается шина // Популярная механика. 2008. № 2). URL: <http://www.porpmech.ru/vehicles/7329-bitva-za-rezinu-s-chego-nachinaetsya-shina/>
- Koyalovich NB (1939) Kolichestvennoye opredeleniye kauchuka v kornevykh kauchukonosakh. *Kauchuk i rezina* 7: 26–29 [in Russian] (Коялович Н.Б. Количественное определение каучука в корневых каучуконосах // Каучук и резина. 1939. № 7. С. 26–29).
- Kuluev BR, Berezhneva ZA, Chemeris AV (2017) Hydroponic and aeroponic growing of Russian dandelion *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. *Biomics* 9 (2): 96–100 [in Russian] (Кулueв 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).
- Kuluev BR, Garafutdinov RR, Maksimov IV, Sagitov AM, Chemeris DA, Knyazev AV, Vershinina ZR, Baymiev AnK., Muldashev AA, Baymiev AIK, Chemeris AV (2015) Natural rubber, its sources and components. *Biomics* 7 (4): 224–283 [in Russian] (Кулueв Б.Р., Гарафутдинов Р.Р., Максимов И.В., Сагитов А.М., Чемерис Д.А., Князев А.В., Вершинина З.Р., Баймиев А.Н., Мулдашев А.А., Баймиев А.И., Чемерис А.В. Натуральный каучук, его источники и составные части // Биомика. 2015. Т. 7. № 4. С. 224–283).
- Ladnova OL, Merkulova EG (2008) Primeneniye inulina i stevii pri razrabotke receptur produktov novogo pokoleniya. *Uspekhi sovremennoye estestvoznaniya* 2: 33–34 [in Russian] (Ладнова О.Л., Меркулова Е.Г. Применение инулина и стевии при разработке рецептур продуктов нового поколения // Успехи современного естествознания. 2008. № 2. С. 33–34).
- Lapin AK (1936) Kul'tura kauchukonosov. In: *Sel'skoye hozyajstvo SSSR. Ezhegodnik. 1935.* Moscow: Sel'hozgiz. p. 65–73 [in Russian] (Лопин А.К. Культура каучуконосов // В кн.: Сельское хозяйство СССР. Ежегодник. 1935. М.: Сельхозгиз, 1936. С. 65–73).
- Lee M, Yoon ES, Jeong J, Choi YE (2004) *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. *Pl Cell Rep.* 22: 822–827.
- Luo Z, Iaffaldano BJ, Cornish K (2018) Colchicine-induced polyploidy has the potential to improve rubber yield in *Taraxacum kok-saghyz*. *Ind. Crop. Prod.* 112: 75–81. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.11.010
- Mahesh A, Jeyachandran R (2011) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root induction in *Taraxacum officinale* and analysis of sesquiterpene lactones. *Plant Biosystems* 145 (3): 620–626. DOI: 10.1080/11263504.2011.584702
- Navashin MS, Gerasimova EN (1941) Poluchenie tetraploidnogo kok-sagzya i ego prakticheskoye znachenie. *Doklady akademii nauk SSSR – Transactions (Doklady) of the USSR Academy of Sciences. Earth Science Sections* 31 (1): 47–50 [in Russian] (Навашин М.С., Герасимова Е.Н. Получение тетраплоидного кок-сагыза и его практическое значение // Доклады академии наук СССР. 1941. Т. 31. № 1. С. 47–50).
- Navashin MS, Gerasimova-Navashina EN (1951) O tetraploidii i tetraploidnom kok-sagzye. *Agrobiologiya* 6: 102–109 [in Russian] (Навашин М.С., Герасимова-Навашина Е.Н. О тетраплоидии и тетраплоидном кок-сагызе // Агробология. 1951. № 6. С. 102–109).
- Pavlov NV (1942) *Dikie poleznyye tekhnicheskie rasteniya*. Moscow. 640 p. [in Russian] (Павлов Н.В. Дикie полезные технические растения. М., 1942. 640 с.).
- Polovenko IS, Filippov DI, Pravdin FN, Furman LM (1950) Kok-sagyz. Moscow: Gosudarstvennoye izdatel'stvo sel'skohozyajstvennoy literatury. p. 40–58 [in Russian] (Половенко И.С., Филиппов Д.И., Правдин Ф.Н., Фурман Л.М. Кок-сагыз. М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1950).

- Ramirez-Cadavid D, Cornish K, Michel F (2017) *Taraxacum kok-saghyz*: compositional analysis of a feedstock for natural rubber and other products. *Ind. Crop. Prod.* 107: 624–640. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.05.043
- Rawa'a, AM, Hassawi DS, Ibraheem NK (2018) In vitro micropropagation of *Taraxacum officinale* medicinal plant by direct and in director gamogenesis. *Plant Archives* 18 (2): 2273–2284.
- Rzymiski WM (2014) Extraction of natural rubber from alternative sources. *KGK rubberpoint* 67: 22–27.
- Sandomirskij D (1938) Радиokoагуляция латекса. *Kauchuk i rezina* [in Russian] (Сандомирский Д. Радиokoагуляция латекса // Каучук и резина. 1938. С. 88).
- Schmidt T, Lenders M, Hillebrand A, van Deenen N, Munt O, Reichelt, Eisenreich W, Fischer R, Prüfer D, Gronover CS (2010) Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum kok-saghyz*. *BMC Biochem.* 11 (11). DOI: 10.1186/1471-2091-11-11
- Song YH, Wong PF, Chua NH (1999) Tissue culture and genetic transformation of dandelion. *Acta Hort* 289: 261–262.
- Spano D, Pintus F, Mascia C, Scorciapino MA, Casu M, Floris G, Medda R (2012) Extraction and characterization of a natural rubber from *Euphorbia characias* latex. *Biopolymers* 97: 589–594. DOI: 10.1002/bip.22044
- Swanson CL, Buchanan RA, Otey FH (1979) Molecular weights of natural rubbers from selected temperate zone plants. *J. Appl. Polym. Sci.* 23: 743–748. DOI: org/10.1002/app.1979.070230309
- Tverskaya SS, Iossa MM (1938) *Kauchuk i rezina* 2: 84–87 [in Russian] (Тверская С.С., Иосса М.М. Каучук и резина. 1938. № 2. С. 84–87).
- Warmke HE (1945) Experimental polyploidy and rubber content in *Taraxacum kok-saghyz*. *Botanical Gazette* 106 (3): 316–324.
- Yeo SE, Roh KS (2001) Transformation of *Taraxacum mongolicum* Hand, by *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16: 480–485