

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037884**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2021.05.31**

(21) Номер заявки

**201890636**

(22) Дата подачи заявки

**2016.09.02**(51) Int. Cl. **A01H 5/02** (2006.01)**A01H 5/06** (2006.01)**C08L 7/00** (2006.01)**C08L 7/02** (2006.01)(54) **КАУЧУКОНОСНОЕ РАСТЕНИЕ РОДА TARAXACUM**(31) **2015396**(32) **2015.09.03**(33) **NL**(43) **2018.08.31**(86) **PCT/NL2016/050613**(87) **WO 2017/039449 2017.03.09**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЛИОН-ФЛЕКС Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Ван Дейк Петер Йоханнес, Серенсен  
Анкер Пребен (NL)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(56) Anonym: "Gib Gummi mit Kaukasischem Löwenzahn: die Pflanze ist potenzieller neuer Kautschuklieferant", Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, 15 July 2013 (2013-07-15), XP002764197, Retrieved from the Internet: URL:[http://www.fnr.de/presse/pressemitteilungen/archiv/archiv-nachricht/?tx\\_ttnews\[year\]=2013&tx\\_ttnews\[month\]=07&tx\\_ttnews\[day\]=15&tx\\_ttnews\[tt\\_news\]=6411&cHash=909312a21232bd9ada3259c0b3c2fde0](http://www.fnr.de/presse/pressemitteilungen/archiv/archiv-nachricht/?tx_ttnews[year]=2013&tx_ttnews[month]=07&tx_ttnews[day]=15&tx_ttnews[tt_news]=6411&cHash=909312a21232bd9ada3259c0b3c2fde0) [retrieved on 2016-11-11] the whole document

VAN BEILEN JAN B ET AL.: "Guayule and Russian dandelion as alternative sources of natural rubber.", CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 27, no. 4, October 2007 (2007-10), pages 217-231, XP002764198, ISSN: 0738-8551 abstract, Breeding of Russian Dandelion; page 227 - page 228

VAN BEILEN JAN B ET AL.: "Establishment of new crops for the production of natural rubber",

TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 25, no. 11, November 2007 (2007-11), pages 522-529, XP002764236, ISSN: 0167-7799 abstract, page 525, left-hand column, line 31 - line 47

Anonymous: "Kultevat, Keygene announce breakthrough in Russian dandelion latex.", RubberNews.com Kultevat natural grown quality, 26 March 2014 (2014-03-26), page 6PP, XP002764200, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.kultevat.com/news.html> [retrieved on 2016-11-14] KULTEVAT, KEYGENE ANNOUNCE BREAKTHROUGH IN RUSSIAN DANDELION LATEX; page 3

Anonymous: "EU-PEARLS Report Summary Project ID: 212827", European Commission 18 July 2014 (2014-07-18), pages 1-21, XP002764201, Retrieved from the Internet: URL:[http://cordis.europa.eu/result/rcn/144740\\_en.pdf](http://cordis.europa.eu/result/rcn/144740_en.pdf) [retrieved on 2016-11-14] B. 3; page 4, page 9, line 22 - line 37

SCHMIDT THOMAS ET AL.: "Molecular Cloning and Characterization of Rubber Biosynthetic Genes from Taraxacum koksaghyz", PLANT MOLECULAR BIOLOGY REPORTER, vol. 28, no. 2, June 2010 (2010-06), pages 277-284, XP002764202, ISSN: 0735-9640, abstract

LAIBACH NATALIE ET AL.: "Identification of a Taraxacum brevicorniculatum rubber elongation factor protein that is localized on rubber particles and promotes rubber biosynthesis.", THE PLANT JOURNAL: FOR CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 82, no. 4, May 2015 (2015-05), pages 609-620, XP002764203, ISSN: 1365-313X, abstract

EPPING JANINA ET AL.: "A rubber transferase activator is necessary for natural rubber biosynthesis in dandelion", NATURE PLANTS, vol. 1, no. 5, April 2015 (2015-04), XP002764204, abstract

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения растений рода *Taraxacum* значительного размера и с существенным содержанием каучука, предпочтительно путем обеспечения растений рода *Taraxacum*, имеющих относительно большой размер генома и/или содержащих определенный процент происходящих от *Taraxacum koksaghyz* (TKS) генов и определенный процент происходящих от *Taraxacum officinale* (TO) генов, отбора этих растений по присутствию или отсутствию определенных маркеров и впоследствии отбора растений по размеру растения и по размеру генома.

**037884 B1**

**037884 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к мощному и каучуконосному растению рода *Taraxacum* и способу обеспечения такого растения.

#### Предпосылки создания изобретения

Натуральный каучук, полимер изопрена, является весьма важным возобновляемым материалом для более 40000 продуктов, необходимых строительной промышленности (клеев, герметиков), фармацевтической промышленности (перчаток, трубок) и транспортной промышленности (ковриков, шин). Во многих применениях натуральный каучук не может быть заменен синтетическими каучуками (искусственные эластомеры в основном синтезируются из побочных продуктов нефтепереработки).

В настоящий момент натуральный каучук собирают исключительно на плантациях каучуконосного дерева (*Hevea brasiliensis*), >90% которого выращивают в Юго-Восточной Азии. Однако прогнозируется значительное увеличение потребления натурального каучука во всем мире, в то время как производственные площадки находятся в напряженном состоянии из-за трудозатрат и предпочтений в отношении производства пальмового масла.

Казахстанский одуванчик (*Taraxacum koksaghyz*, сокращенно TKS) также продуцирует в своих корнях натуральный каучук очень высокого качества, но это небольшое растение, что ведет к низкому урожаю. Напротив, обыкновенный одуванчик (*Taraxacum officinale*, сокращенно ТО) является мощным растением, но не продуцирует каучук.

До сих пор попытки соответствующего объединения мощности и продукции каучука в одном растении рода *Taraxacum* были безуспешными (см., например, *Botanical Review*, Vol. 11, No. 8, *A Review of Literature on Taraxacum Kok-Saghyz Rod* (Oct., 1945), pp. 417-461). Цель настоящего раскрытия состоит в решении по крайней мере этой проблемы в известном уровне техники.

#### Общие определения

В следующем описании и примерах используется ряд терминов. Для обеспечения ясного и последовательного понимания спецификации и формулы изобретения, включая объем, в котором должны быть предоставлены такие термины, приводятся следующие определения. Если не указано иное, все используемые технические и научные термины имеют такое же значение, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится это изобретение.

Используемый здесь термин "растение" или "растительный материал" может относиться к клетке растения, ткани или органам растения, протопласту растения, культуре клеточной ткани растения, из которой может быть регенерировано растение(я), каллюсам растения, скоплениям клеток растения и клеткам растения, которые являются интактными в растениях, части(ям) растения (растений), таким как эмбрионы, пыльца, семяпочка, фрукт (например, собранный фрукт), цветы, листья, семена, корни, кончики корней и т.п. Корень(и) является органом растения, который обычно находится ниже поверхности почвы и может быть легко идентифицирован квалифицированным специалистом. Термин "растение" также может относиться ко всему растению, например растению рода *Taraxacum* или его корням.

Используемый здесь термин "каучук" относится к (натуральному) каучуку, который включает полимеры органического соединения изопрена, в частности цис-1,4-полиизопрена. Могут присутствовать примеси других органических соединений (такие как белки, жирные кислоты, смолы и неорганические материалы), а также вода, но предпочтительно каучук включает по крайней мере 95 вес.% полимеров изопрена. В каучуке по настоящему изобретению (средняя) молекулярная масса полимера может составлять от 100000 до 1000000 дальтон, предпочтительно от 500000 до 1000000 дальтон, от 800000 до 1000000 дальтон или от 900000 до 1100000 дальтон, или даже по крайней мере 1000000, 1100000, 1200000, 1300000, 1400000, 1500000 или по крайней мере 200000 дальтон. Формы полиизопрена, которые используются в качестве натуральных каучуков, могут быть отнесены к эластомерам. Натуральный каучук используется многими производственными компаниями для производства резиновых изделий, например автомобильных или авиационных шин.

Используемый здесь термин "*Taraxacum*" относится к роду цветущих растений семейства *Asteraceae* и состоит из видов, широко известных как одуванчик. *Taraxacum officinale* (ТО), обыкновенный одуванчик, представляет собой цветущее травянистое многолетнее растение этого семейства. *Taraxacum koksaghyz* (TKS), обычно называемый казахстанским одуванчиком или российским одуванчиком (или каучуконосным одуванчиком), является видом одуванчика, присущим Казахстану, который отличается своей продукцией каучука высокого качества, но обладает небольшой мощностью. TKS можно найти в природе в Казахстане или можно получить из банка семян USDA. ТО с двойным числом хромосом можно, например, найти в Швейцарии, Нидерландах, а также можно получить из банка семян USDA. Конечно, растения рода *Taraxacum* в соответствии с настоящим изобретением не ограничиваются конкретным источником, из которого были получены исходные растения.

Используемый здесь термин "скрещивание", "возвратное скрещивание", "интеркросс" и "отбор" относится к этапам селекции растений. Селекция растений представляет собой умение изменять признаки растений с целью получения желаемых характеристик. Другими словами, это процесс отбора индивидуумов в популяции, которые будут давать генетический материал следующему поколению, т.е. F1 явля-

ется поколением, полученным в результате скрещивания первой совокупности родителей (т.е. поколения P), а F2/G2, G3, G4, G5 и т.д. являются последующими поколениями. В частности, такой процесс может основываться как на естественных, так и на искусственных явлениях или этапах процедуры. Критерии отбора могут основываться на фенотипических или геномных характеристиках, например, но без ограничения ими, присутствию или степени присутствия генов, экспрессии генов, генетических маркеров, комбинациях генов, локусов количественных признаков, признаков или комбинациях признаков. Возвратное скрещивание представляет собой скрещивание растений определенного поколения с одним из его родителей (или предков) или индивидуумом, генетически схожим с его родителем, с целью получения потомства с генетической идентичностью, которая ближе таковой родителя или предка. Интеркросс относится к скрещиванию двух индивидуумов, которые имеют общего/сходного предка друг с другом. В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы скрещивание и/или возвратное скрещивание (и/или интеркросс) выполнялись в оптимальных (парниковых) условиях, например при 20-22 или 21°C в дневное время, при 17-19 или 18°C в ночное время, нормальной влажности, и этапы скрещивания выполняются спустя 18-22 или 20 недель от всходов.

Используемый здесь термин "маркер" относится к маркеру на основе ДНК, который может использоваться в процессе, например, для селекции растений, в котором растения подвергаются скринингу на присутствие и/или отсутствие одного или более генетических и/или фенотипических маркеров. Примерами генетического маркера являются специфическая ДНК-последовательность, AFLP (полиморфизм длины амплифицированного фрагмента), микросателлитный локус, RFLP (полиморфизм длины рестриционного фрагмента), STS (ДНК-маркирующий сайт), SNP (однонуклеотидный полиморфизм), SFP (однофункциональный полиморфизм, см. Borevitz et al., 2003, *Genome Research* 13: 513-523), SCAR (амплифицированная область с определенной последовательностью), маркеры CAPS (расщепленная амплифицированная полиморфная последовательность) и т.п. Анализ KASP может использоваться для выявления присутствия или отсутствия последовательности ДНК (маркера) и/или для определения, является ли растение гетерозиготным или гомозиготным по маркеру (см. также "SNP genotyping: the KASP assay, in *Crop Breeding: Methods and Protocols*, Springer 2014, Volume 1145). К тому же, для скрининга на присутствие/отсутствие определенной последовательности ДНК (маркера) может использоваться другой способ, например обычные способы ПЦР. Конечно, последовательность ДНК (маркер) также могут быть выявлены посредством секвенирования.

Используемый здесь термин "секвенирование" относится к определению порядка нуклеотидов (последовательностей оснований) в образце нуклеиновой кислоты (образце ДНК), например, полученном из растения. Доступно множество методов, таких как секвенирование по Сенгеру и технологии высокопроизводительного секвенирования (HTS). Секвенирование по Сенгеру может включать секвенирование посредством детекции методом (капиллярного) электрофореза, в котором вплоть до 384 капилляров может быть проанализировано в отношении последовательности за один цикл. Высокопроизводительное секвенирование включает параллельное секвенирование тысяч или миллионов или более последовательностей сразу. HTS можно определить как секвенирование следующего поколения, т.е. методы, основанные на пиросеквенировании в твердой фазе, или как секвенирование после следующего поколения на основе однонуклеотидного секвенирования в режиме реального времени (SMRT). Технологии HTS доступны, например, предлагаются Roche, Illumina and Applied Biosystems (Life Technologies). Добавочные технологии высокопроизводительного секвенирования описаны и/или доступны от Helicos, Pacific Biosciences, Complete Genomics, Ion Torrent Systems, Oxford Nanopore Technologies, Nabsys, ZS Genetics, GnuBio.

В этом документе и в его формуле изобретения глагол "включать (содержать)" и его спряжения, как он используется в его неограничивающем смысле, означают, что следующие за словом элементы включены, но не упомянутые конкретно элементы не исключены. К тому же, ссылка на элемент с помощью неопределенного артикля "a" или "an" не исключает возможности присутствия более одного элемента, если только контекст явно не требует присутствия одного и только одного из элементов. Таким образом, неопределенный артикль "a" или "an" обычно означает "по крайней мере один". Кроме того, понятно, что при ссылке здесь на "последовательности", как правило, ссылаются на фактические физические молекулы с определенной последовательностью субъединиц (например, оснований).

Способы осуществления обычных методов, используемых в способах настоящего раскрытия, будут очевидны для квалифицированного работника и описаны, например, в *Selection Methods in Plant Breeding* (eds. Izak Bos, Peter Caligari; Springer Sciences+Business Media 2008; *Progress in Plant Breeding* (ed. G.E. Russel; Butterworth & Co, 2013); *Quantitative Genetics, Genomics, and Plant Breeding* (eds. Manjit S. Rang; KABI Publishing 2002); и *Plant Breeding Methods* (ed. Mahabal Ram; PHI Learning Private Limited, New Delhi, 2014).

#### **Описание настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к способу обеспечения растения рода *Taгaxacum* с содержанием каучука, составляющим по крайней мере 0,5 г, предпочтительно по крайней мере 0,75, 1,0, 1,5 или даже 2,0 г сухого веса, что может быть определено предпочтительно с помощью ускоренной экстракции рас-

творителем.

Также предусматривается растение рода *Тагахасум* с сухим весом корней, составляющим по крайней мере 5 г, предпочтительно по крайней мере 7, 10, 20, 30, 40, или даже 50 г;

содержанием каучука в корнях, составляющим по крайней мере 3 вес.%, предпочтительно по крайней мере 3,5, 4,0, 4,5 или даже 5,0 вес.% сухого веса относительно общего сухого веса корней, что может быть определено, например, с помощью ускоренной экстракции растворителем.

Конкретнее, настоящее изобретение относится к способу обеспечения и отбора растений рода *Тагахасум*, причем способ включает следующие этапы:

а) обеспечение растений рода *Тагахасум*, имеющих размер генома от 1000 до 1415 мегабаз и/или 60-99% происходящих от *Тагахасум koksaghyz* (TKS) генов и 1-40% происходящих от *Тагахасум officinale* (ТО) генов;

б) отбор растений рода *Тагахасум* по отсутствию гена CPT ТО;

с) отбор растений рода *Тагахасум* по присутствию по крайней мере трех генов из CPT2 TKS, CPT3 TKS, RTA TKS, SRPP5 TKS и REF TKS;

д) отбор не более 40% растений рода *Тагахасум* по размеру растения;

е) отбор не более 40% растений рода *Тагахасум* по размеру генома.

Этот метод позволяет объединить мощность ТО с продукцией каучука в TKS в одном растении рода *Тагахасум*. Это достигается путем интрогрессии связанных с мощностью генетических элементов ТО в обеспечивающий продукцию каучука генетический фон TKS с целью получения мощного и каучуконосного растения рода *Тагахасум*.

Для этого первый этап а) относится к обеспечению растений рода *Тагахасум* с размером генома, составляющим 1000-1415 мегабаз/1С (1С означает количество в гаплоидном ядре или половину количества в диплоидном ядре), и/или обеспечению растений рода *Тагахасум*, содержащих 60-99% генов, происходящих от *Тагахасум koksaghyz* (TKS), и 1-40% генов, происходящих от *Тагахасум officinale* (ТО). Проценты генов, происходящих от ТО/TKS, обычно коррелируют с (и могут определяться) размером генома растения рода *Тагахасум*. TKS имеет размер генома ~1420 мегабаз/1С, см., например, Kirschner et al., 2013 (*Genet Resour Crop Evol* (2013) 60: 455-471), тогда как ТО имеет размер генома ~835 мегабаз/1С (неопубликованные данные).

Хотя этапы селекции для получения таких растений рода *Тагахасум* могут быть осуществлены путем аутсорсинга, также можно получить растения путем скрещивания и/или возвратного скрещивания (и/или интеркросса) растений рода *Тагахасум*, т.е. растений *Тагахасум koksaghyz* (TKS) и растений *Тагахасум officinale* (ТО), предпочтительно на протяжении по крайней мере двух поколений. Следовательно, этапу а) может предшествовать обеспечение растений *Тагахасум koksaghyz* (TKS) и растений *Тагахасум officinale* (ТО), предпочтительно с последующим скрещиванием и/или возвратным скрещиванием (и/или интеркроссом) TKS и ТО. В случае и TKS, и ТО диплоидные растения могут использоваться для первого этапа скрещивания. После этого выполняют предпочтительно 1, 2, 3 или более этапов возвратного скрещивания с TKS.

Квалифицированный специалист может определить размер генома растения рода *Тагахасум* с помощью проточной цитометрии, как описано, например, Tas и van Dijk (1999, *Heredity* 83: 707-714) и более предпочтительно, как описано здесь в примере. Квалифицированный специалист также может легко определить проценты генов, происходящих от ТО/TKS, на основании правила, согласно которому у потомства будет 50% генов первого родителя и 50% генов второго родителя. Это правило наглядно представлено на фиг. 1. На первом этапе скрещивания на фиг. 1 ТО (со 100% происходящих от ТО генов) скрещивают с TKS (со 100% происходящих от TKS генов), что дает в результате потомство с 50% происходящих от ТО генов и 50% происходящих от TKS генов. Затем эти  $ТО^{50}TKS^{50}$  растения скрещивают с  $ТО^{100}$  растениями, что дает в результате  $ТО^{(50/2+100/2)}TKS^{(50/2)}=ТО^{75}TKS^{25}$ , т.е. растение рода *Тагахасум* с 75% происходящих от ТО генов и 25% происходящих от TKS генов. Поскольку проценты генов, происходящих от ТО/TKS, как правило, коррелируют с (и определяются) размером генома растения рода *Тагахасум*, возможно, альтернативно, что проценты генов, происходящих от ТО/TKS, будут основываться на определении размера генома растения с помощью проточной цитометрии. В таком случае размер генома ~835 мегабаз означает 100% ТО, и каждые дополнительные 5,85 мегабаз уменьшают процент происходящих от ТО генов на 1% и увеличивает процент происходящих от TKS генов на 1%. Так, если определено, что размер генома растения равен 846,7 мегабаз, растение можно рассматривать как  $ТО^{98}TKS^2$ .

Соответственно размер генома, составляющий ~1420, подразумевает, что растение представляет собой 100% TKS.

Как правило, в необязательной программе селекции первый этап будет состоять в том, чтобы скрестить  $ТО^{100}$  с  $TKS^{100}$ , что будет давать в результате  $ТО^{50}TKS^{50}$ . Вторым этапом может быть возвратное скрещивание с  $TKS^{100}$ , что будет давать в результате  $ТО^{25}TKS^{75}$ , которое уже находится в желаемом диапазоне, как того требует этап а). Однако предпочтительно выполнять множество этапов скрещивания. Применение большего количества этапов скрещивания, возвратного скрещивания и/или интеркросса имеет то преимущество, что будет происходить большее количество событий рекомбинации, что приве-

дет к большему количеству вариаций в растениях и более разнообразной смеси происходящих от ТО и TKS сегментов в хромосомах растений, обеспеченных на этапе а).

Поэтому предпочтительно, чтобы скрещивание и/или возвратное скрещивание применяли на протяжении по крайней мере 1, 2, 3, 4 или 5 поколений, чтобы прийти к растению рода *Taraxacum*, как того требует этап а), прежде чем перейти к этапу б).

Квалифицированному специалисту будет ясно, что при применении настоящего способа не требуется выполнять этапы скрещивания, возвратного скрещивания и/или интеркросса, которые приводят к обеспечению растений рода *Taraxacum*, имеющих размер генома, составляющий 1000-1415 мегабаз, и/или содержащих 60-99% генов, происходящих от *Taraxacum koksaghyz* (TKS), и 1-40% генов, происходящих от *Taraxacum officinale* (ТО). Таким образом, эти этапы являются необязательными и могут быть осуществлены путем аутсорсинга, так что способ может начинаться с обеспечения указанных растений.

В предпочтительном варианте осуществления этап а) относится к обеспечению растений рода *Taraxacum* с размером генома, составляющим 1000-1415 мегабаз (/1С) или предпочтительно с размером генома, составляющим по крайней мере 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 1125, 1150, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400 мегабаз (/1С) и/или не более 1100, 1125, 1150, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400 мегабаз (/1С).

В другом предпочтительном варианте осуществления этап а) относится к обеспечению растений рода *Taraxacum*, содержащих по крайней мере 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% и/или не более 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% генов, происходящих от *Taraxacum koksaghyz* (TKS), и соответственно не более 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% и/или по крайней мере 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% генов, происходящих от *Taraxacum officinale* (ТО). Альтернативно этап а) относится к обеспечению растений рода *Taraxacum*, содержащих 60-99%, 65-95% или 70-90% генов, происходящих от *Taraxacum koksaghyz* (TKS), и 1-40%, 5-35 или 10-30% генов, происходящих от *Taraxacum officinale* (ТО). Вышеупомянутые растения рода *Taraxacum* могут рассматриваться как гибриды *Taraxacum koksaghyz* (TKS) и *Taraxacum officinale* (ТО).

На этапе б) осуществляют отбор растений рода *Taraxacum* по отсутствию следующего гена *Taraxacum officinale*: CPT (CPT ТО, цис-пренилтрансферазы *Taraxacum officinale*). Квалифицированный специалист может распознать CPT ТО, поскольку он содержит (и может быть обнаружен по) маркер(у) CPT ТО, как описано в примере в анализе KASP.

Предпочтительно, чтобы этап б) выполнялся после или перед этапа(ом) а) обеспечения растений рода *Taraxacum*, имеющих размер генома, составляющий 1000-1415 мегабаз, и/или содержащих 60-99% генов, происходящих от *Taraxacum koksaghyz* (TKS), и 1-40% генов, происходящих от *Taraxacum officinale* (ТО). Таким образом, может обеспечиваться растения рода *Taraxacum* первого отбора.

На этапе с) осуществляют отбор растений рода *Taraxacum* по присутствию по крайней мере одного, двух, трех, четырех, предпочтительно по крайней мере пяти (или всех) из следующих генов *Taraxacum koksaghyz*:

CPT2 (CPT2 TKS, цис-пренилтрансферазы 2),

CPT3 (CPT3 TKS, цис-пренилтрансферазы 3),

RTA (RTA TKS, активатора каучук-трансферазы),

SRPP5 (SRPP5 TKS, белка P5 на поверхности небольших частиц каучука) и/или

REF (REF TKS, фактора элонгации каучука). Квалифицированный специалист может распознать эти гены на основании того, что они содержат (и могут быть обнаружены по) соответствующий маркер(у), как описано в примере в анализе KASP.

Таким образом, могут быть обеспечены растения рода *Taraxacum* второго отбора.

В предпочтительном варианте осуществления этапа с) отбор растений осуществляют по гомозиготному присутствию по крайней мере одного, двух, трех, четырех, предпочтительно по крайней мере пяти из перечисленных выше генов *Taraxacum koksaghyz*.

Предпочтительно на этапе с) также осуществляют отбор растений рода *Taraxacum* по (гомозиготному) присутствию всего кластера генов SRPP TKS, т.е. по SRPP1-5 TKS: SRPP1 (белку P1 на поверхности небольших частиц каучука), SRPP2 (белку P на поверхности небольших частиц каучука), SRPP3 (белку P3 на поверхности небольших частиц каучука), SRPP4 (белку P4 на поверхности небольших частиц каучука) и SRPP5 (белку P5 на поверхности небольших частиц каучука).

Кроме того, предпочтительно, чтобы дополнительно осуществлялся отбор растений рода *Taraxacum* по (гомозиготному) присутствию (гена, содержащего) SEQ ID NO: 11, описанной здесь в примере. Предпочтительно этап с) выполняют после этапа б), относящегося к отбору против CPT ОТ и после или до этапа а) обеспечения растений рода *Taraxacum*, имеющих размер генома, составляющий 1000-1415 мегабаз (/1С), и/или содержащих по крайней мере 60% происходящих от *Taraxacum koksaghyz* (TKS) генов и по крайней мере 40% происходящих от *Taraxacum officinale* (ТО) генов.

Квалифицированный специалист знает, как можно определить присутствие/отсутствие вышеупомянутых генов/последовательностей путем идентификации подходящих маркеров, которые связаны с при-

сутствием или отсутствием указанных генов. Например, подходящие праймеры могут быть разработаны для последующего обнаружения с помощью ПЦР, или маркеры ДНК-последовательности генов могут быть обнаружены путем секвенирования. Анализ KASP особенно полезен для обнаружения (гомозиготного) присутствия/отсутствия маркеров ДНК-последовательностей указанных генов.

На этапе d) способа осуществляют отбор не более 40% растений рода *Тагахасум* по размеру растений. Предпочтительно на этом этапе осуществляют отбор не более 35, 30, 25, 20, 15, 10% растений рода *Тагахасум* по размеру растения (таким образом, отбирая для обеспечения растений большего размера). Размер растения можно определить по-разному, например, путем определения площади поверхности самого длинного листа, количества листьев, общего веса растения, высоты растения (над землей) или веса корней. Предпочтительно размер растения определяют на основе площади поверхности самого длинного листа или путем умножения указанной площади поверхности на количество листьев. Этап d) предпочтительно выполняют после этапа а) (до этапа b), но более предпочтительно после обоих этапов b) и c). Таким образом, могут быть обеспечены растения рода *Тагахасум* третьего отбора.

На этапе (е) способа осуществляют отбор не более 40% растений рода *Тагахасум* по размеру их генома. Предпочтительно на этом этапе осуществляют отбор не более 35, 30, 25, 20, 15, 10% растений рода *Тагахасум* по размеру их генома (таким образом, отбирая для обеспечения растений с большими размерами генома). Размер генома, например в мегабазах, можно определить с помощью проточной цитометрии, хорошо известной квалифицированному специалисту и описанной Tas и van Dijk (1999, *Heredity* 83: 707-714), и более предпочтительно, как описано здесь в примере. Этап е) предпочтительно выполняют после этапа а) (до этапа b) и более предпочтительно после этапа d) отбора по размеру растения. Таким образом, могут быть обеспечены растения рода *Тагахасум* четвертого отбора.

Предпочтительно этап а) способа обеспечивает по крайней мере 10, 20, 50, 100, 100, 1500 или по крайней мере 2000 растений. Этапы а)-е) могут выполняться в другом порядке, чем прямо описано, хотя описанный порядок является предпочтительным. Этап b) может быть необязательным. Этап c) также может быть необязательным. К тому же, этап d) и/или этап е) могут быть необязательными. Описанный выше способ (или его этап а) предпочтительно не является по существу биологическим процессом для получения растений и/или предпочтительно не включает скрещивание и последующий отбор растений. Кроме того, предпочтительно, чтобы на этапах b), c), d) и/или e) отобранные растения физически отбирались из большей популяции растений, с которой начинается соответствующий этап. Одновременно или альтернативно этапы b), c), d) и/или e) могут быть выполненными с помощью компьютера этапами или выполненными *in silico* (виртуально). Последнее может быть объединено с этапом а), являющимся необязательным.

Также обеспечивается растение рода *Тагахасум*, которое можно получить или получено с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно обеспечиваются по крайней мере 2, 5, 10, 100, 500, 1000, 1500 или 2000 таких растений. Должно быть ясно, что также предусмотрен машиночитаемый носитель, содержащий команды для выполнения настоящего способа.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к растению рода *Тагахасум* с содержанием каучука, составляющим по крайней мере 0,5 г, предпочтительно по крайней мере 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,6, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, или 1,0, 1,1, 1,2, 1,25, 1,3, 1,4, 1,50, 1,6, 1,75, 1,8, 1,9, 2,00, 2,1, 2,2, 2,25, 2,50, 2,75, или 3,0 г сухого веса, что может быть определено предпочтительно с помощью ускоренной экстракции растворителем.

Также обеспечивается растение рода *Тагахасум* с сухим весом корней, составляющим по крайней мере 5 г, предпочтительно по крайней мере 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 9,0, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 г; и/или

содержанием каучука в корнях, составляющим по крайней мере 3 вес.%, предпочтительно по крайней мере 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или даже 6,0 вес.% сухого веса относительно общего сухого веса корней, что определяется, например, с помощью ускоренной экстракции растворителем.

Предпочтительно, чтобы растение дополнительно содержало по крайней мере один, два, три, четыре, пять или все из следующих генов/последовательностей:

CPT2 TKS (предпочтительно гомозиготный);

CPT3 TKS (предпочтительно гомозиготный);

RTA TKS (предпочтительно гомозиготный);

SRPP5 TKS (предпочтительно SRPP 1-5 и/или гомозиготный); и/или

REF TKS (предпочтительно гомозиготный) и

необязательно (ген, содержащий) SEQ ID NO:11 (предпочтительно гомозиготную), описанную в примере.

Как описано, растение является предпочтительно гомозиготным по крайней мере по одной, двум, трем, четырем, пяти или шести (или всем) из этих последовательностей генов/маркеров.

Кроме того, растение предпочтительно имеет размер генома, составляющий по крайней мере 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, или предпочтительно по крайней мере 1000, или даже по край-

ней мере 1050, 1100, 1150, или по крайней мере 1200, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400, 1410 мегабаз, что может быть определено с помощью проточной цитометрии (как правило, при определении 1 пг означает 978 мегабаз). Предпочтительно, чтобы в качестве (внутреннего) контроля использовалось чистое TKS растение (которое, как принято считать, имеет размер генома 1420 мегабаз/1С), но также может использоваться другой (внутренний) контроль с известным размером генома.

Альтернативно или дополнительно растение имеет размер генома, составляющий не более 1200, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400, 1410 мегабаз. Предпочтительно, чтобы растение не содержало СРТ ТО.

Вышеуказанные характеристики могут быть определены для конкретного растения вида *Tagahasum* в любое время его цикла роста, но предпочтительно они определяются после по крайней мере 10, 1, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100 недель роста в оптимальных (тепличных) условиях, начиная со всходов (например, при 21°C в дневное время, 18° в ночное время, необязательно с контролированием влажности).

Дополнительно или альтернативно характеристики могут быть определены для популяции растений (например, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 или более растений) путем вычисления среднего значения для каждой их характеристики. Сухой растительный материал может быть получен, например, путем сушки в сушильном шкафу при 70, 80, 90 или 100°C в течение 1, 2 или 3 ч.

Растение предпочтительно получают/можно получить этим способом, и/или, например, по крайней мере 2, 5, 10, 100, 500, 1000, 1500 или 2000 таких растений обеспечиваются.

Содержание каучука можно определить с помощью ускоренной экстракции растворителем (ASE), например, описанной в качестве "традиционной технологии" в US 20060106183 A1. Например, каучук может быть выделен из растительного материала (например, корней), используя обваривание кипятком, которое коагулирует латекс в клетках, с последующим этапом измельчения в растворе едкой щелочи для выделения каучука. В этом случае этот традиционный процесс приводит к тому, что измельченная багаса оседает на дно емкости для обработки и позволяет смоле плавать на поверхности для сбора. Конкретнее, в этом способе смолы из растительных материалов получают экстракцией полярными растворителями, такими как спирты, кетоны и сложные эфиры. Обычно используемым растворителем является ацетон. Смолу выделяют из раствора путем выпаривания растворителя. Каучук из кустарника, как правило, экстрагируют с использованием углеводородных растворителей, таких как гексан, циклогексан или толуол.

Содержание каучука можно определить с помощью ASE следующим образом:

1) обваривание кипятком материала растения (корней) или лиофилизация и размалывание материала растения (корней);

2) этап измельчения в растворе едкой щелочи для выделения каучука или подвергание материала воздействию растворителя (например, n-гексана с 2,5% EtOH) (1 мин), затем нагревание (до 80°C) и сжимание под давлением (1500 фунтов на квадратный дюйм) материала (5 мин),

3) экстрагирование каучука свежим растворителем и определение веса каучука относительно веса исходного материала.

Более предпочтительно, когда способ ASE выполняют, как описано в примере.

Альтернативно содержание каучука можно определить с помощью ускоренной экстракции растворителем с рекомендованными установками и параметрами, описанными в Pearson (Industrial Crops and Products 31 (2010) 469-475).

Предпочтительно содержание каучука определяют в корнях, беря по крайней мере два, три, четыре, пять образцов из корневых частей растения, гомогенизируя их, а затем определяя содержание каучука. Альтернативно содержание каучука в каждом из по крайней мере двух, трех, четырех или пяти образцов можно определить индивидуально, а затем содержание каучука в них можно усреднить.

Растение, которое может быть обеспечено в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно является нестрелкующимся растением, т.е. оно не выходит в стрелку перед холодной индукцией. Выход в стрелку представляет собой (преждевременное) образование цветущего стебля (или стеблей) на сельскохозяйственных и садовых культурах до сбора урожая. Преимущество нестрелкующихся растений заключается в том, что они будут оставаться на вегетативной (растущей) стадии в течение более длительного времени, например, пока не пройдет зима. Квалифицированный специалист знает, как он может отобрать нестрелкующиеся растения. Кроме того, предпочтительно, чтобы у растения не проявлялся летний покой. Летний покой представляет собой годовой цикл, который может встречаться у растений и который вызван химическими изменениями внутри растительных клеток. Он стимулируется условиями окружающей среды с более высокими температурами, относительной сухостью и более длинными днями, связанными с поздней весной и летом, что приводит к замедлению метаболизма растений. Квалифицированный специалист также знает, как он может провести отбор по этой характеристике.

В настоящем изобретении также обеспечивается семя, клетка или культура тканей, или корень (корни), происходящие из растения в соответствии с настоящим изобретением, а также применение растения в соответствии с настоящим изобретением для продукции каучука. Для последнего каучук, как правило, экстрагируют из корней растения.

Соответственно в настоящем изобретении также предусматривается каучук, который можно получить с помощью, например, экстракции из (корней) растения в соответствии с настоящим изобретением.

Каучук в соответствии с настоящим изобретением можно отличить от каучука, полученного способами известного уровня техники, потому что каучук имеет отличные свойства.

Конкретнее, каучук может характеризоваться следующим:

$M_n$ , составляющей по крайней мере 300000, 400000, 500000 дальтон, предпочтительно по крайней мере 510000, 520000, 530000, 540000, 550000, 560000, 570000, 580000, 590000, 600000, 700000 или 800000, 900000 или даже по крайней мере 1000000 дальтон;

$M_w$ , составляющей по крайней мере 700000, 800000, 900000, предпочтительно по крайней мере 910000, 920000, 930000, 940000, 950000, 960000, 970000, 980000, 990000, 1000000, 1100000 или 1200000, 1300000 или даже 14 00000, или 1500000, или 1600000, или по крайней мере 1700000 дальтон;

$M_z$ , составляющей по крайней мере 1000000, 1100000 или 1200000, 1300000 или даже по крайней мере 1400000, или 1500000, или 1600000, или 1700000 дальтон, 1800000, 1900000, или даже по крайней мере 2000000, 2100000, 2200000, 2300000, 2400000, 2500000, 2600000, 2700000, 2800000, 2900000 или даже 3000000, 3100000, 3200000, 3300000, 3400000, 3500000, 3600000, 3700000, 3800000, 3900000 или даже 4 000000 дальтон; и/или

полидисперсностью, составляющей не более 10,0, 9,0, 8,0, 7,0, 6,0, 5,0, 4,0, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, 3,5, 3,4, 3,3, 3,2, 3,1, 3,0, 2,9, 2,8, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1 или 2,0.

$M_n$  означает среднечисленную молекулярную массу,  $M_w$  представляет собой средневесовую молекулярную массу, а  $M_z$  представляет собой Z-среднюю молекулярную массу.

Полидисперсность представляет собой отношение  $M_w/M_n$ .

Дополнительно или альтернативно каучук может характеризоваться:

$M_n$ , составляющей не более 500000 дальтон, не более 510000, 520000, 530000, 540000, 550000, 560000, 570000, 580000, 590000, 600000, 700000 или 800000, 900000, или даже не более 1000000, 1100000, 1200000, 1300000, 1400000, 1500000, 1600000, 1700000, 1800000, 1900000, или не более 2000000 дальтон;

$M_w$ , составляющей не более 950000, 960000, 970000, 980000, 990000, 1000000, 1100000 или 1200000, 1300000 или даже не более 1400000, или 1500000, или 1600000, или 1700000, 1800000, 1900000, 2000000 или не более 2500000 дальтон;

$M_z$ , составляющей не более 1000000, 1100000 или 1200000, 1300000 или даже 1400000, или не более 1500000, или 1600000, или 1700000 дальтон, 1800000, 1900000 или даже не более 2000000, 2100000, 2200000, 2300000, 2400000, 2500000, 2600000, 2700000, 2800000, 2900000 или даже 3000000, 3100000, 3200000, 3300000, 3400000, 3500000, 3600000, 3700000, 3800000, 3900000 или даже 4000000, 4100000, 4200000, 4300000, 4400000, 4500000, 4600000, 4700000, 4800000, 4900000, 5000000 дальтон; и/или

полидисперсностью, составляющей по крайней мере 10,0, 9,0, 8,0, 7,0, 6,0, 5,0, 4,0, 3,0, 2,7, 2,6, 2,5, 2,4, 2,3, 2,2, 2,1, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, или 1,1, или по крайней мере 1,0.

$M_n$  может быть соотнесена с коллигативными свойствами полимера, например понижением температуры застывания.  $M_w$  может быть соотнесена с такими свойствами как вязкость расплава.  $M_z$  может быть соотнесена с такими свойствами как жесткость. Полидисперсность характеризует форму распределения: по мере снижения коэффициента распределения прочность и жесткость полимера обычно возрастают.

Дальнейшее объяснение  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_z$ , полидисперсности и то, как они могут быть измерены, можно найти, например, в главе 17 "POLYMER MOLECULAR WEIGHT MEASUREMENT", Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing, First Edition. Edited by Enrique Saldivar-Guerra and Eduardo Vivaldo-Lima. © 2013 John Wiley & Sons, Inc. Published 2013 by John Wiley & Sons, Inc. Предпочтительно, когда способ, описанный в примере, используется для определения качества каучука и указанных выше параметров.

Также предусмотрен продукт, содержащий каучук в соответствии с настоящим изобретением, причем предпочтительным продуктом является шина, такая как автомобильная шина. Таким образом, в настоящем изобретении также предусматривается автомобильная шина, содержащая каучук в соответствии с настоящим изобретением.

В конкретном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается способ получения растения вида *Taraxacum*, причем способ включает следующие этапы:

- a) скрещивание растений *Taraxacum officinale* (ТО) с растениями *Taraxacum koksaghyz* (TKS) для обеспечения растений поколения F1;
- b) возвратное скрещивание растений поколения F1 с растениями ТО для обеспечения растений поколения F2;
- c) интеркросс растений поколения F2 для обеспечения растений поколения G3;
- d) интеркросс растений поколения G3 для обеспечения растений поколения G3';
- e) возвратное скрещивание растений поколения G3' с растениями TKS для обеспечения растений поколения G4;
- f) интеркросс растений поколения для обеспечения растений поколения G4';
- g) возвратное скрещивание растений поколения G4' с растениями TKS для обеспечения растений

поколения G5;

h) отбор растений поколения G5 по отсутствию СРТ ТО для обеспечения отобранных растений поколения G5;

i) необязательно интеркросс отобранных растений поколения G5 для обеспечения растений поколения G6-a и/или возвратное скрещивание отобранных растений поколения G5 с растениями TKS для обеспечения растений поколения G6-b;

j) отбор растений поколения G6-a и/или отбор растений поколения G6-b по присутствию СРТ2 TKS, СРТ3 TKS, RTA TKS, SRPP5 (предпочтительно 1-5) TKS, REF TKS и необязательно SEQ ID NO:11, описанной в примере, для обеспечения растений поколения G6 первого отбора;

к) отбор не более 40% растений поколения G6 первого отбора по размеру растения (например, определяемому по площади поверхности самого длинного листа, количеству листьев, общему весу растения, или высоте растения над землей, или весу корней) для обеспечения растений поколения G6 второго отбора;

l) отбор не более 40% растений рода *Tagahasum* поколения G6 второго отбора по размеру генома для обеспечения растений поколения G6 третьего отбора.

Вышеупомянутый конкретный способ показан на фиг. 1. Предпочтительно, когда этапы a), b), c), d), e), f), g), h), i), j), k) и/или l) обеспечивают по крайней мере 10, 20, 50, 100, 1000, 1500 или по крайней мере 2000 растений. Процесс селекции может, кроме того, включать 1, 2, 3 и более дополнительных этапов возвратного скрещивания с TKS. Этап b) может быть необязательным. Этап c) также может быть необязательным. К тому же, этап d) может быть необязательным. Квалифицированный специалист может выбрать этапы, имея в виду, что целью способа является получение растения рода *Tagahasum* с указанными характеристиками. Аналогично этап e) может быть необязательным и/или этап f) может быть необязательным. В этом отношении этап g) также может быть необязательным, в то время как альтернативно или дополнительно этап h) может быть необязательным. Этап i) также может быть необязательным и/или этап j) может быть необязательным. Наконец, этап k) и/или этап l) могут быть необязательными. В способах в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно TKS всегда используется в качестве донора пыльцы (опылителя) на этапах скрещивания.

На этапе i) могут обеспечиваться две популяции растений: (1) растения поколения G6-a и (2) растения поколения G6-b. Две популяции могут быть объединены или поддерживаться раздельно на дальнейших этапах способа в соответствии с настоящим изобретением. Альтернативно обеспечиваются или растения поколения G6-a, или растения поколения G6-b.

#### **Краткое описание чертежа**

Схема интрогрессии и отбора в соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения. Генотопы подчеркнуты. Верхний индекс указывает процент происходящих от TKS генов и происходящих от ТО генов, при условии отсутствия нарушения сегрегации. В поколениях 3, 4 и 5 растения подвергаются возвратному скрещиванию с TKS и интеркроссу (гибридные группы). Интеркросс увеличивает рекомбинацию геномов TKS и ТО, тогда как возвратное скрещивание увеличивает долю генома TKS. В G4 отбирались только растения без ТОСРТ1. Поэтому у последующих поколений также нет этого гена. В настоящем изобретении интрогрессированные растения могут использоваться в качестве источников семян, а не как опылители, или интрогрессивные растения могут использоваться как опылители, а не как источники семян.

#### **Пример**

В следующей таблице представлены характеристики двух растений рода *Tagahasum*, полученных путем применения способа настоящего изобретения.

|   | Растение 1<br>поколения G4 | Растение 2<br>поколения G4 |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Размер генома, определенный с помощью проточной цитометрии, (мегабаз) | 1193                       | 1150                       |
| CPT1  | A                          | H                          |
| CPT2+3  | H                          | H                          |
| RTA   | H                          | B                          |
| SRPP5   | H                          | A                          |
| REF   | H                          | H                          |
| % каучука сухого веса в корнях  | <b>4,27</b>                | <b>4,84</b>                |
| Сухой вес корней (г)  | 56,60                      | 30,20                      |
| Выход каучука (г)   | <b>2,42</b>                | <b>1,46</b>                |
| Mn (г/моль)   | 395640                     | 583290                     |
| Mw (г/моль)   | 977430                     | 1228100                    |
| Mz (г/моль)   | 1865100                    | 3234800                    |
| Полидисперсность  | 2,47                       | 2,11                       |

A=гомозиготное по происходящему от TKS гену,

B=гомозиготное по происходящему от TO гену, H=гетерозиготное

#### Материал и методы

Определение содержания каучука (Collins-Silva J, et al., 2012, Phytochemistry, 79: 46-56).

Для экстракции натурального каучука из ткани корней с использованием гексана с 2,5% EtOH использовали устройство для ускоренной экстракции растворителем Dionex (ASE) 200 модели (Sunnyvale, CA). Ткань корней взвешивали. Лиофилизированную и измельченную ткань корней (приблизительно 0,1 г) из собранных растений и контрольных растений экстрагировали три раза. Каждый образец подвергали следующему способу: заполнение растворителем (н-гексаном с 2,5% EtOH) ячейки ASE (1 мин), нагревание и повышение давления в ячейке до 80°C и 1500 фунтов на квадратный дюйм (5 мин), 3 цикла, каждый состоящий из 5-минутной статической экстракции с промыванием струей свежего растворителя, и конечную продувку N<sub>2</sub>. Конечные, полученные с использованием гексана экстракты сушили под N<sub>2</sub> и хранили при 20°C. Содержание каучука определяли гравиметрически.

Качество каучука (Collins-Silva J, et al., 2012, Phytochemistry, 79: 46-56).

Для анализа с использованием HPLC, полученные с использованием гексана экстракты ресуспендировали в 2 мл THF в течение ночи при комнатной температуре. Экстракты из корней затем анализировали с помощью HPLC-GPC. Устройство, используемое для этих анализов, состояло из HP 1100 HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), одной защитной колонки Phenogel 50×7,80 мм и двух узких и длинных колонок Phenogel 10 I (300×7,80 мм) (Phenomenex, Torrance, CA), соединенных последовательно, и испарительного детектора по светорассеянию Sedex модели 75 (SEDERE, Франция). Образцы фракционировали с использованием изократического элюирования в толуоле при 70°C со скоростью потока 1 мл/мин. Хроматограммы снимали и анализировали с использованием программного обеспечения ChemStation для LC Rev.

A.10.02 (1757) (Agilent Технологии).

Молекулярную массу полимера каучука рассчитывали по данным HPLC-GPC, используя модуль ChemStation для анализа данных Agilent GPC (версию B.01.01). Калибровочные кривые для анализов молекулярной массы были получены исходя из полистирольных стандартов (Polymer Laboratories, UK) с M<sub>p</sub> (пиковыми молекулярными массами) в диапазоне от 1480 до 3114000 дальтон. Каучук анализировали количественно путем расчета массы каучука в зависимости от площади пика с использованием стандартной кривой, полученной исходя из серийных разведений известных количеств синтетического полиизопрена (Kraton Polymers IR-401, Houston, TX). Для каждого эксперимента анализировали экстракты из корней, стандарты молекулярной массы и стандарты для количественного анализа массы в одном и том же цикле для уменьшения вариабельности.

Протокол проточной цитометрии (Tas and van Dijk 1999, Heredity 83: 707-714).

Размер генома растений определяли путем измерения количества ядерной ДНК с помощью УФ проточного цитометра (PARTEC Ploidy Analyzer, PARTEC GmbH, Munster, Германия), используя модифицированный протокол Ulrich & Ulrich (1991 Protoplasma 165, 212-215). Свежий лист (1 см<sup>2</sup>) гибридного

растения и чистого TKS растения (которое, как принято считать, имеет размер генома 1420 мегабаз/1С) был измельчен вместе острым лезвием бритвы в 1 мл буфера для экстракции из ядер (0,1 М лимонной кислоты, содержащей 0,5% Твин 20). После фильтрации через фильтр 50 мкм (CellTrics, PARTEC) добавляли 1 мл раствора флуоресцентного красителя DAPI (0,4 М динатрийфосфата, 0,2 М NaCl и 5 мг л<sup>-1</sup> DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола)), и образцы измеряли непосредственно.

#### Анализ KASP.

Присутствие/отсутствие CPT TO, CPT2 TKS, CPT3 TKS, RTA TKS, SRPP5 TKS и REF TKS определяли с использованием анализа KASP со следующими последовательностями-маркерами (с выделением SNP (однонуклеотидного полиморфизма) жирным шрифтом). Анализ KASP известен квалифицированному специалисту и, например, описан Semagn и др. (2013 Molecular Breeding, 33 (1): 1-14).

#1. Маркер для CPT TO (CPT1\_2\_507T, SEQ ID NO:1)

GAGCCCGTAAGGATTGCTGCTGAGAAGGCCATGGAAGCCACCGCTAAAAATCAACCAC  
GTATCTCCTCGTATGTGTTGCTTACACTTCTTCCCATGAAAT

#2. Маркер для CPT2 TKS (CPT\_3\_192T, SEQ ID NO:2)

CCWATCCCAGAACACATCGCCTTCATCCTCGATGGAAACCGAAGGTTTCGCTAGGAAATG  
GAACCTCACAGAAGGCRMGCCACAAAACCGGYTTCCSTAGC

(W означает А или Т, Y означает С или Т, и M означает А или С)

#3. Маркер для CPT2 TKS и CPT3 TKS (CPT1\_2\_507C, SEQ ID NO:3)

GAGCCCGTAAGGATTGCTGCTGAGAAGGCCATGGAAGCCACCGCTAAAAACTCAACCAC  
GTATCTCCTCGTATGTGTTGCTTACACTTCTTCCCATGAAAT

(если отсутствие CPT2 TKS подтверждено маркером 2, этот маркер определяет специфически CPT3 TKS; или, если отсутствие CPT3 TKS подтверждено маркером 4, этот маркер определяет специфически TKS CPT2)

#4. Маркер для CPT TO и CPT3 TKS (CPT\_3\_192C, SEQ ID NO:4)

CCWATCCCAGAACACATCGCCTTCATCCTCGATGGAAACCGAAGGTTCCGCCAGGAAATG  
GAACCTCACAGAAGGCRMGCCACAAAACCGGYTTCCSTAGC

(если отсутствие CPT TO подтверждено маркером 1, этот маркер определяет специфически CPT3 TKS, или, если отсутствие CPT3 TKS подтверждено маркером 3, этот маркер определяет специфически CPT TO)

#5. Маркер для RTA TKS (RTA-1A, SEQ ID NO:5)

CTTTGTTTCGYGAGATCTTACGTGGAATTGAAARCTATCTTATAATAAATGAAATTGTGA  
AAACATATGAAGATCTGAATTTAAACAGAGTGAAATATCTTG

#6. Маркер для RTA TO (RTA-1G, SEQ ID NO:6)

CTTTGTTTCGYGAGATCTTACGTGGAATTGAAARCTATCTTATAATAAATGGAATTGTGA  
AAACATATGAAGATCTGAATTTAAACAGAGTGAAATATCTTG

#7. Маркер для SRPP5 TKS (SRPP5-2G, кластер SRPP, SEQ ID NO:7)

TGTTAAATAAGTTATGAGCGATTGTTTGGATTCTTATGATMTTTTCATGAGCGACTGTG  
TGCAAATTTTCATCCAATAATCTATGTGAACGCTCTTACTTGT

#8. Маркер для REF TKS (REF2C, SEQ ID NO:8)

ATTATGCAGGCTAAGGTCGAGAATGGATCTACAAAATCTAAATTGTTAGACSTTTTGAA  
GAAAATTTTCGCGGTATATTTGGCATTAGTCACGAGYGTGTT

#9. Маркер для SRPP5 TO (SRPP5-2T, кластер SRPP, SEQ ID NO:9)

TGTTAAATAAGTTATGAGCGATTGTTTGGATTCTTATGATMTTTTCATGATCGACTGTG  
TGCAAATTTTCATCCAATAATCTATGTGAACGCTCTTACTTGT

#10. Маркер для REF TO (REF2G, SEQ ID NO:10)

ATTATGCAGGCTAAGGTGAGAAATGGATCTACAAAATCTAAATTGTTAGAGCTTTTGAA  
GAAAATTTTCGCGGTATATTTGGCATTAGTCCAGAGYGTGTT

#11. Дополнительный маркер для TKS (SEQ ID NO:11)

CGACTTTATGCTCCGGTGAGGGTGGCGGCGGAGAAGGCGATGGAGGCCACAGCTAAGAA  
CACGAAGACTTATCTTTTGGTGTGTGTGGCGTATACTTCRTC

#12. Дополнительный маркер для TO (SEQ ID NO:12)

CGACTTTATGCTCCGGTGAGGGTGGCGGCGGAGAAGGCGATGGAGGCCACGGCTAAGAA  
CACGAAGACTTATCTTTTGGTGTGTGTGGCGTATACTTCRTC

Присутствие маркера в образце растения указывает на присутствие соответствующего гена в растении, из которого получен образец. Кроме того, анализ KASP позволяет определить, является ли растение гетерозиготным или гомозиготным по соответствующему гену на основе обнаруженного сигнала, как хорошо известно квалифицированному специалисту.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обеспечения и отбора мощных и каучуконосных растений рода *Taraxacum*, причем способ включает следующие этапы:

а) скрещивание, обратное скрещивание и/или интеркросс растений *Taraxacum koksaghyz* (TKS) и *Taraxacum officinale* (TO) для обеспечения растений рода *Taraxacum* с размером генома от 1000 до 1415 мегабаз;

б) отбор растений рода *Taraxacum* по отсутствию гена цис-пренилтрансферазы *T. officinale* (CPT TO);

с) отбор растений рода *Taraxacum* по присутствию по крайней мере трех генов, выбранных из группы, состоящей из цис-пренилтрансферазы 2 *T. koksaghyz* (CPT2 TKS), цис-пренилтрансферазы 2 *T. koksaghyz* (CPT3 TKS), активатора каучук-трансферазы *T. koksaghyz* (RTA TKS), белка P5 на поверхности небольших частиц каучука *T. koksaghyz* (SRPP5 TKS) и фактора элонгации каучука *T. koksaghyz* (REF TKS);

д) отбор не более 40% растений рода *Taraxacum* с наибольшим размером;

е) отбор не более 40% растений рода *Taraxacum* с наибольшим размером генома.

2. Способ по п.1, в котором обеспеченные на этапе а) растения рода *Taraxacum* имеют 60-99% происходящих от *Taraxacum koksaghyz* (TKS) генов и 1-40% происходящих от *Taraxacum officinale* (TO) генов.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором на этапе с) осуществляется отбор по присутствию по крайней мере четырех, предпочтительно по крайней мере пяти генов из CPT2 TKS, CPT3 TKS, RTA TKS, SRPP5 TKS и REF TKS.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором на этапе с) осуществляется отбор по гомозиготному отсутствию CPT2 TKS, CPT3 TKS, RTA TKS, SRPP5 TKS и/или REF TKS.

5. Мощное и каучуконосное растение рода *Taraxacum*, где растением является гибрид *Taraxacum koksaghyz* (TKS) и *Taraxacum officinale* и где растение получено способом по любому из предшествующих пунктов.

6. Растение рода *Taraxacum* по п.5, обладающее содержанием каучука, составляющим по крайней мере 0,5 г, предпочтительно по крайней мере 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75 или по крайней мере 2,00 г сухого веса, что определяется с помощью ускоренной экстракции растворителем.

7. Растение рода *Taraxacum* по п.5 или 6, обладающее сухим весом корней, составляющим по крайней мере 5 г, предпочтительно по крайней мере 6, 7, 8, 9 или 10 г;

содержанием каучука в корнях, составляющим по крайней мере 3 вес.%, предпочтительно по крайней мере 3,5, 4,0, 4,5 или 5,0 вес.% сухого веса относительно общего сухого веса корней, что определяется с помощью ускоренной экстракции растворителем.

8. Растение рода *Taraxacum* по любому из пп.5-7, обладающее CPT2 TKS, CPT3 TKS, RTA TKS, SRPP5 TKS и/или REF TKS.

9. Растение рода *Taraxacum* по любому из пп.5-8, обладающее размером генома, составляющим по крайней мере 1000 мегабаз, предпочтительно по крайней мере 1100 мегабаз.

10. Растение рода *Taraxacum* по любому из пп.5-9, отличающееся тем, что растение является гомозиготным по CPT2 TKS, CPT3 TKS, RTA TKS, SRPP5 TKS и/или REF TKS.

11. Растение рода *Taraxacum* по любому из пп.5-10, отличающееся тем, что растение является нестрелкующимся.

12. Применение растения рода *Taraxacum* по любому из пп.5-11 для продукции каучука.

13. Способ получения каучука, включающий этап экстракции каучука из растения по любому из пп.5-11.

14. Способ по п.13, в котором каучук характеризуется

M<sub>n</sub>, составляющей по крайней мере 500000 г/моль;  
M<sub>w</sub>, составляющей по крайней мере 1000000 г/моль;  
M<sub>z</sub>, составляющей по крайней мере 2500000 г/моль; и  
полидисперсностью от 1,0 до 5,0.

