

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390524 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.05

(51) Int. Cl. A01H 6/54 (2018.01)
A01H 5/00 (2018.01)
A01H 5/10 (2018.01)
A01H 1/02 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.04

(54) СЕЛЕКЦИЯ СПОСОБОМ ОТДАЛЕННОГО СКРЕЩИВАНИЯ

(31) 63/064,511

(72) Изобретатель:

(32) 2020.08.12

Доусон Джон Лютер, Шуллер Крейг,
Келлихер Тимоти, Лю Цингли (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/044428

(74) Представитель:

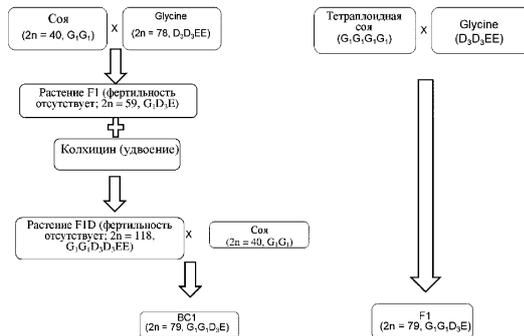
(87) WO 2022/035648 2022.02.17

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(71) Заявитель:

СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ
(CH)

(57) Гены, встречающиеся у дикорастущих видов, могут придать полезные признаки культивируемым сельскохозяйственным растениям. Например, дикорастущие виды *Glycine* могут обеспечить устойчивость к широкому спектру популяций ржавчины сои при интрогрессии в сою. Раньше для успешной интрогрессии требовались опыления способом отдаленного скрещивания, спасение зародыша и регенерация побегов F1. Более того, для получения фертильных амфидиплоидов (F1D) требовалось удвоение хромосом, которое может быть достигнуто посредством химической обработки зародышей. Затем требовалось возвратное скрещивание с соей с целью получения генетики BC1F1. В данном документе описаны усовершенствованные процедуры межвидового скрещивания сои и *Glycine tomentella*. Данные процедуры предлагают более эффективный путь к получению генетики BC1F1, минуя поколение амфидиплоидов. Данные идеи можно применять к дополнительным культивируемым видам и их дикорастущим родственникам, таким как *Brassica*.



A1

202390524

202390524

A1

СЕЛЕКЦИЯ СПОСОБОМ ОТДАЛЕННОГО СКРЕЩИВАНИЯ

5 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области селекции растений. Более конкретно, настоящее изобретение относится к межвидовой селекции (иногда называемой "отдаленным скрещиванием") между растениями, обычно не способными к перекрестному опылению. Настоящее изобретение также относится к удвоению генома культивируемого растения для того, чтобы сделать его более совместимым и эффективным для скрещивания с геномом дикорастущего растения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

К настоящей заявке прилагается перечень последовательностей под названием 82180PCT_ST25.txt, созданный 3 августа 2021 г., размер которого составляет примерно 3 килобайта. Данный перечень последовательностей включен в данный документ посредством ссылки в его полном объеме. Данный перечень последовательностей подается вместе с данной заявкой через EFS-Web и отвечает §1.824(a) (2) – (6) и (b) раздела 37 C.F.R.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Соя является одной из важнейших сельскохозяйственных культур в мире. Она экономически важна, поскольку служит основным источником для многих областей, таких как продукты питания, белок, масло и другие продукты из сои. Род *Glycine* содержит 2 подрода, состоящих из многолетних (подрод *Glycine*) и однолетних (подрод *Soja*). Существует более 26 многолетних видов, которые сильно различаются.

25 Как правило, большую часть селекции сои для улучшения сортов проводят с растениями *Soja*; однако многолетние виды обладают собственными полезными агрономическими признаками, которые на данный момент еще не полностью изучены. Данные признаки были бы полезны, если бы их путем селекции ввести в культурную сою, а использование многолетних *Glycine* значительно расширило бы генетическое

30 разнообразие; однако отдаленная гибридизация однолетних и многолетних растений с помощью общепринятых способов является затруднительной и неэффективной. Дикорастущие многолетние виды *Glycine* могут иметь совершенно другой набор и другое количество хромосом, чем культивируемое сельскохозяйственное растение, которое называют культивируемой соей. В качестве примера и без ограничения,

дикорастущее растение *G. tomentella* имеет 39 различных хромосом, а культивируемое растение *G. max* имеет 20. Текущая практика заключается в получении бесплодного гибрида *G. max* и *G. tomentella*. И без того чрезвычайно неэффективный способ (получают небольшое количество бесплодных гибридов) еще дополнительно усугубляется способом удвоения хромосом, т. е. редко получаемый бесплодный гибрид должен иметь хромосомы, удвоенные с помощью химического средства (обычно колхицина) для того, чтобы он стал фертильным, известный как F1D или амфидиплоидное растение, прежде чем его можно будет скрестить с *G. max*. Немногие особи выживают в данном способе.

10 Существует множество возбудителей заболеваний, которые угрожают производству сои, например азиатская ржавчина сои ("ASR") и цистообразующая нематода сои ("SCN"). Сообщается, что было обнаружено, что линии *G. tomentella* обладают устойчивостью как к ASR, так и к SCN. См. патент США № 7842850 (поданный 4 мая 2006 г.), включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

15 Например, ржавчину сои вызывают два вида: *Phakopsora pachyrhizi* и *Phakopsora meibomia*. ASR, вызываемая *P. pachyrhizi*, является одним из наиболее опасных заболеваний, поражающих бобовые сельскохозяйственные культуры. Данный агрессивный возбудитель заболевания возник в Восточной Азии и впервые был обнаружен в континентальной части Соединенных Штатов в 2004 году. Это паразит, который уничтожает листья растений. *P. pachyrhizi* может инфицировать более 95 видов, в основном бобовые; альтернативные хозяева служат резервуаром для накопления инокулята. Заражение возбудителем заболевания происходит быстро, поскольку споры могут заражать напрямую, без необходимости в ране или устье. При оптимальных температурно-влажностных условиях заражение может произойти за 6 часов. На зараженных листьях растений появляются пятна, пропитанные водой, которые прогрессируют до красновато-коричневых или желтовато-коричневых очагов поражений. Зараженная листва становится бронзово-желтой, в результате чего может произойти преждевременный листопад, что в конечном итоге влияет на количество стручков и вес семян. Споры распространяются по воздуху, и в самых оптимальных

20

25

30 условиях растение может пройти путь от первых признаков заражения до сильного листопада за 1–2 недели.

Сообщалось о потерях урожая до 80% по причине ASR (см. Kawashima *et al.* (2016) *Nat. Biotechnol.* 34:661-65). Существует несколько основных мер борьбы, применяемых против ASR: мониторинг сельскохозяйственных культур, химические фунгициды,

селекция устойчивых сортов сои и специальные практические способы
культивирования. Заболеваемость растений можно контролировать с помощью
агротехнических практических способов, включающих традиционные методики
селекции, севооборот и применение синтетических агрохимикатов. Однако
5 традиционные способы селекции отнимают много времени и нуждаются в постоянных
усилиях для поддержания устойчивости к заболеваниям по мере эволюционирования
возбудителей заболеваний растений. См. Grover and Gowthaman (2003) *Curr. Sci.*
84:330-340.

Кроме того, существует множество других биотических стрессов, грибков, а также
10 бактерий (например, бактериальная пустула), вирусов (например, вирус мозаики сои) и
нематод (например, цистообразующая нематода сои, "SCN"), которые вызывают
проблемы при выращивании сои. Также необходимы улучшения в отношении
абиотических стрессов (например, засухоустойчивости) и различных агрономических
признаков (например, селекция для более высокой урожайности, а также содержание
15 белка и масла). Для того чтобы помочь в решении таких, а также других проблем,
полезным инструментом может быть селекционное скрещивание однолетника *Glycine* с
дикорастущим многолетником *Glycine*. Дикорастущий многолетник *Glycine* охватывает
широкий спектр геномного, цитологического и морфологического разнообразия,
которое может служить полезным источником зародышевой плазмы.

20 Сложность селекции полезных признаков у растений не является проблемой,
присущей только сое. Другой пример таких проблем при селекции культивируемых и
дикорастущих видов включает виды *Brassica*. Как правило, подвиды внутри вида
Brassica являются совместимыми для скрещивания. Однако разные виды *Brassica* не
всегда характеризуются одинаковой совместимостью. Например, у дикорастущего вида
25 *B. rapa* имеется 10 хромосом, а у культивируемого вида *B. oleracea* имеется 9
хромосом. Данное хромосомное различие делает их несовместимыми для скрещивания.
Как и в случае с соей, данная несовместимость очень затрудняет перенос признака от
одного вида *Brassica* к другому.

Учитывая значительное влияние возбудителей заболеваний растений, вредителей и
30 других стрессов на урожайность и качество сои и других сельскохозяйственных
культур, необходимы другие способы борьбы. По причине сложности селекционного
скрещивания однолетника и многолетника *Glycine* необходимы дополнительные
способы для их отдаленной гибридизации. Настоящее изобретение предусматривает
решение для гибридизации видов с получением в результате фертильных растений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе предложены способы эффективного получения фертильных гибридов от культивируемой сои и дикорастущего многолетника *Glycine* с применением тетраплоидной сои. С помощью данных способов можно получить фертильные гибриды, которые можно дополнительно подвергнуть возвратному скрещиванию с соей с переносом требуемых генов и признаков из дикорастущего *Glycine* в культивируемую сою. В результате получают культивируемую сою с требуемыми признаками дикорастущего растения без необходимости искусственной генетической модификации или редактирования генов.

Также предусмотрен способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от дикорастущего вида *Glycine* (например, *G. tomentella*) и культивируемой сои (т. е. *G. max*). Гибридные растения, полученные данным способом, получают путем скрещивания культивируемой сои с удвоенным геномом с дикорастущим *Glycine*. Культивируемую сою с удвоенным геномом получают сначала путем применения средства, препятствующего образованию микротрубочек (например, колхицина). Такую сою с удвоенным геномом затем скрещивают с дикорастущим *Glycine* и, необязательно, применяют ауксин с получением по меньшей мере одного фертильного гибридного потомка. Гибридный потомок F1 содержит $2n^D$ хромосом культивируемой сои и $1n^W$ хромосом дикорастущего *Glycine*. Данный гибридный потомок можно скрестить с растением сои (с получением растения BC1), а также затем скрестить гибридное растение F1 с дикорастущим растением *Glycine*. В данном способе как растение сои с удвоенным геномом, так и *Glycine tomentella* могут служить либо мужским, либо женским растением во время скрещивания. На фиг. 1 проиллюстрировано настоящее изобретение на основании тетраплоидных видов *Glycine*, в частности *G. tomentella*. Данный способ можно применять с другими однолетними видами, такими как *G. soja*, и другими дикорастущими многолетними видами. Более того, данный способ можно применять для культивируемых видов *Brassica*. Например, данный способ можно реализовать с применением *B. oleracea* и *B. rapa*.

Данный способ представляет собой усовершенствованный способ получения линий культивируемой сои, характеризующейся признаками, аллелями или фенотипами дикорастущих видов *Glycine*, которых изначально не было в культивируемой сое. Примером такого признака, аллеля или фенотипа является повышенная устойчивость к такому возбудителю заболевания, как ржавчина сои. Данные способы

предусматривают интрогрессию признака, аллеля или фенотипа из дикорастущего *Glycine* в культивируемое растение сои.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 5 SEQ ID NO: 1–2 представляют собой праймеры, применяемые в анализе TaqMan ID 3289.
SEQ ID NO: 3 представляет собой зонд, применяемый в анализе TaqMan ID 3289.
SEQ ID NO: 4–5 представляют собой праймеры, применяемые в анализе TaqMan ID 3316.
- 10 SEQ ID NO: 6 представляет собой зонд, применяемый в анализе TaqMan ID 3316.
SEQ ID NO: 7–8 представляют собой праймеры, применяемые в анализе TaqMan ID 3434.
SEQ ID NO: 9 представляет собой зонд, применяемый в анализе TaqMan ID 3434.
SEQ ID NO: 10–11 представляют собой праймеры, применяемые в анализе TaqMan ID
- 15 3435.
SEQ ID NO: 12 представляет собой зонд, применяемый в анализе TaqMan ID 3435.
SEQ ID NO: 13–14 представляют собой праймеры, применяемые в анализе TaqMan ID 3537.
SEQ ID NO: 15 представляет собой зонд, применяемый в анализе TaqMan ID 3537.
- 20 SEQ ID NO: 16–17 представляют собой праймеры, применяемые в анализе TaqMan ID 3538.
SEQ ID NO: 18 представляет собой зонд, применяемый в анализе TaqMan ID 3538.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

- 25 На фиг. 1 представлена диаграмма, на которой изображены различия между двумя способами: традиционным интрогрессированием генов дикого растения *Glycine* в культивируемую сою и более эффективный способ с применением описываемой в данном документе сои с удвоенным геномом. После получения сои с удвоенным геномом настоящий способ позволяет избежать стадии стандартного способа, которая в
- 30 наибольшей степени ограничивает скорость: обработки колхицином. В данном способе пропускают первое поколение, для которого необходимо больше всего времени, что занимает от 4 до 12 месяцев до завершения данной стадии. Имеет место меньшая потребность в протоколах спасения зародыша, и сокращается время для созревания семян. На фиг. 1 проиллюстрирован настоящий способ на основании тетраплоидных видов *Glycine*, в частности *G. tomentella*. Данный способ можно применять с другими

однолетними видами, такими как *G. soja*, и другими дикорастущими многолетними видами. Более того, данный способ можно применять для культивируемых видов *Brassica*. Например, данный способ можно реализовать с применением *B. oleracea* и *B. rapa*.

5 На фиг. 2 представлено конфокальное изображение распространения 79 хромосом F1, полученное с помощью контрастного окрашивания хромосом посредством DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) при длине волн возбуждающего света 405 нм. Корневой материал получен от растения F1, полученного в результате скрещивания сои с удвоенным генотипом ($4n = 80$) x *Glycine tomentella* ($2n = 78$).

10 На фиг. 3 представлено конфокальное изображение меченых центромер 40 хромосом сои с мечеными центромерами сои с применением Alexa Fluor® 488 при длине волн возбуждающего света 488 нм. Корневой материал получен от растения F1, полученного в результате скрещивания сои с удвоенным генотипом ($4n = 80$) x *Glycine tomentella* ($2n = 78$).

15 На фиг. 4 представлены объединенные конфокальные изображения распространения как 40 хромосом сои, помеченных с помощью центромер, так и 39 хромосом *G. tomentella* без мечения центромер. Корневой материал получен от растения F1, полученного в результате скрещивания сои с удвоенным генотипом ($4n = 80$) x *Glycine tomentella* ($2n = 78$) ($n = 40 + 39$).

20 ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Используемый в данном документе термин "дикорастущие виды *Glycine*" относится к любым многолетним или однолетним видам *Glycine*, которые не были окультурены. Используемый в данном документе термин "дикорастущие многолетние виды *Glycine*" относится к любому из более чем 26 дикорастущих многолетних видов *Glycine* с
 25 различными геномами (например, $2n = 38, 40, 78, 80$). Примером вида является *Glycine tomentella*. Используемый в данном документе термин " n^W " относится к количеству различных хромосом, обнаруживаемых у дикорастущего многолетнего вида *Glycine*. В качестве примера и без ограничения, *Glycine tomentella* обычно имеет две копии 39 различных хромосом (содержащих геном D и геном E), поэтому его n^W равно 39, а его
 30 $2n^W$ равно 78. Отсюда следует, что *Glycine tomentella* имеет геном DDEE. Термин "дикорастущий однолетний вид *Glycine*" относится, например, к *Glycine soja*.

Используемый в данном документе термин "культивируемый однолетний вид *Glycine*" включает преобладающий культивируемый вид *Glycine*, т. е. *Glycine max*. *Glycine max* обычно имеет две копии 20 различных хромосом (каждая из генома G),

поэтому его n^D равно 20, а его $2n^D$ равно 40. Используемый в данном документе термин "диплоидное растение сои" или " $2n^D$ " относится к растению *Glycine max*, которое имеет две копии 20 различных хромосом, поэтому его n^D равно 20, а его $2n^D$ равно 40.

Используемый в данном документе термин " n^D " относится к количеству различных хромосом, обнаруживаемых у культивируемого вида *Glycine*. Отсюда следует, что *Glycine max* имеет геном GG. Данный термин может также относиться к растению сои, содержащему предковые гены, интрогрессированные ранее, при сохранении генома GG. Термины соя, соя культурная, диплоидное растение сои, *Glycine max* и культивируемый однолетний вид *Glycine* используются по всему тексту взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин "растение сои с удвоенным геномом" или "тетраплоидное растение сои" или " $4n^D$ " относится к культивируемому однолетнему растению *Glycine* с удвоенным геномом. Типичное культивируемое однолетнее растение *Glycine* имеет две копии 20 различных хромосом (каждая из генома G), следовательно, его n^D равно 20, а его $2n^D$ равно 40, с геномом GG. Данные термины могут также относиться к растению сои с удвоенным геномом, содержащему предковые гены, интрогрессированные ранее, при сохранении генома GG. У "растения сои с удвоенным геномом" или "тетраплоидного соевого растения" хромосомы удвоились за счет нарушения образования волокон митотического веретена, как правило, с помощью средства, вызывающего удвоение набора хромосом ("CDA"), например колхицина, что приводит в результате к $4n^D$, где его $4n^D$ равно 80, и у него геном GGGG. "Растение с удвоенным геномом" или "тетраплоидное растение сои" также может называться "реципиентным геномом".

Используемый в данном документе термин "реципиентный вид" относится к виду, в котором геном данного вида удвоен для обеспечения более эффективного скрещивания с альтернативным видом, например, дикорастущим видом. Например, реципиентный вид может представлять собой *Glycine max* (n^D равно 20, а $2n^D$ равно 40) или *Brassica oleracea* (n^D равно 9, а $2n^D$ равно 18). Данные примеры видов можно скрестить, например, с геномом *G. tomentella* (n^W равно 39, а $2n^W$ равно 78) или *Brassica rapa* (n^W равно 10, а $2n^W$ равно 20) соответственно. Хромосомы "реципиентного вида" могут быть удвоены для эффективного скрещивания с дикорастущим видом; например, *G. max* с удвоенным геномом дает $4n^D = 80$, или *B. oleracea* дает $4n^D = 36$. В тех случаях, когда геном реципиентного вида представлен без надстрочного индекса ^D или без надстрочного индекса ^W, т. е. как "n" для гаплоидного генома, "2n" для диплоидного

генома и т. д., обозначение отражает возможность того, что реципиентный вид может быть либо культивируемым видом, либо дикорастущим видом.

Используемый в данном документе термин "донорский вид" относится к виду, в котором вид служит донором хромосом при скрещивании с реципиентным видом.

5 Например, донорским видом может быть *Glycine tomentella* с $n^W = 39$. *G. tomentella* можно скрестить, например, с *G. max* с удвоенным геномом (реципиентным видом) с n^D , равным 20, и $2n^D$, равным 40. В тех случаях, когда геном донорского вида представлен без надстрочного индекса ^D или без надстрочного индекса ^W, т. е. как "n" для гаплоидного генома, "2n" для диплоидного генома и т. д., обозначение отражает
10 возможность того, что донорский вид может быть либо культивируемым видом, либо дикорастущим видом.

Используемый в данном документе термин "гибрид" относится к потомку, полученному путем скрещивания двух генетически несходных родительских растений.

Используемый в данном документе термин "гибридный потомок" относится к
15 потомку, полученному в результате скрещивания культивируемого вида *Glycine* с удвоенным геномом и дикорастущего вида *Glycine*.

Используемый в данном документе термин "ауксин" относится к растительным гормонам, которые способствуют удлинению клеток, в конечном итоге регулирующим
20 рост растений. Ауксин, применяемый в настоящем изобретении, может включать без ограничения природные или синтетические ауксины, такие как дикамба (3,6-дихлор-20-метоксибензойная кислота), IAA (индол-3-уксусная кислота), NAA (1-нафталинуксусная кислота) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D).

Используемый в данном документе термин "средство, вызывающее удвоение набора хромосом" ("CDA") или "средство, препятствующее образованию
25 микротрубочек" относится к соединению, такому как без ограничения колхицин, трифлуралин, пронамид, амипрофос-метил (APM), дитиопир, карбетамид, хлортал диметил, изопропалин, нитралин и закись азота, используемые для предотвращения образования волокон митотического веретена. Следует понимать, что средства, препятствующие образованию микротрубочек, включают любой белок, пептид,
30 химическое вещество или другую молекулу, которая нарушает функцию микротрубочек, например, путем предотвращения полимеризации тубулина. Нарушение образования микротрубочек в конечном итоге приводит к торможению хромосомной миграции, что приводит к образованию клетки с удвоенным количеством хромосом.

Используемый в данном документе термин "плоидность" относится к количеству наборов хромосом в клетке или клетках организма.

Используемый в данном документе термин "генотип" относится к генетической структуре организма.

5 Используемый в данном документе термин "требуемый признак, аллель или фенотип" относится к представляющей интерес характеристике у дикого вида *Glycine*, которая требуется у культивируемого вида *Glycine*. Такой "признак, аллель или фенотип" может включать устойчивость к азиатской ржавчине сои, цистообразующей нематоды сои, бактериальной пустуле, угольной гнили, корневой гнили и раку стебля. В
10 качестве альтернативы, такой признак, аллель или фенотип включает повышенную урожайность, повышенное содержание белка, повышенное содержание масла, повышенную засухоустойчивость или увеличенные периоды цветения.

Используемый в данном документе термин "интрогрессия" относится к введению признака, аллеля или фенотипа из генома одного растения, т. е. дикорастущего
15 растения, т. е. дикорастущего вида *Glycine*, в геном другого растения, т. е. культивируемый вид *Glycine*, у которого отсутствует такой признак, аллель или фенотип.

Используемый в данном документе термин "хромосома" относится, как известно в данной области, к самовоспроизводящейся генетической структуре в клеточном ядре,
20 содержащей клеточную ДНК и несущей линейный набор генов.

Используемый в данном документе термин "самовоспроизведенный" или "самовоспроизводство" относится к получению семян путем самооплодотворения или самоопыления; т. е. пыльца и семязачаток происходят из одного и того же растения.

Используемый в данном документе термин "F1D" или "амфидиплоид" относится к
25 межвидовому гибриду с одним полным диплоидным набором хромосом, происходящим от каждого родительского вида.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Предложен способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от дикорастущего многолетнего вида *Glycine* и культивируемого однолетнего вида
30 *Glycine*. В одном варианте осуществления способ предусматривает а) получение культивируемого однолетнего растения *Glycine* с удвоенным геномом, б) скрещивание растения сои с удвоенным геномом с растением дикорастущего многолетнего вида *Glycine*, содержащим $2n^W$ хромосом, с) применение ауксина и d) получение от них по меньшей мере одного гибридного потомка, где гибридный потомок содержит $2n^D$

хромосом культивируемого *Glycine* и $1n^W$ хромосом дикорастущего *Glycine*. В одном аспекте способ предусматривает скрещивание по меньшей мере одного гибридного потомка с диплоидным растением сои с получением гибридного растения BC1F1. В отдельном варианте осуществления способ предусматривает скрещивание гибридного растения F1 с дикорастущим растением *Glycine*. По меньшей мере один гибридный потомок по настоящему способу является фертильным.

В другом варианте осуществления растение сои с удвоенным геномом получают с применением средства, препятствующего образованию микротрубочек, где средство выбрано из группы, состоящей из колхицина, трифлуралаина и пронамида. Растение или клетка растения сои с удвоенным геномом представляет собой растение или клетку растения *Glycine max*, где растение или клетка растения *Glycine max* имеет плоидность $2n^D$, где n^D означает количество различных хромосом культивируемого растения, и где n^D равно 20. В одном аспекте растение сои с удвоенным геномом имеет плоидность $4n^D$, где n^D означает количество различных хромосом культивируемого растения, и где n^D равно 20. Растение сои с удвоенным генотипом имеет генотип GGGG и может служить либо мужским, либо женским родителем. В одном варианте осуществления дикорастущий вид *Glycine* представляет собой *Glycine tomentella*. В одном аспекте *Glycine tomentella* имеет плоидность $2n^W$, где n^W означает количество различных хромосом дикорастущего многолетнего растения, и где n^W равно 39. *Glycine tomentella* имеет генотип DDEE и может служить либо мужским, либо женским родителем. По меньшей мере один гибридный потомок имеет генотип GGDE.

В одном варианте осуществления дикорастущий вид *Glycine* характеризуется требуемым признаком, аллелем или фенотипом. В одном аспекте требуемый признак, аллель или фенотип придает повышенную устойчивость к азиатской ржавчине сои, цистообразующей нематоде сои, бактериальной пустуле, угольной гнили, корневой гнили, раку стебля или другому возбудителю заболевания сои. В качестве альтернативы, такой признак, аллель или фенотип включает повышенную урожайность, повышенное содержание белка, повышенное содержание масла, повышенную засухоустойчивость или увеличенные периоды цветения. Другой вариант осуществления относится к культивируемому растению сои, характеризующемуся признаком, аллелем или фенотипом от дикорастущего вида *Glycine*, где признак, аллель или фенотип интрогрессирован описанным ранее способом. Еще один вариант осуществления относится к гибриднему растению, полученному данным способом, где гибридное растение имеет генотип GGDE.

В другом варианте осуществления предложен способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от дикорастущего вида растения и культивируемого вида растения. Указанный способ предусматривает а) получение культивируемого растения с удвоенным геномом, содержащего реципиентный геном культивируемого растения из

5 $4n^D$ хромосом, b) скрещивание культивируемого растения с удвоенным геномом с растением дикорастущего вида, содержащим $2n^W$ хромосом, с) применение ауксина и d) получение от них по меньшей мере одного гибридного потомка,

где гибридный потомок содержит $2n^D$ хромосом культивируемого растения и $1n^W$ хромосом дикорастущего растения. Удвоенный реципиентный геном по настоящему способу выбран из группы, состоящей из Glycine, Brassica, Cucurbits, Helianthus, Solanaceae и Petunia. В одном аспекте способ предусматривает скрещивание по

10 меньшей мере одного гибридного потомка с культивируемым видом растения с получением растения с BC1F1. В другом аспекте способ дополнительно предусматривает скрещивание растения BC1F1 с растением дикорастущего вида. По

15 меньшей мере один гибридный потомок по настоящему способу является фертильным.

В другом варианте осуществления предложен способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от многолетнего вида и однолетнего вида. Указанный способ предусматривает а) получение однолетнего растения с удвоенным геномом, содержащего реципиентный геном из $4n$ хромосом, b) скрещивание однолетнего

20 растения с удвоенным геномом с растением многолетнего вида, содержащим $2n$ хромосом, с) применение ауксина и d) получение от них по меньшей мере одного гибридного потомка, где гибридный потомок содержит $2n$ хромосом однолетнего растения и $1n$ хромосом многолетнего растения. В еще одном варианте осуществления предусмотрен способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от

25 донорского вида растения и реципиентного вида растения. Указанный способ предусматривает а) получение реципиентного растения с удвоенным геномом, содержащего геном из $4n$ хромосом, b) скрещивание реципиентного растения с удвоенным геномом с растением донорского вида, содержащим $2n$ хромосом, с) применение ауксина и d) получение от них по меньшей мере одного гибридного

30 потомка, где гибридный потомок содержит $2n$ хромосом реципиентного растения и $1n$ хромосом донорского растения.

ПРИМЕРЫ

Заявители оценивали известный из уровня техники способ стандартной интрогрессии. При осуществлении на практике данных способов заявители получали

растения F1 с удвоенным геномом (F1D), но не смогли успешно скрестить F1D с диплоидной соей для получения BC1. Данные результаты подтверждают сложность и низкую эффективность известного из уровня техники способа и необходимость в более эффективных способах, таких как описанный в последующих примерах.

5 Пример 1. Способ получения сои с удвоенным геномом

Линии сои с удвоенным геномом (тетраплоидной сои) получали из двух элитных линий, обычно применяемых в отдаленных скрещиваниях, называемых в данном документе женская линия 1 и женская линия 2; данные линии *Glycine max* имели 40 хромосом (геном G₁G₁). Незрелые зародыши сои в среде для культивирования тканей обрабатывали примерно 0,25-1,0 мг/мл колхицина в течение 3-4 дней при 25°C. Регенерированные растения переносили в почву и брали образцы листьев для анализа пloidности с целью подтверждения удвоения хромосом. Тетраплоидные растения оставляли для самовоспроизводства и на зародышах проводили анализ пloidности с подтверждением удвоения генома. В результате самовоспроизводства тетраплоидной сои получали неограниченный запас семян.

15 Пример 2. Способ скрещивания сои с удвоенным геномом с дикорастущими *Glycine*

При применении тетраплоидной сои в качестве женского родителя бутоны сои перед цветением обрабатывали путем осторожного удаления чашелистиков и лепестков для того, чтобы обнажить зрелое рыльце. Пыльцу только что распутившихся цветков *G. tomentella* (2n=78) получали путем осторожного удаления лепестков для того, чтобы обнажить зрелые пыльники, и распыления пыльцы на рыльце сои. Когда в качестве мужского родителя применяли сою с удвоенным геномом, ранее описанный способ был обратным. Применяемые дикорастущие многолетники *Glycine* перечислены в таблице 1. Результаты, полученные в результате скрещиваний сои с удвоенным геномом x *Glycine*, можно найти в таблице 2.

25 Таблица 1. Линии дикорастущих многолетников *Glycine*, скрещенные с тетраплоидной соей

Сокращения	Изоферментная группа	Линия	2n набор хромосом, кол-во
M1	T1	PI 441001	78
M4	T5	PI 509501	78
M5	T1	PI 483224	78
M14	T1	PI 499939	78
M15	D3	PI 505267	40

Таблица 2. Суммарные количества для каждой комбинации сои с удвоенным геномом x многолетник *Glycine*

Скрещивание	События опыления	Зародыши	Зародыши/скрещивание	Побеги	События опыления/побег	Побеги/зародыш (%)
Женское растение 1xM1	20	10	0,50	1	20	10
Женское растение 2xM1	12	8	0,67	2	6	25
Женское растение 1xM14	604	293	0,49	23	26,3	7,8
Женское растение 2xM14	78	23	0,29	2	39	8,7
Женское растение 1xM4	46	15	0,33	1	46	6,7
Женское растение 1xM5/M14	61	22	0,36	2	30,5	9,1
Женское растение 1xM15	22	4	0,18	1	22	25
Женское растение 2xM15	28	2	0,07	0	Н. д.	Н. д.
Женское растение 1xM5	9	4	0,44	0	Н. д.	Н. д.

Пример 3. Применение ауксина

- 5 Дикамбой, синтетическим ауксиновым гербицидом, опрыскивали продукты скрещивания тетраплоидов x *Glycine* для образования стручков и зародышей. Как видно из таблицы 3, дикамбу распыляли в концентрации 3-20 мг/л. Для достижения хорошего насыщения опыленного гинецея и узла, к которому он был прикреплен, применяли распылитель или пульверизатор. В таблице 3 также показано, что оценивали различные дни применения (т. е. 1–5 дней опрыскивания).

Таблица 3. Таблица, в которой показаны различные обработки ауксином (дикамбой) для всех событий скрещивания

Обработка дикамбой*	Количество дней обработки	Количество событий опыления	Количество зародышей	Зародыши/скрещивание	Побеги
BC 3D	5 дней	34	15	0,44	3
BC 5D	1 день	4	0	0,00	0
BC 5D	2 дня	332	139	0,42	10
BC 5D	3 дня	249	110	0,44	10
BC 7D	3 дня	86	32	0,37	3
BC 10D	1 день	34	9	0,26	0
BC 10D	2 дня	93	53	0,57	4
BC 10D	3 дня	38	21	0,55	2
20D	2 дня	9	2	0,22	0

*BC содержит 100 мг/л GA3 + 5 мг/л кинетина; D = мг/л дикамбы.

- 15 *BC 3D содержит 3 мг/л дикамбы, BC 5D содержит 5 мг/л дикамбы и т. д.

*20D содержит только 20 мг/л дикамбы.

Пример 4. Возвратное скрещивание

После получения F1 путем скрещивания сои с удвоенным геномом с дикорастущим *Glycine* F1 затем подвергали возвратному скрещиванию с культивируемой соей с получением BC1F1. Производили второе возвратное скрещивание с культивируемой соей с получением потомков с BC2F1. При способе по настоящему изобретению необходимо меньше стадий спасения зародыша для получения зрелого семени. Как видно из таблицы 4, успешное получение потомков с BC2F1 было достигнуто с применением нового, более эффективного способа интрогрессии тетраплоидных родителей сои.

Таблица 4. Результаты возвратного скрещивания гибрида F1 с культивируемой соей в течение двух поколений

Скрещивание	ID побега F1, количество	Количество потомков с BC1F1*	Количество потомков с BC2F1**
Женское растение 1 x M1	1	2	9
Женское растение 1 x M14	2	0	--
Женское растение 1 x M14	3	1	0
Женское растение 1 x M14	4	0	--
Женское растение 1 x M14	5	0	--
Женское растение 1 x M14	6	0	--
Женское растение 1 x M14	7	10	2
Женское растение 1 x M14	8	0	--
Женское растение 1 x M14	9	1	0
Женское растение 1 x M14	10	0	--
Женское растение 1 x M14	11	1	0
Женское растение 1 x M14	12	1	0
Женское растение 1 x M14	13	2	12
Женское растение 1 x M14	14	0	--
Женское растение 1 x M14	15	1	0
Женское растение 1 x M14	16	0	--
Женское растение 1 x M14	17	0	--
Женское растение 1 x M14	18	0	--
Женское растение 1 x M14	19	6***	--
Женское растение 1 x M14	20	4	21
Женское растение 1 x M14	21	3	0
Женское растение 1 x M14	22	0	--
Женское растение 1 x M14	23	0	--
Женское растение 1 x M14	24	0	--
Женское растение 1 x M5/M14	25	0	--
Женское растение 1 x M5/M14	26	0	--

Женское растение 2 x M14	27	0	--
Женское растение 2 x M14	28	0	--

*Укорененные побеги в почве, если не указано иное.

**Зрелые семена.

***Мелкие зрелые семена; попыток проращивания не было.

5 Пример 5. Растения F1 по настоящему способу с повышенной устойчивостью к ржавчине сои

10 Растения F1, полученные посредством способа интрогрессии с применением тетраплоидной сои, оценивали в отношении устойчивости к ржавчине сои. Результаты для некоторых из данных растений показаны в таблице 5. Для оценки устойчивости каждого растения F1 и контрольной сои применяли три штамма ржавчины сои. "RB" обозначает "красновато-коричневые" очаги поражения, а число, связанное с аббревиатурой, обозначает значение, связанное с устойчивостью растения к штамму ржавчины. Чем ниже значение, тем более устойчивым к данному штамму оно является. "SP" обозначает "спорообразование". Например, "без sp" переводится как "нет спорообразования" на растении, тогда как "среднее sp" и "незначительное sp" переводится как субъективное наблюдение незначительного-среднего спорообразования возбудителя на растении. В нижней строке отображены данные по контрольной сое. В данном случае "ожог" обозначает реакцию восприимчивости с соответствующим числом, обозначающим уровень восприимчивости растения. Чем 15 выше значение, тем более восприимчиво растение, при этом 5 обозначает наиболее восприимчивое. По сравнению с контролем растения F1 проявляют повышенную устойчивость ко всем трем штаммам возбудителя ржавчины.

20

Таблица 5. Устойчивость к ржавчине сои у растений F1, полученных посредством способа тетраплоидной интрогрессии

ID растения	Штамм 1 ржавчины сои	Штамм 2 ржавчины сои	Штамм 3 ржавчины сои
F1 – 1	RB4, среднее sp	RB2, без sp	RB2, без sp
F1 – 2	RB4, незначительное sp	RB2, без sp	RB2, без sp
F1 – 3	RB4, незначительное sp	RB2, без sp	RB2, без sp
F1 – 4	RB4, незначительное sp	RB2, без sp	RB2, без sp
Соя (контроль)	Ожог5-sp	Ожог4-sp	Ожог4-sp

РВ = красновато-коричневые очаги поражений; sp = спороношение; № = шкала (1-5) устойчивости - восприимчивости, где более низкие значения обозначают более устойчивые, а более высокие значения обозначают более восприимчивые к возбудителю ржавчины.

5 Пример 6. Подтверждение истинных гибридов

Для проверки того, что скрещивания давали истинные гибриды, проводили анализы ТаqМаn.

Таблица 6. Данные по Таqмап для всех скрещиваний для подтверждения гибридов

Скрещивание	ID побега F1, количество	ТаqМа n 3289, уровень количества копий	ТаqМа n 3316, уровень количества копий	ТаqМа n 3434, уровень количества копий	ТаqМа n 3435, уровень количества копий	ТаqМа n 3537, уровень количества копий	ТаqМа n 3538, уровень количества копий
Женское растение 1	Контроль	0	0	0	0	0	0
Женское растение 1 x M1	1	1	1	1	1	0 или 1	1 или 2
Женское растение 1 x M14	2	2	1	1	1 или 2	1	1
Женское растение 1 x M14	3	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	4	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	5	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	6	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	7	2	1	1	1 или 2	1	1
Женское растение 1 x M14	8	2	1	1	1 или 2	1	1
Женское растение 1 x M14	9	2	1	1	1 или 2	1	1
Женское растение 1 x M14	10	2	1	1	1 или 2	1	1
Женское растение 1 x M14	11	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	12	2	1	1	1 или 2	1	1
Женское растение 1 x M14	13	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	14	2	1	0 или 1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	15	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	16	2	1	1	2	Н. д.	Н. д.
Женское растение 1 x M14	17	2	1	0 или 1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	18	2	1	0 или 1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	19	1 или 2	1	0 или 1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	20	2	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	21	2	1	1	2	Н. д.	Н. д.
Женское растение 1 x M14	22	1	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M14	23	2	1	1	2	Н. д.	Н. д.
Женское растение 1 x M14	24	1	1	1	1	1	1
Женское растение 1 x M5/M14	25	1	1	0 или 1	0 или 1	1	1
Женское растение 1 x	26	1	1	0 или 1	1	1	1

M5/M14							
Женское растение 2 x M14	27	2	1	0 или 1	1	1	1
Женское растение 2 x M14	28	2	1	0	1	1	1
Женское растение 1 x M4	29	2	1	1	1	1	0
Женское растение 1 x M15	30	0	1	1	0	1	0

Пример 7. Окрашивание и визуализация распространения хромосом в корнях

Для различения хромосом сои и хромосом дикорастущих растений *Glycine* применяли технологию флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Корневой материал на фиг. 2, 3 и 4 получен от растения F1 ($2n^D1n^W = 40 + 39$), полученного в результате скрещивания сои с удвоенным генотипом ($4n^D = 80$) x *G. tomentella*, ($2n^W = 78$). Центромеры сои идентифицировали как цитологические маркеры и использовали для FISH. Центромеры сои помечали с помощью красителя Alexa Fluor® 488 посредством ник-трансляции, в результате которой не происходит гибридизации с центромерами *G. tomentella*, лишь с центромерами сои. Хромосомы сои визуализировали с помощью контрастного окрашивания хромосом посредством DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола). С помощью FISH в растении F1 было произведено различие 40 хромосом сои от 39 хромосом *G. tomentella*.

Для FISH корневые материалы сначала блокировали в 0,05% 8-гидроксихинолине в течение 5 часов и фиксировали в 90% уксусной кислоте. Отрезали корневые кончики (область меристемы) и подвергали кратковременному расщеплению 0,5% пектолиазой и 1% целлюлазой для удаления клеточных стенок. Центромерные повторы у сои, CentGm-1 и CentGm-2, амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК сои в соответствии с описанным в литературе (см. Gill *et al.*, Plant Physiol. 2009 Vol 151, p1167-1174), а зонды для центромер метили флуоресцентным красителем посредством ник-трансляции. Хромосомы распределяли и гибридизировали с зондами для центромер сои, а хромосомы докрашивали посредством DAPI с последующим изучением и визуализацией под конфокальным микроскопом (Zeiss 710).

Пример 8. Повышение эффективности с помощью процедур по настоящему изобретению

Как видно из таблицы 7 и фигуры 1, методология по настоящему изобретению значительно усовершенствована по сравнению со стандартной процедурой интрогрессии. В таблице 7 отображены результаты скрещивания двух разных линий *Glycine* со стандартом, начиная с диплоидной сои, а также скрещивания линий *Glycine* с

тетраплоидной соей. Настоящий способ не только быстрее за счет исключения стадий, но и более эффективен, что дает увеличение эффективности в 280–647 раз.

Таблица 7. В данной таблице продемонстрировано повышение эффективности применения процедур по настоящему изобретению по сравнению со стандартными способами интрогрессии.

Линия Glycine	Путь	Количество событий опыления для F1D	Количество событий опыления для GGDE ¹	Общее количество событий опыления	Количество побегов GGDE	Среднее количество дней до появления побега GGDE ²	Кратность увеличения эффективности ³
M1	Стандарт	5957	1800	7757	7	461	Н. д.
M1	Тетраплоидная соя	0	32	32	3	74	647
M14	Стандарт	3150	примерно 100	примерно 3250	0	Н. д.	Н. д.
M14	Тетраплоидная соя	0	681	681	25	67	280

¹Генетика GGDE: получение В1 стандартным путем, получение F1 путем применения тетраплоидной сои.

²Количество дней от момента отдаленного скрещивания сои x *Glycine* до появления побега GGDE в почве.

³По сравнению со стандартом M1; учитывает общее количество опылений и время для получения побегов GGDE.

Пример 9. Селекция способом отдаленного скрещивания с *Brassica*

Удвоение хромосом у окультуренных видов Brassica

Способы, описанные выше для сои, можно применять к видам *Brassica*. Сначала, получают культивируемый вид *Brassica* с удвоенным геномом (например, *B. oleracea*) путем удвоения набора хромосом с применением средства, вызывающего удвоение набора хромосом (например, колхицина). Для этого обрабатывают незрелые зародыши в среде для культивирования тканей с помощью примерно 0,25–1,0 мг/мл колхицина в течение 3–4 дней при 25°C. Затем переносят регенерированные растения в почву и берут образцы листьев для анализа пloidности для подтверждения удвоения генома. Позволяют тетраплоидным растениям самовоспроизводиться и выполняют анализ пloidности эмбрионов для подтверждения удвоения генома.

Скрещивание культивируемого растения Brassica с удвоенным геномом с дикорастущим видом Brassica.

Затем скрещивают вид с удвоенным геномом с дикорастущим видом *Brassica* (например, *B. rapa*). При использовании тетраплоидной капусты в качестве женского родителя осторожно удаляют чашелистики и лепестки, чтобы обнажить зрелое рыльце, до цветения для подготовки цветочных почек *Brassica*. Осторожно удаляют пыльцу только что распусившихся цветков дикорастущего вида путем осторожного удаления лепестков для того, чтобы обнажить зрелые пыльники, и распыления пыльцы на рыльце *Brassica*. Если в качестве мужского родителя используют *Brassica* с удвоенным геномом, ранее описанный способ может быть обратным. Данное скрещивание приведет к получению F1 с генетикой BC1F1 стандартного способа интрогрессии.

10 *Применение ауксина*

Распыляют дикамбу, синтетический ауксиновый гербицид, на попытки опыления тетраплоидного растения с пылью дикорастущих растений *Brassica* для образования стручков и зародышей. Концентрация при применении дикамбы может варьироваться в диапазоне концентраций 3-20 мг/л. Для достижения хорошего насыщения опыленного гинецея и узла, к которому он прикреплен, применяют распылитель или пульверизатор. Можно оценить различные дни применения (например, 1–5 дней опрыскивания).

20 *Возвратное скрещивание*

После получения F1 путем скрещивания *Brassica* с удвоенным геномом с дикорастущей *Brassica* подвергают возвратному скрещиванию F1 с культивируемой *Brassica* с получением BC1F1. Осуществляют второе возвратное скрещивание с культивируемой *Brassica* с получением потомка с BC2F1. При способе по настоящему изобретению необходимо меньше стадий спасения зародыша для получения зрелого семени.

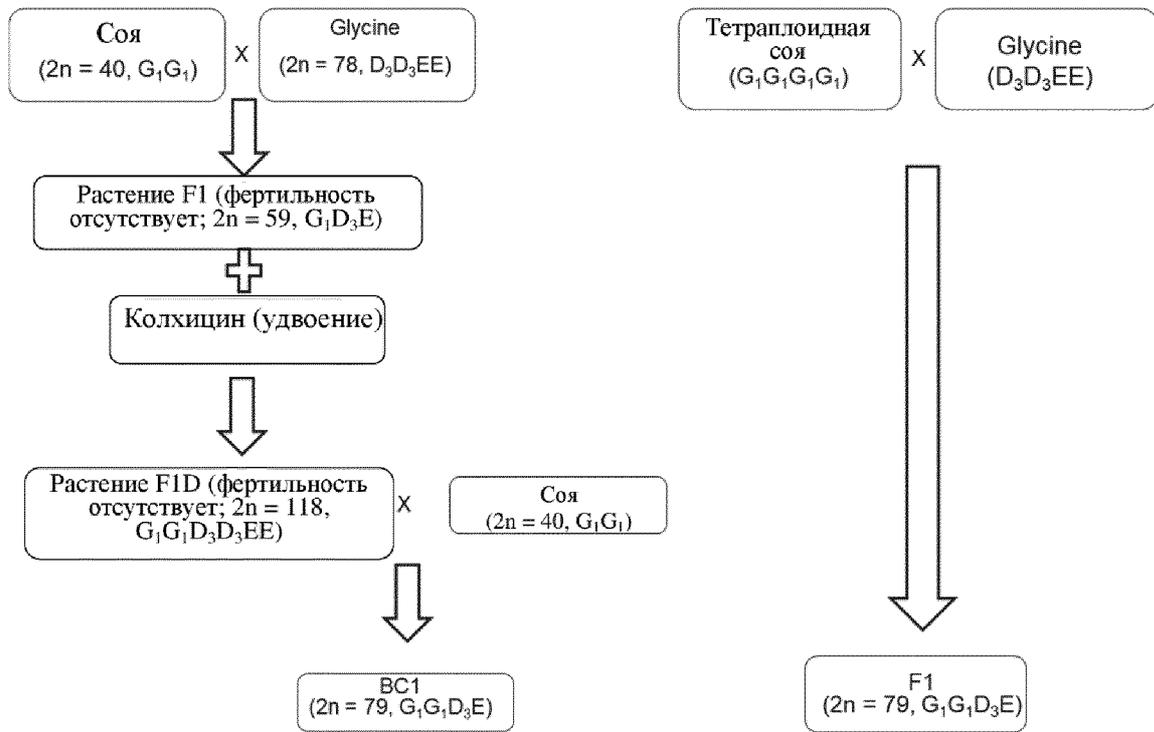
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от дикорастущего многолетнего вида *Glycine* и культивируемого однолетнего вида *Glycine*, при этом способ предусматривает
 - a. получение культивируемого однолетнего растения *Glycine* с удвоенным геномом, содержащего реципиентный геном культивируемого растения из $4n^D$ хромосом;
 - b. скрещивание растения сои с удвоенным геномом с растением дикорастущего многолетнего вида *Glycine*, содержащим $2n^W$ хромосом; и
 - c. применение ауксина;
 - d. получение от них по меньшей мере одного гибридного потомка;
 - e. где гибридный потомок содержит $2n^D$ хромосом культивируемого *Glycine* и $1n^W$ хромосом дикорастущего *Glycine*.
2. Способ по п. 1, дополнительно предусматривающий скрещивание по меньшей мере одного гибридного потомка с диплоидным растением сои с получением растения сои BC1F1.
3. Способ по п. 2, дополнительно предусматривающий скрещивание растения сои BC1F1 с растением дикорастущего *Glycine*.
4. Способ по п. 1, где по меньшей мере один гибридный потомок является фертильным.
5. Способ по п. 1, где растение сои с удвоенным геномом получают с помощью средства, препятствующего образованию микротрубочек, где средство выбрано из группы, состоящей из колхицина, трифлуралина и пронамида.
6. Способ по п. 1, где растение или клетка растения сои представляет собой растение или клетку растения *Glycine max*.
7. Способ по п. 6, где растение или клетка растения *Glycine max* имеет ploidy $2n^D$, где n^D означает количество различных хромосом культивируемого растения.

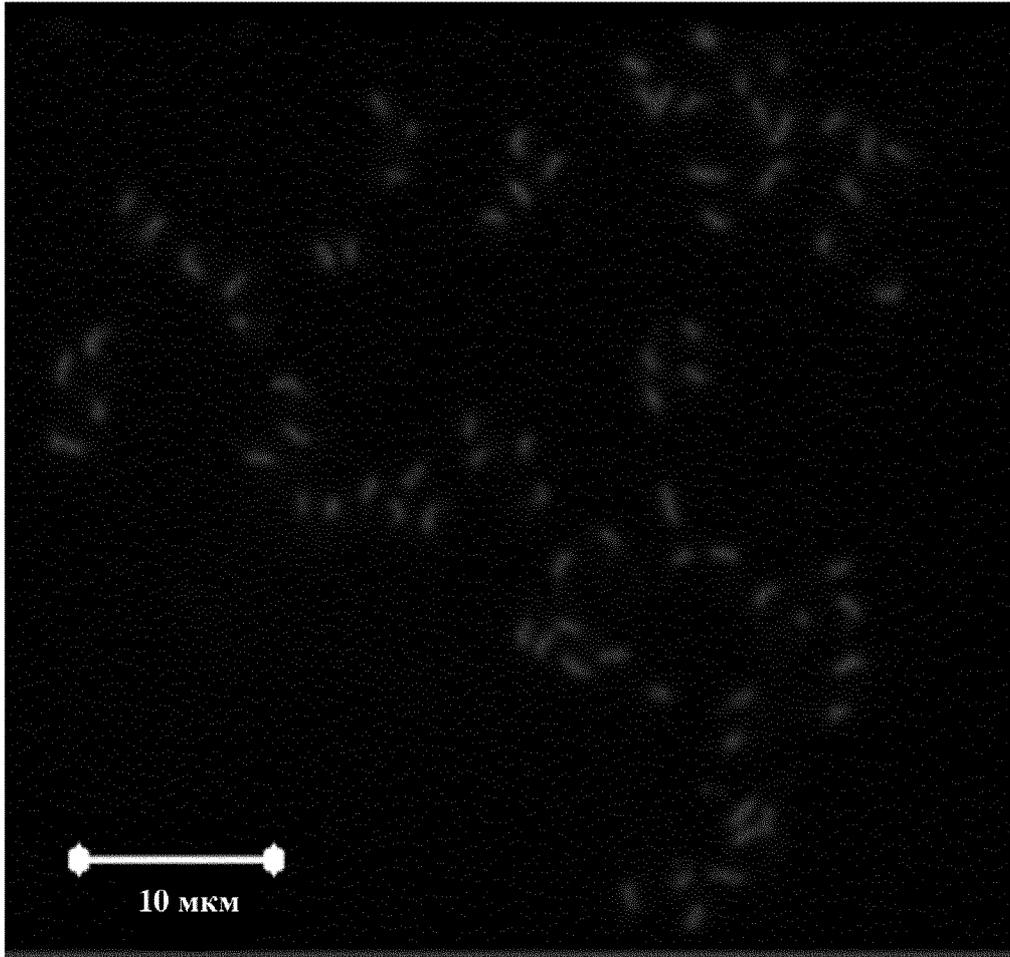
8. Способ по п. 7, где растение или клетка растения *Glycine max* имеет плоидность $2n^D$, где n означает 20 различных хромосом культивируемого растения.
9. Способ по п. 1, где растение сои с удвоенным геномом имеет плоидность $4n^D$, где n^D означает количество различных хромосом культивируемого растения.
10. Способ по п. 9, где растение сои с удвоенным геномом имеет плоидность $4n^D$, где n^D означает 20 различных хромосом культивируемого растения.
11. Способ по п. 9, где растение сои с удвоенным геномом имеет генотип GGGG.
12. Способ по п. 11, где растение сои с удвоенным геномом служит женским родительским растением.
13. Способ по п. 11, где растение сои с удвоенным геномом служит мужским родительским растением.
14. Способ по п. 1, где дикорастущий вид *Glycine* представляет собой *Glycine tomentella*.
15. Способ по п. 14, где *Glycine tomentella* имеет плоидность $2n^W$, где n^W означает количество различных хромосом дикорастущего многолетнего растения.
16. Способ по п. 15, где *Glycine tomentella* имеет плоидность $2n^W$, где n^W означает 39 различных хромосом дикорастущего многолетнего растения.
17. Способ по п. 16, где *Glycine tomentella* имеет генотип DDEE.
18. Способ по п. 17, где *Glycine tomentella* служит мужским родительским растением.
19. Способ по п. 17, где *Glycine tomentella* служит женским родительским растением.
20. Способ по п. 1, где по меньшей мере один гибридный потомок имеет генотип GGDE.
21. Способ по п. 1, где дикорастущий вид *Glycine* характеризуется требуемым признаком, аллелем или фенотипом.

22. Способ по п. 21, где требуемый признак, аллель или фенотип предусматривает устойчивость к азиатской ржавчине сои, цистообразующей нематоды сои, бактериальной пустуле, угольной гнили, корневой гнили, раку стебля или другому возбудителю заболевания сои.
23. Способ по п. 21, где требуемый признак, аллель или фенотип придает повышенную урожайность, повышенное содержание белка, повышенное содержание масла, повышенную засухоустойчивость или увеличенные периоды цветения.
24. Растение сои, характеризующееся признаком, аллелем или фенотипом по пп. 20-21, где указанный признак, аллель или фенотип интрогрессирован посредством способа по п. 1.
25. Гибридное растение, полученное посредством способа по п. 1, где гибридное растение имеет генотип GGDE.
26. Способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от дикорастущего вида растения и культивируемого вида растения, при этом способ предусматривает
- получение культивируемого растения с удвоенным геномом, содержащего реципиентный геном культивируемого растения из $4n^D$ хромосом;
 - скрещивание культивируемого растения с удвоенным геномом с растением дикорастущего вида, содержащим $2n^W$ хромосом; и
 - применение ауксина;
 - получение от них по меньшей мере одного гибридного потомка;
 - где гибридный потомок содержит $2n^D$ хромосом культивируемого растения и $1n^W$ хромосом дикорастущего растения.
27. Удвоенный реципиентный геном по п. 26, где реципиентный геном выбран из группы, состоящей из Glycine, Brassica, Cucurbits, Helianthus, Solanaceae и Petunia.
28. Способ по п. 26, дополнительно предусматривающий скрещивание по меньшей мере одного гибридного потомка с культивируемым видом растения с получением растения BC1F1.

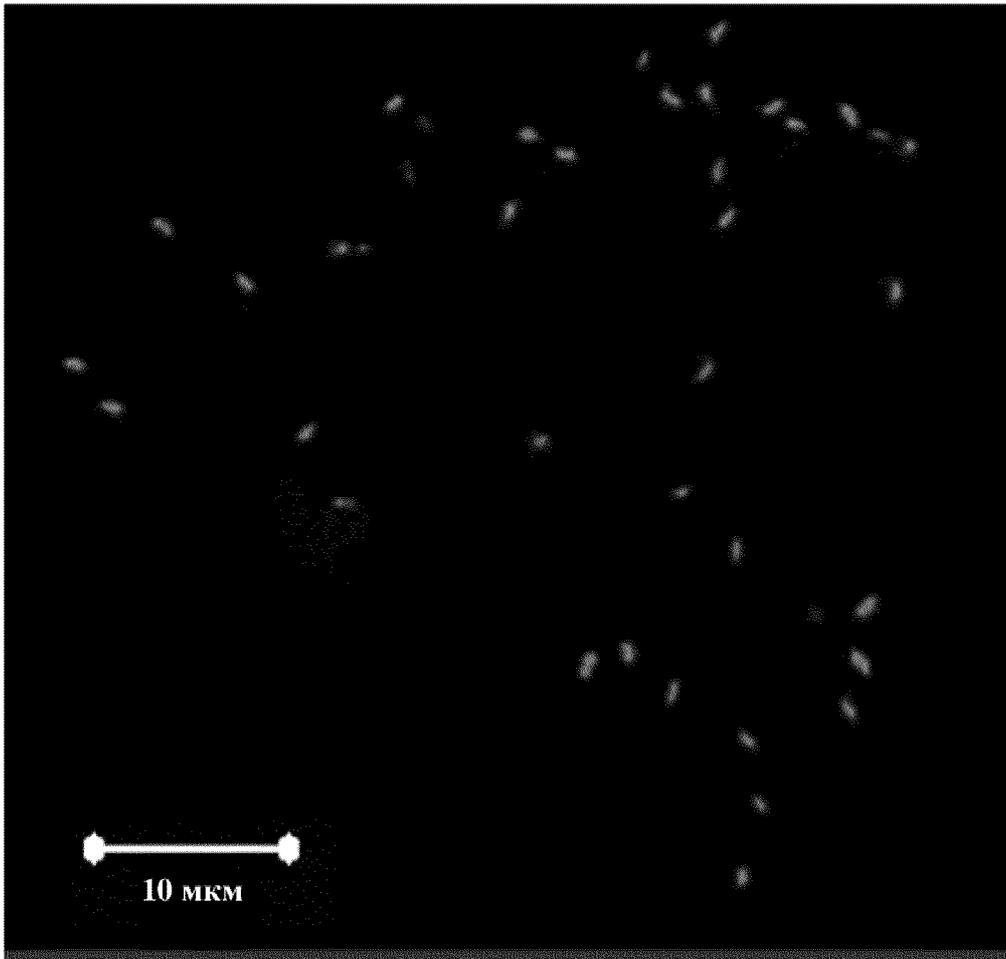
29. Способ по п. 28, дополнительно предусматривающий скрещивание растения BC1F1 с растением дикорастущего вида.
30. Способ по п. 26, где по меньшей мере один гибридный потомок является фертильным.
31. Способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от многолетнего вида и однолетнего вида, при этом способ предусматривает
- получение однолетнего растения с удвоенным геномом, содержащего реципиентный геном из $4n$ хромосом;
 - скрещивание однолетнего растения с удвоенным геномом с растением многолетнего вида, содержащим $2n$ хромосом; и
 - применение ауксина;
 - получение от них по меньшей мере одного гибридного потомка;
 - где гибридный потомок содержит $2n$ хромосом однолетнего растения и $1n$ хромосом многолетнего растения.
32. Способ получения по меньшей мере одного гибридного потомка от донорского вида растения и реципиентного вида растения, при этом способ предусматривает
- получение реципиентного растения с удвоенным геномом, содержащего геном из $4n$ хромосом;
 - скрещивание реципиентного растения с удвоенным геномом с растением донорского вида, содержащим $2n$ хромосом; и
 - применение ауксина;
 - получение от них по меньшей мере одного гибридного потомка;
 - где гибридный потомок содержит $2n$ хромосом реципиентного растения и $1n$ хромосом донорского растения.



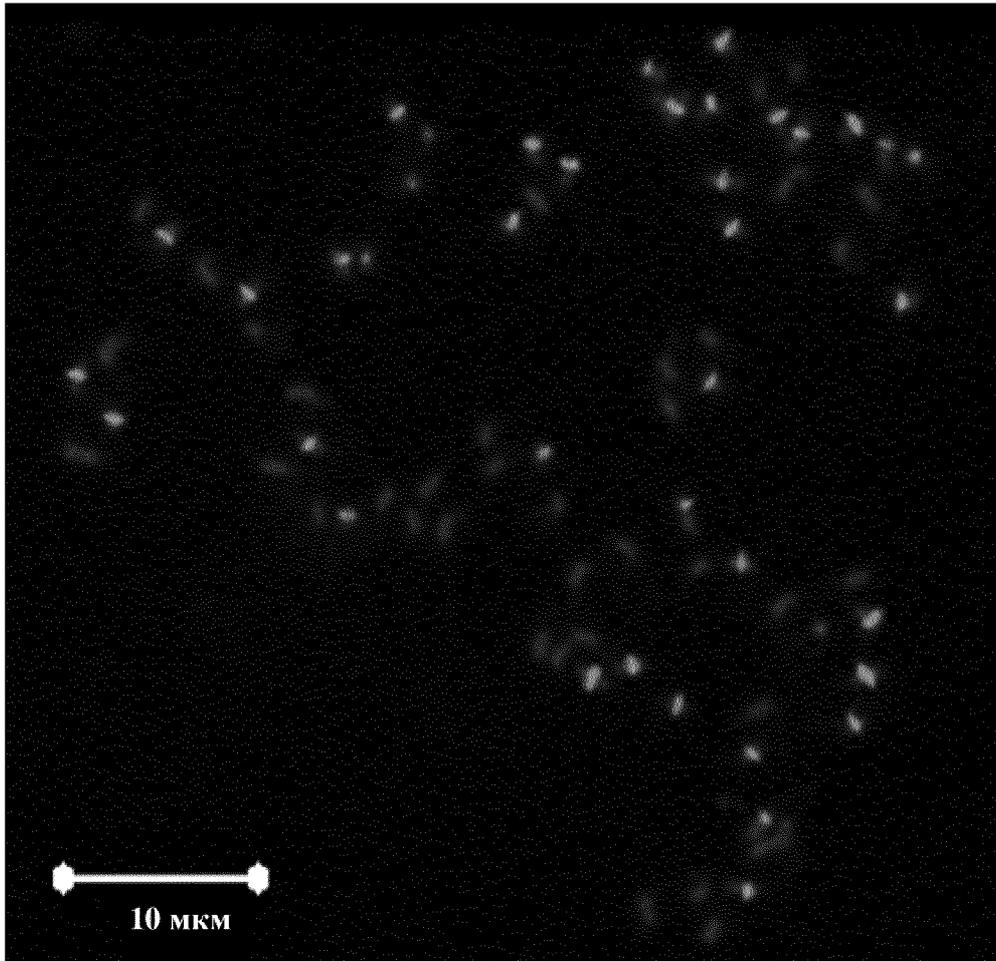
ФИГ. 1.



ФИГ. 2.



ФИГ. 3.



ФИГ. 4.