

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491146 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.02(51) Int. Cl. A01H 1/08 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
A01H 6/02 (2018.01)(22) Дата подачи заявки
2022.12.22(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ И УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ
С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР

(31) 63/292,564; 22172521.1

(32) 2021.12.22; 2022.05.10

(33) US; EP

(86) PCT/EP2022/087525

(87) WO 2023/118458 2023.06.29

(71) Заявитель:

КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА (DE)

(72) Изобретатель:

Спрингманн Клеменс (DE)

(74) Представитель:

Зуйков С.А. (RU)

(57) Изобретение относится к способу получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных эмбрионов, каллусов, семян и/или растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из культур изолированных микроспор, более конкретно, к способу, включающему контакт изолированных микроспор с ингибитором гистондеацетилаз (HDACi) и сложной белковой композицией. Настоящее изобретение также представляет набор для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из по меньшей мере одной изолированной микроспоры, а также представляет использование ингибитора гистондеацетилаз (HDACi) и сложной белковой композиции для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*). Наконец, настоящее изобретение также относится к популяции гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), полученных непосредственно из одного цветка, одного соцветия или одного бутона.

A1

202491146

202491146

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДНЫХ И УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных эмбрионов, каллусов, семян и/или растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из культур изолированных микроспор, особенно не зависящим от генотипа способом, более конкретно, настоящее изобретение относится к способу, включающему контакт изолированных микроспор с ингибитором гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композицией. Настоящее изобретение также предоставляет набор для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из, по меньшей мере одной изолированной микроспоры, а также представляет использование ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композиции для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*). Наконец, настоящее изобретение, также, относится к популяции гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), полученных непосредственно из одного цветка, одного соцветия или одного бутона.

Предпосылки создания изобретения

Подвиды свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) являются ценными овощными (столовая свёкла и мангольд), кормовыми (кормовая свёкла) и техническими (сахарная свёкла) культурами. В настоящее время основным направлением в селекции этих культур является создание гибридов F1, основанных на скрещивании двух гомозиготных родительских линий. При традиционной селекции, гомозиготность растений достигается после нескольких циклов инбридинга путем самоопыления с последующим отбором фенотипически однородных семей в течение минимум 4-6 поколений, что для двулетних культур занимает от 8 до 12 лет. Тем не менее, этот процесс не обеспечивает полной гомозиготности в случае аллогамных видов, таких как свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*).

Длительное развитие родительских линий за счет инбридинга является одним из ограничивающих факторов и основной проблемой при разведении конкурентоспособных гибридов F1. Технологии удвоенных гаплоидов (УГ) позволяют сэкономить время на

получение чистых селекционных линий, сократив этот период примерно до 3-5 лет (Жужжалова Т.П. и др. „Методы биотехнологии как потенциал развития селекции сахарной свеклы“. Вавиловский журнал генетики и селекции 24.1 (2020): 40.). Преимущества удвоенной гаплоидности заключаются в возможности получения полностью гомозиготных генотипов растений в одном поколении, а также в проявлении рецессивных аллелей у гаплоидных растений, обычно маскируемых гетерозиготным состоянием диплоидного растения, что облегчает идентификацию, оценку и отбор растений с признаками, имеющими агрономическое значение.

Гаплоидные растения могут возникать спонтанно или развиваться в результате апогамии и элиминации хромосом после межвидовой или межродовой гибридизации. Кроме того, гаплоидные растения могут быть получены после индукции гаметогенеза в культуре микроспор, пыльников, семязачатков или завязей.

Однако на сахарной свекле, даже на сегодняшний день, большинство этих методов не работают или являются неэффективными. Культура микроспор приводила к индукции только каллуса или проэмбриональных структур без дальнейшей регенерации, или соматических клонов (Григолава Т. Р. и др. „Методические подходы создания удвоенных гаплоидов сахарной и столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.)“. Вавиловский журнал генетики и селекции 25.3 (2021): 276). Каллус, корни или растения, полученные в культуре, были диплоидными, и их гаметофитное происхождение подтвердить не удалось. Ранние попытки получения гаплоидов сахарной свеклы в культуре пыльников не привели к получению андрогенных растений. В 2017 году Горецкой и др. удалось получить эмбрионы столовой свеклы в культуре микроспор и пыльников, однако полученные из них неукорененные розетки погибли (Gorecka, Krystyna, et al. „Development of embryoids by microspore and anther cultures of red beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*)“. Вавиловский журнал генетики и селекции 18.1 (2017): 185-195.).

До сих пор единственным способом успешного получения гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) считался исключительно гиногенез. Неоплодотворенные семязачатки вырезают из завязей мужских стерильных или фертильных растений-доноров и культивируют *in vitro*. Гиногенные зародыши, происходящие из яйцевой клетки, превращаются в побеги с гаплоидным хромосомным числом. Удвоение одного набора хромосом в гаплоидах происходит при обработке меристемы побега антимицотическими препаратами или при культивировании побегов на

средах, обогащенных такими препаратами. В результате образуются удвоенные гаплоидные (УГ) побеги, которые полностью гомозиготны.

Несмотря на то, что получение гаплоидных растений путем гиногенеза реализовано в программах селекции сахарной свеклы для создания удвоенных гаплоидных линий, гиногенез является весьма трудоемким и дорогостоящим процессом. Культуры микроспор для развития гаплоидов у *Beta spp.* в настоящее время недоступны.

Таким образом, по-прежнему существует острая потребность в повышении эффективности производства гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*).

Раскрытие изобретения

Как указано в разделе „Предпосылки создания изобретения“, в данной области существует большая потребность в выявлении технологий эффективного производства гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) и большая потребность в их использовании для разработки новых способов и новых наборов с целью получения таких растений. Настоящее изобретение удовлетворяет эту и другие потребности.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к способу получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*), включающего:

- i) предоставление по меньшей мере одной изолированной микроспоры свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*),
- ii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе i) в присутствии сложной белковой композиции и по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi),
- iii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе ii) с целью получения каллуса или эмбриона, и
- iv) необязательно, регенерацию и тем самым получение по меньшей мере одного растения из каллуса или зародыша, полученного на этапе iii), и предпочтительно, получение по меньшей мере одного гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного семени.

В одном из вариантов осуществления описанного выше способа этап i) включает одну или несколько из следующих стадий:

- (а) предоставление бутона или соцветия или их части, содержащих микроспоры на тетрадной и одноядерной стадии развития,
- (б) необязательно, дезинфекция бутона или соцветия, или их части (а),
- (в) перенос бутона, соцветия или их части, указанных в пунктах (а) или (б) на среду, содержащую макро- и микросоли, сахара и сложную белковую композицию,
- (г) гомогенизацию среды из пункта (в), содержащей бутон или соцветие или их часть, и получение таким образом клеточной суспензии,
- (д) необязательно, очистка клеточной суспензии предпочтительно с помощью сетчатого фильтра и/или центрифугирования,
- (е) получение суспензии микроспор с плотностью от 10 000 до 500 000 микроспор на 1 мл среды,
- (ж) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и
- (з) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M.

В дополнительном варианте осуществления описанного выше способа, этап i) включает все этапы (а)-(з).

В другом из вариантов осуществления способа согласно любому из выше описанных вариантов, этап ii) способа дополнительно включает один или несколько из следующих этапов:

- (и) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте,
- (к) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M, и

(л) удаление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) из культуры микроспор, полученной на стадии ii).

В одном из вариантов осуществления описанного выше способа, этап ii) включает все стадии (и)-(л). В другом из вариантов осуществления способа, согласно любому из выше описанных вариантов, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацедиалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

В другом из вариантов осуществления способа, согласно любому из выше описанных вариантов, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ, и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизированных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизированных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютина, протеолизата животных и растений и из их комбинации, предпочтительно степень гидролиза находится в диапазоне приблизительно от 20% до приблизительно 80%, предпочтительно, приблизительно от 30% до приблизительно 80%, более предпочтительно, приблизительно от 40% до приблизительно 60%.

В одном из вариантов осуществления способа, согласно любому из выше описанных вариантов, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) присутствует в концентрации приблизительно от 1 нМ до приблизительно 10 мМ, предпочтительно от 100 нМ до 10 мМ, более предпочтительно от 1 мМ до 10 мМ в культуральной среде, используемой на этапе ii), и/или сложная белковая композиция присутствует в концентрации приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 20000 мг/л, предпочтительно, приблизительно от 500 мг/л до приблизительно 15000 мг/л, более предпочтительно приблизительно от 2000 мг/л до приблизительно 10000 мг/л в культуральной среде, используемой на этапе ii).

В другом из вариантов осуществления способа, согласно любому из выше описанных вариантов, каллус или эмбрион контактируют с одним или несколькими регуляторами роста растений, выбранными из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей на этапе iv). Предпочтительно, на этапе iv), каллус или эмбрион контактируют по меньшей мере с гиббереллиновой кислотой, такой как GA3 и/или тидиазуром (TDZ), например, и с одним и с другим в концентрации примерно 1 мг/л.

В дополнительном варианте осуществления способа, согласно любому из выше описанных вариантов, один или несколько агентов удвоения хромосом, таких как колхицин, добавляют на этапе iii) и/или на этапе iv).

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к набору для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из по меньшей мере одной изолированной микроспоры, содержащему:

- (а) по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi), и
- (б) сложную белковую композицию,

где по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) и сложная белковая композиция содержатся в одном контейнере или в двух или более отдельных контейнерах.

В одном из вариантов реализации выше описанного набора, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SANA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких

как энтинолат (MS-275), тацединалин (CI994) и моцетинолат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроовая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидеписин (FK228).

В другом из вариантов реализации набора, в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ, и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютина, протеолизата животных и растений и из их комбинации, предпочтительно степень гидролиза находится в диапазоне от 20% до 80%, предпочтительно, от 30% до 80%, более предпочтительно, от 40% до 60%.

В другом из вариантов реализации набора, в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, набор дополнительно содержит один или несколько регуляторов роста растений, выбранных из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей, и/или набор дополнительно содержит один или несколько агентов удвоения хромосом, таких как колхицин.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию ингибитора гистондеацетилазы (HDACi), предпочтительно такого, как определено выше, и сложной белковой композиции, предпочтительно такой, как определено выше, или к использованию набора, определенного в любом из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса и/или растения или семени вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*),

предпочтительно способом, соответствующим любому из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к популяции гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), непосредственно из одного цветка, одного соцветия или одного бутона, предпочтительно полученных или получаемых способом согласно любому из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения.

В одном из вариантов реализации выше описанной популяции, популяция включает по меньшей мере 10 особей.

Определение терминов

Андрогенез определяется как процесс зарождения особи, генетический фон которой происходит исключительно от ядра мужского происхождения. То есть андрогенез – это зарождение растения исключительно из мужской, гаплоидной гаметы-предшественницы (гаметофита).

Гаплоидность – это признак, применимый к клеткам, растениям или частям растений, когда они, отдельно, содержат в своем ядре только один набор хромосом (n).

Диплоидность — признак, применимый к клеткам, или к растениям, или к частям растений, когда они, отдельно, содержат в своем ядре два набора хромосом ($2n$).

Удвоенный гаплоид - это характеристика, применимая к клеткам, растениям или частям растений, состоящим из этих клеток, хромосомный фонд которых был размножен искусственно, чаще всего путем химической обработки, например, колхицином, или был спонтанно удвоен. Такое удвоение хромосомного фонда позволяет получить клетку, растение или часть растения, имеющие две копии каждой хромосомы в ядре ($2n$), при этом указанные клетка, растение или часть растения полностью гомозиготны или, по существу, гомозиготны.

Полигаплоид - атрибут, применимый к клеткам, растениям или частям растений, состоящим из таких клеток, где изначально эти клетки были гаплоидными, а затем их хромосомный набор спонтанно утроился или увеличился. Т.е. полигаплоид это клетка, растение или часть растения, имеющая в своем ядре по меньшей мере три копии каждой

хромосомы ($3n$ или $4n$ и т.д.), при этом указанная клетка, растение или часть растения полностью гомозиготны или, по существу, гомозиготны.

В настоящем документе термин „микроспора“ используется для обозначения незрелого мужского гаметофита растения на всех стадиях его роста *in vitro*, включая его многоклеточную форму, полученную в результате спорофитного деления одноклеточной изолированной микроспоры и все еще заключенную в первоначальную стенку экзины (эта многоклеточная форма, в настоящем документе, также называется многоклеточной структурой). На стадии развития одноядерной микроспоры, ядро еще не разделено. Термин „тетрада“ относится к микроспорам, собранным в группу из четырех микроспор после того, как диплоидная клетка подвергается мейозу, образуя четыре гаплоидные микроспоры.

Растение вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) - это, в частности, растение подвида *Beta vulgaris subsp. vulgaris*. Например, к ним относятся *Beta vulgaris subsp. vulgaris var. altissima* (сахарная свёкла в более узком смысле), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. vulgaris* (подвид мангольд), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. conditiva* (свёкла/столовая свёкла), *Beta vulgaris ssp. vulgaris var. crassa/alba* (кормовая свёкла).

Сложная белковая композиция в контексте настоящего раскрытия относится к смеси белков, полученных из молока, мяса, рыбы, злаков или соевых бобов. Предпочтительно, сложная белковая композиция включает (или состоит из) по меньшей мере частично гидролизованные белки (частично гидролизованных белков). В частности, сложная белковая композиция может представлять собой протеолизат, т.е. белковую смесь, полученную путем ферментативного гидролиза, катализируемого протеазами. Степень гидролиза - это процент расщепленных пептидных связей по отношению к общему количеству связей, доступных для протеолитического гидролиза. Примеры сложных белковых композиций приведены в подробном описании настоящего изобретения.

Деацетилазы гистонов представляют собой ферменты, которые катализируют удаление ацетильной группы ϵ -N-ацетил-лизина гистонов, тем самым увеличивая сродство гистонов к ДНК. Таким образом, деацетилазы гистонов играют роль в регуляции экспрессии ДНК. Ингибиторы гистондеацетилаз (HDACi) ингибируют деацетилазы гистонов и, следовательно, предотвращают удаление ацетильных групп из гистонов. Ингибиторы гистондеацетилазы используются при лечении ряда заболеваний.

Бутон - это эмбриональный побег, возникающий в пазухе листа или на верхушке стебля. Бутон может быть предназначен для развития цветка или соцветия.

Макросоли могут быть выбраны из группы, состоящей из нитрата аммония (NH_4NO_3), хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), дигидроортофосфата калия (KH_2PO_4), гидроортофосфата калия (K_2HPO_4), нитрата калия (KNO_3), нитрата кальция ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$); микросоли могут быть выбраны из борной кислоты (H_3BO_3), хлорида кобальта ($\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), сульфата железа ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), сульфата марганца (II) ($\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$), йодида калия (KI), молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), сульфата цинка ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), железной соли трилона Б (FeNaEDTA), сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$).

Регуляторы роста растений - это химические соединения, которые влияют на рост и развитие растений, например, стимулируя или подавляя рост. Естественные регуляторы роста растений - это растительные гормоны, которые растения вырабатывают сами. Синтетические регуляторы роста растений, с другой стороны, не встречаются в растениях в естественном виде. Примеры регуляторов роста растений приведены в подробном описании настоящего изобретения.

У гаплоидных растений может происходить спонтанное удвоение хромосом или удвоение хромосом может быть усилено или облегчено с помощью агента удвоения хромосом, который, например, блокирует функцию волокон веретена во время мейоза или митоза. Наиболее часто используемым препаратом для удвоения хромосом является колхицин.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 (Фиг. 1.) демонстрирует развитие микроспор сахарной свеклы до каллусных структур (панель A1: симметричное деление ядра микроспоры; панель A2: стадия 4 ядер; панели A3-A6: многоядерные клетки и каллусные кластеры).

Фигура 2 (Фиг. 2) демонстрирует развитие микроспор сахарной свеклы в каллусные кластеры.

Фигура 3 (Фиг. 3) демонстрирует индукцию побегов из микроспор, полученных из каллуса сахарной свеклы.

Фигура 4 (Фиг. 4) демонстрирует сравнение потенциала индукции каллуса с применением вориностата (SAHA) и трихостатина А (TSA). DR = однозародышевый (monogerm) (см. примеры ниже). 1 SAHA = 1 μM ; 5 SAHA = 5 μM . Трихостатин А (TSA) в данном примере использовался в концентрации 5 μM .

Фигура 5 (Фиг. 5) демонстрирует сравнение потенциала индукции каллуса с применением трихостатина А (TSA) и ромидепсина, а также комбинированного эффекта двух ингибиторов гистондеацетилаз (HDACi). DR = однозародышевый (monogerm) (см. примеры ниже). Ромидепсин (отдельно или в комбинации с трихостатином А (TSA)) использовали в концентрации 2,5 μM . Трихостатин А (TSA) в данном примере использовался в концентрации 5 μM .

Фигура 6 (Фиг. 6) демонстрирует сравнение потенциала индукции каллуса с применением трихостатина А (TSA) и CPI-203, бромодоменного ингибитора таргетмола. CPI использовался в концентрациях 1 μM , 2,5 μM и 5 μM и оказывал очень незначительное, но положительное влияние на индукцию каллуса. Трихостатин А (TSA) снова использовали в качестве контроля для шести тестируемых генотипов. Трихостатин А (TSA) в данном примере использовался в концентрации 5 μM .

Фигура 7 (Фиг. 7) демонстрирует сравнение потенциала индукции каллуса с применением трихостатина А (TSA) и I-Bet 726, другого ингибитора бромодомена. I-Bet использовался в концентрациях 1 μM , 2,5 μM и 5 μM по сравнению с трихостатином А (TSA). Трихостатин А (TSA) в данном примере использовался в концентрации 5 μM .

Примечание относительно данных, представленных на фиг. 4 - фиг. 7:

Экспериментальная установка подробно описана в примерах ниже. На фигурах каждый столбец представляет собой отдельный генотип. В каждой строке показана отдельная обработка (агент указан слева перед каждой строкой). Временная точка, продолжительность и используемый буфер всегда были одинаковыми для всех обработок в разных рядах. Таким образом, разные ряды отличаются друг от друга только типом используемого ингибитора.

Все снимки были сделаны с помощью микроскопа ZEISS Stemi 2000-C при 10-кратном увеличении.

Подробное описание изобретения

Как указано в разделе „Предпосылки создания изобретения“, в данной области техники существует большая потребность в выявлении технологий эффективного производства гаплоидных и удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) и в их использовании для разработки новых способов и новых наборов с целью получения таких растений. Настоящее изобретение удовлетворяет эту и другие потребности. Варианты

осуществления настоящего изобретения, в целом, относятся к способам и наборам для получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью культур изолированных микроспор, особенно независимым от генотипа способом, и более конкретно, к способам и наборам для получения таких растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), включающим контакт изолированных микроспор с ингибитором гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композицией.

Чтобы облегчить понимание принципов и особенностей различных вариантов осуществления настоящего изобретения, ниже описаны различные иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения. Хотя примерные варианты осуществления настоящего изобретения описаны подробно, следует понимать, что возможны и другие варианты. Соответственно, не предполагается, что объем изобретения ограничен деталями конструкции и расположения компонентов, изложенными в следующем описании или примерах.

Изобретение может иметь другие варианты осуществления и может быть реализовано различными способами. Кроме того, при описании примерных вариантов осуществления настоящего изобретения, для большей ясности, будет использована специальная терминология.

Следует также отметить, что при использовании в настоящей спецификации и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа, предполагается и множественное число, если контекст явно не диктует иное. Например, указание на компонент подразумевает также композицию из множества компонентов. Ссылка на композицию, содержащую один компонент, подразумевает включение и других компонентов в дополнение к названному. Другими словами, термины, используемые в единственном числе, не означают ограничение количества, а скорее указывают на присутствие „по крайней мере одного“ названного элемента.

Используемый в настоящем документе, термин „и/или“ может означать „и“, может означать „или“, может означать „исключительно-или“, может означать „один“, может означать „некоторые, но не все“, может означать „ни один, ни другой“ и/или может означать „оба“. Термин „или“ означает инклюзивное „или“.

Кроме того, при описании примерных вариантов осуществления настоящего изобретения, для большей ясности используется определенная терминология. Предполагается, что

каждый используемый термин имеет самое широкое значение, понятное специалистам в данной области техники и включает все технические эквиваленты, которые работают аналогичным образом для достижения аналогичной цели. Следует понимать, что варианты раскрытой технологии можно практиковать без этих конкретизаций. В других случаях, известные методы, структуры и технологии не представлены подробно, чтобы не затруднять понимание данного описания. Ссылки на „один из вариантов осуществления“, „один вариант осуществления“, „пример осуществления“, „некоторые из вариантов осуществления“, „определенные варианты осуществления“, „различные варианты осуществления“ и т.д. указывают на то, что вариант осуществления (варианты осуществления) раскрытой технологии, описанный (описанные) таким образом, может (могут) включать конкретный признак, структуру или характеристику, но не каждый вариант осуществления обязательно включает такой конкретный признак, структуру или характеристику. Кроме того, повторное использование фразы „в одном из вариантов осуществления“ не обязательно, хотя и может, относится к одному и тому же варианту осуществления настоящего изобретения.

Используемый в настоящем документе термин „приблизительно“ следует понимать как относящийся к двум числам, указанным в качестве конечной точки (точек) любого диапазона. Любое указание на диапазон следует рассматривать как указание на любое подмножество в пределах этого диапазона. В настоящем документе диапазоны могут быть выражены следующим образом: „примерно“, или „приблизительно“, или „по существу“ от одного конкретного значения и/или до „примерно“, или „приблизительно“, или „по существу“ до другого конкретного значения. Когда указан такой диапазон, другие примеры вариантов осуществления настоящего изобретения включают от одного конкретно указанного значения и/или до другого конкретно указанного значения. Кроме того, термин „приблизительно“ означает и значения в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, который частично зависит от способа измерения или определения значения, т.е. от ограничений измерительной системы. Например, термин „приблизительно“ может означать и значения в пределах приемлемого стандартного отклонения, соответствующего практике в данной области техники. Альтернативно, термин „приблизительно“ может означать и диапазон до $\pm 20\%$, предпочтительно до $\pm 10\%$, более предпочтительно до $\pm 5\%$, и еще более предпочтительно до $\pm 1\%$ от заданного значения. Альтернативно, особенно в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать значения в пределах порядка величины, предпочтительно в 2-кратных пределах. Если в настоящей заявке и

формуле изобретения описаны конкретные значения, в случаях, когда не указано иное, термин „приблизительно“ подразумевается, и, в данном контексте означает величину в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения.

В данном раскрытии, различные аспекты изобретения могут быть выражены в формате диапазона. Следует понимать, что указание диапазона предназначено просто для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, следует считать, что указание на диапазон конкретно раскрывает все его возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах указанного диапазона. Например, указание на диапазон, такой как, например, от 1 до 6, следует рассматривать как указание, имеющее конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как, например, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т. д., а также отдельные числа в пределах этого диапазона, например, 1; 2; 2,7; 3; 4; 5; 5,3 и 6. Данное объяснение применимо независимо от ширины диапазона.

Аналогично, используемая в настоящем документе характеристика „по существу свободный“ от чего-либо или „по существу чистый“ и подобные характеристики могут подразумевать как „по меньшей мере, по существу, свободный“ от чего-либо или „по меньшей мере, по существу, чистый“, так и „полностью свободный“ от чего-либо или „полностью чистый“.

При использовании терминов „включающий“, „содержащий“ или „состоящий из“ подразумевается, что по меньшей мере названное соединение, элемент, частица или этап способа присутствует в композиции, изделии или способе, но при этом не исключается присутствие других соединений, материалов, частиц, этапов способа, даже в том случае, когда другие такие соединения, материалы, частицы, этапы способа имеют ту же функцию, что и названные.

В настоящем описании, для различных компонентов могут быть указаны конкретные значения или параметры, однако такие компоненты представлены в качестве примеров разных вариантов осуществления настоящего изобретения. На самом деле, эти примеры вариантов осуществления настоящего изобретения не ограничивают разные другие аспекты и концепции настоящего изобретения, поскольку могут быть применены многие другие сопоставимые параметры, размеры, диапазоны и/или значения. Термины „первый“, „второй“ и т.п., а также „первичный“, „вторичный“ и т.п. не обозначают какой-либо

порядок, количество или важность, а скорее используются для отличия одного элемента от другого.

Следует отметить, что такие термины, как „конкретно“, „предпочтительно“, „обычно“, „в целом“ и „часто“, не используются в данном документе для ограничения объема заявленного изобретения или для того, чтобы подчеркнуть, что определенные признаки являются критическими, существенными или даже важными для структуры или функции заявленного изобретения. Скорее, эти термины просто предназначены для выделения альтернативных или дополнительных признаков, которые могут или не могут быть использованы в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения. Также следует отметить, что такие термины, как „по существу“ („по сути“) и „примерно“, используются в настоящем документе для обозначения присущей степени неопределенности, которая может быть приписана любому количественному сравнению, значению, измерению или другому представленному фактору.

Размеры и величины, раскрытые в настоящем документе, не следует понимать как строго ограниченные точными числовыми значениями. Вместо этого, если не указано иное, каждый такой размер подразумевает как указанное значение, так и функционально эквивалентный диапазон, окружающий это значение. Например, размер, указанный как „50 мм“, означает „приблизительно 50 мм“.

Следует также понимать, что упоминание одного или нескольких этапов способа осуществления настоящего изобретения не исключает наличия дополнительных этапов или промежуточных этапов способа между явно указанными этапами. Аналогично, следует понимать, что упоминание одного или нескольких компонентов в композиции не исключает присутствия дополнительных компонентов, помимо явно указанных.

Материалы, далее описанные в настоящем документе как такие, которые составляют различные элементы настоящего изобретения, являются иллюстративными, а не ограничивающими. В объем настоящего изобретения должны быть включены многие подходящие материалы, которые выполняют ту же или аналогичную функцию, как и описанные здесь материалы. Такие другие материалы, не описанные в настоящем документе, могут включать, например, материалы, полученные после разработки изобретения, но не ограничиваются ими. Любые размеры, указанные на различных чертежах, приведены только для примера и не являются ограничивающими.

Предполагается, что в объем настоящего изобретения могут быть включены или могут быть предусмотрены и другие размеры и пропорции.

В соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы традиционные методы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, известные в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, среди других, труды Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (herein “Sambrook et al., 1989”); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985); *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Способы и наборы настоящего изобретения

В этом контексте, одной из целей настоящего изобретения является создание способа получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью или из культуры изолированных микроспор, особенно не зависящим от генотипа (т.е. независимым от генотипа) способом.

Другой целью изобретения является обеспечение каллусов; эмбрионов; выводковых почек и растений, регенерированных из эмбриона; потомства таких растений и семян таких растений, используемых в способе получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью культур изолированных микроспор или из культур изолированных микроспор, особенно не зависящим от генотипа способом.

Указанные цели достигаются настоящим изобретением, которое, в одном из аспектов, относится к способу получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*), включающему:

i) предоставление по меньшей мере одной изолированной микроспоры свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*),

- ii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе i) в присутствии сложной белковой композиции и по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi),
- iii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе ii) с целью получения каллуса или эмбриона, и
- iv) необязательно, регенерацию и тем самым получение по меньшей мере одного растения из каллуса или зародыша, полученного на этапе iii), и предпочтительно, получение по меньшей мере одного гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного семени.

Преимущество способа согласно настоящему изобретению заключается в том, что из одного цветка, соцветия или бутона можно получить сотни гаплоидных или удвоенных гаплоидных растений, в то время как при использовании культуры семязачатков из одного цветка, соцветия или бутона можно получить максимум четыре растения. Еще одним преимуществом является то, что гаплоидные растения, полученные с помощью культуры микроспор, имеют гораздо более высокую эффективность спонтанного удвоения, чем растения, полученные с помощью культуры семязачатков. Растения, полученные из культуры семязачатков, демонстрируют спонтанное удвоение хромосом не более чем на 5%, в то время как растения, полученные из культуры микроспор, часто демонстрируют спонтанное удвоение хромосом более чем на 50%. Как таковые, способы настоящего изобретения не являются по существу биологическими способами получения растений ввиду использования культуры микроспор в присутствии ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и последующей стадии образования каллуса для регенерации по меньшей мере одного гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного каллуса, клетки, растения или семени. Таким образом, большая часть растений, полученных способом согласно изобретению, может быть непосредственно использована для селекции, без необходимости применения агентов удвоения хромосом.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе iv) регенерируется популяция растений, в которой происходит спонтанное удвоение хромосом по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60% или по меньшей мере на 70%. В данном контексте популяция включает в себя по меньшей мере 10 особей.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, перед регенерацией, на этапе iv), структура каллуса или эмбриона может быть разрушена путем приложения физической силы, например, каллус или эмбрион может быть разделен на части, может быть раздавлен или размят.

В одном из вариантов осуществления описанного выше способа этап i) включает одну или несколько из следующих стадий:

- (а) предоставление бутона или соцветия или их части, содержащих микроспоры на тетрадной и одноядерной стадии развития,
- (б) необязательно, дезинфекция бутона или соцветия, или их части (а),
- (в) перенос бутона, соцветия или их части, указанных в пунктах (а) или (б) на среду, содержащую макро- и микросоли, сахара и сложную белковую композицию,
- (г) гомогенизацию среды из пункта (в), содержащей бутон или соцветие или их часть, и получение таким образом клеточной суспензии,
- (д) необязательно, очистка клеточной суспензии предпочтительно с помощью сетчатого фильтра и/или центрифугирования,
- (е) получение суспензии микроспор с плотностью от 10 000 до 500 000 микроспор на 1 мл среды,
- (ж) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и
- (з) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе (а) бутон, соцветие или их часть удаляют с растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*); соцветие может быть удалено до раскрытия цветка. Часть соцветия может быть верхушкой стебля соцветия. Удаленные бутон, соцветие или их часть можно хранить при комнатной температуре или в режиме охлаждения, при температуре, например, от 2 до 10 °C или от 4 до 8 °C.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе (в), сахарид представляет собой моносахарид, например, глюкоза моногидрат. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, среда, указанная в пункте (в) может дополнительно включать одну или несколько аминокислот, таких как глутамин, и/или нуклеозид, такой как уридин и цитидин. Каждый из этих дополнительных компонентов может присутствовать в концентрации от 20 до 750 мг/л.

В дополнительном варианте осуществления описанного выше способа, этап и) включает все этапы (а)-(з).

В предпочтительном варианте реализации описанного выше способа, клеточная суспензия очищается с помощью сетчатого фильтра на этапе (д) путем последующего пропускания суспензии через сетчатый фильтр с размером отверстий в диапазоне примерно от 50 до 100 μm и через сетчатый фильтр с размером отверстий в диапазоне примерно от 25 до 50 μm . Предпочтительно, очищение с помощью каждого из сетчатых фильтров с различными размерами отверстий осуществляется по меньшей мере 1-3 раза, или точно 1-3 раза. Альтернативно, клеточная суспензия может быть очищена с помощью сетчатого фильтра на этапе (Д) путем пропускания через клеточный сетчатый фильтр с размером отверстий в диапазоне примерно от 25 до 100 μm многократно, предпочтительно по меньшей мере от 1 до 6 раз, или точно от 1 до 6 раз.

В одном из вариантов осуществления способа согласно любому из выше описанных вариантов осуществления, этап ii) способа дополнительно включает один или несколько из следующих этапов:

(и) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и

(к) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μM , предпочтительно от 100 nM до 10 μM , более предпочтительно от 1 μM до 10 μM , и

(л) удаление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) из культуры микроспор, полученной на стадии ii).

В одном из вариантов осуществления описанного выше способа, этап ii) включает все стадии (и)-(л).

Удаление ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до культивирования, с целью получения каллуса, приводит к особенно эффективному образованию каллуса. Удаление ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) может осуществляться путем центрифугирования, промывки микроспор, обработанных ингибитором гистондеацетилазы (HDACi), или замены среды культивирования на ту же среду без ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) или другую среду без ингибитора гистондеацетилазы (HDACi), или любой комбинацией этих шагов. Такие шаги по удалению ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) могут быть применены один раз, два раза подряд или несколько раз, до и/или во время индукции каллуса.

В любом из вариантов осуществления выше описанного способа, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SANA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацединалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

Специалистам известен целый ряд различных ингибиторов гистондеацетилазы HDACis. Хорошие результаты, в частности, дает трихостатин А (TSA).

Сложная белковая композиция может быть получена из любого источника белка, например, из молока, мяса, рыбы, злаков или других растений. В частности, хорошие результаты дает белковая композиция, полученная из молока и подвергнутая по меньшей мере частичному гидролизу.

В любом из вариантов осуществления выше описанного способа, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, в любом из вариантов осуществления выше описанного способа, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных

изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, в любом из вариантов осуществления выше описанного способа, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютина, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

Дополнительно предпочтительно, чтобы в сложной белковой композиции степень гидролиза находилась в диапазоне приблизительно от 20% до приблизительно 80%, более предпочтительно приблизительно от 30% до приблизительно 80%, особенно предпочтительно приблизительно от 40% до приблизительно 60%.

В одном из вариантов осуществления способа, согласно любому из выше описанных вариантов, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) присутствует в концентрации приблизительно от 1 nM до приблизительно 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M в культуральной среде, используемой на этапе ii).

В другом из вариантов осуществления способа, согласно любому из выше описанных вариантов, сложная белковая композиция присутствует в концентрации приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 20000 мг/л, предпочтительно, приблизительно от 500 мг/л до приблизительно 15000 мг/л, более предпочтительно приблизительно от 2000 мг/л до приблизительно 10000 мг/л в культуральной среде, используемой на этапе ii).

Регенерация растения на этапе iv) может включать использование одного или нескольких регуляторов роста растений.

В одном из вариантов осуществления способа согласно любому из выше описанных вариантов, каллус или эмбрион на этапе iv) контактируют с одним или несколькими регуляторами роста растений, выбранными из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

В растениях, полученных в соответствии с настоящим изобретением, удвоение хромосом может происходить либо спонтанно, либо его можно стимулировать, облегчать или усиливать с помощью агента удвоения хромосом.

В одном из вариантов осуществления способа согласно любому из выше описанных вариантов, один или несколько агентов, удваивающих хромосомы, добавляются на этапе iii) и/или на этапе iv). В частности, колхицин может быть добавлен на этапе iii) и/или на этапе iv).

Настоящее изобретение также относится к способу подготовки микроспор растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) для получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений, включающему этапы:

- (А) предоставление бутона или соцветия или их части, содержащих микроспоры на тетрадной и однадерной стадии развития,
- (Б) необязательно, дезинфекция бутона или соцветия, или их части (а),
- (В) перенос бутона, соцветия или их части, указанных в пунктах (а) или (б) на среду, содержащую макро- и микросоли, сахара и сложную белковую композицию,
- (Г) гомогенизацию среды из пункта (в), содержащей бутон или соцветие или их часть, и получение таким образом клеточной суспензии,
- (Д) необязательно, очистка клеточной суспензии предпочтительно с помощью сетчатого фильтра и/или центрифугирования,
- (Е) получение суспензии микроспор с плотностью от 10 до 1000k микроспор на 1 мл среды, предпочтительно приблизительно от 10 000 до 500 000 микроспор на 1 мл среды,
- (Ж) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и
- (З) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M,
- (И) необязательно, удаление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) из культуры микроспор.

В предпочтительном варианте осуществления способа подготовки микроспор, на этапе (А) бутон, соцветие или их часть удаляют с растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*); соцветие может быть удалено до раскрытия цветка. Часть соцветия может быть верхушкой стебля соцветия. Удаленные бутон, соцветие или их часть можно хранить при комнатной температуре или в режиме охлаждения, при температуре, например, от 2 до 10 °С или от 4 до 8 °С.

В предпочтительном варианте осуществления способу подготовки микроспор, на этапе (в), сахарид представляет собой моносахарид, например, глюкоза моногидрат. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, среда, указанная в пункте (в) может дополнительно включать одну или несколько аминокислот, таких как глутамин, и/или нуклеозид, такой как уридин и цитидин. Каждый из этих дополнительных компонентов может присутствовать в концентрации от 20 до 750 мг/л.

В предпочтительном варианте осуществления описанного выше способа, клеточная суспензия очищается с помощью сетчатого фильтра на этапе (Д) путем последующего пропускания суспензии через сетчатый фильтр с размером отверстий в диапазоне примерно от 50 μm до 100 μm и через сетчатый фильтр с размером отверстий в диапазоне примерно от 25 μm до 50 μm . Предпочтительно, очищение с помощью каждого из сетчатых фильтров с различными размерами отверстий осуществляется по меньшей мере 1-3 раза, или точно 1-3 раза. Альтернативно, клеточная суспензия может быть очищена с помощью сетчатого фильтра на этапе (Д) путем пропускания через клеточный сетчатый фильтр с размером отверстий в диапазоне примерно от 25 μm до 100 μm многократно, предпочтительно по меньшей мере от 1 до 6 раз, или точно от 1 до 6 раз.

В одном из вариантов осуществления способа подготовки микроспор в соответствии с любым из описанных выше вариантов, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацедиалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

В другом из вариантов осуществления способа подготовки микроспор в соответствии с любым из описанных выше вариантов, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютена, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

Дополнительно, предпочтительно чтобы степень гидролиза сложной белковой композиции находилась в диапазоне приблизительно от 20% до приблизительно 80%, предпочтительно, приблизительно от 30% до приблизительно 80%, более предпочтительно, приблизительно от 40% до приблизительно 60%.

В одном из вариантов осуществления способа подготовки микроспор в соответствии с любым из описанных выше вариантов, сложная белковая композиция присутствует в концентрации приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 20000 мг/л, предпочтительно, приблизительно от 500 мг/л до приблизительно 15000 мг/л, более предпочтительно приблизительно от 2000 мг/л до приблизительно 10000 мг/л в культуральной среде, используемой на этапе в).

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к набору для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из по меньшей мере одной изолированной микроспоры, содержащему:

- (а) по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi), и
- (б) сложную белковую композицию,

где по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) и сложная белковая композиция содержатся в одном контейнере или в двух или более отдельных контейнерах.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, набор включает первую композицию, содержащую ингибитор гистондеацетилазы (HDACi), и вторую композицию, содержащую сложную белковую композицию. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, первая и вторая композиции представляют собой среду для культуры растительных клеток. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, первая композиция находится в первом контейнере, а вторая композиция - во втором контейнере. В другом из вариантов осуществления настоящего изобретения, набор включает композицию, состоящую из ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композиции. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, композиция представляет собой среду для культуры растительных клеток. Набор может включать набор инструкций по применению ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и/или сложной белковой композиции. Или ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) или сложная белковая композиция, или и одно и другое могут быть в концентрированной форме, и требовать разбавления перед использованием.

В одном из вариантов реализации набора, согласно любому из описанных выше вариантов реализации, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как воринокат (SANA), белинокат (PXD101), дацинокат (LAQ824) и панобинокат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтинокат (MS-275), тацедиалин (CI994) и моцетинокат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

В другом из вариантов реализации набора, согласно любому из описанных выше вариантов реализации, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как

мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизovaných изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизovaných изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютена, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

В одном из вариантов реализации набора, степень гидролиза находится в диапазоне от 20% до 80%, предпочтительно от 30% до 80%, особенно предпочтительно от 40% до 60%.

В другом из вариантов реализации набора согласно любому из описанных выше вариантов реализации, набор дополнительно включает один или несколько регуляторов роста растений, выбранных из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

Один или несколько регуляторов роста растений могут находиться в том же контейнере, что и ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) или сложная белковая композиция, или в отдельном контейнере.

В другом из вариантов реализации набора, набор дополнительно включает один или несколько агентов, удваивающих хромосомы, например, колхицин.

Настоящее изобретение, также, относится к использованию способа или набора согласно настоящему изобретению для получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) путем андрогенеза из изолированных микроспор.

Настоящее изобретение, также, относится к использованию ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) или сложной белковой композиции для получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных эмбрионов и/или растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) путем андрогенеза из изолированных микроспор.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к использованию ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композиции или к использованию набора, определенного в любом из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса и/или растения или семени вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*).

Предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) и сложная белковая композиция или набор используются в способе, соответствующем любому из выше описанных вариантов осуществления изобретения.

В одном из выше описанных вариантов использования, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацединалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

В другом из вариантов использования ингибитора согласно любому из выше описанных вариантов, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного

казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютена, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

В предпочтительном варианте использования, описанном выше, степень гидролиза сложной белковой композиции находится в диапазоне от 20% до 80%, предпочтительно от 30% до 80%, особенно предпочтительно от 40% до 60%.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к популяции гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), непосредственно из одного цветка, одного соцветия или одного бутона, предпочтительно полученных или получаемых способом согласно любому из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения. Гаплоидные, полигаплоидные и/или удвоенные гаплоидные растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) или их популяция, таким образом, получены искусственным путем извлечения микроспоры и ее культивирования *ex vivo*, т.е. вне растительной среды, и обработаны по меньшей мере одним соединением ингибитора гистондеацетилазы (HDACi). Таким образом, все гаплоидные, полигаплоидные и/или удвоенные гаплоидные растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) или их популяции, полученные способами, раскрытыми в настоящем документе, представляют собой клетки или растения, которые получены не только с помощью биологического процесса, поскольку процесс генерации по своей сути включает несколько этапов вмешательства человека, не встречающихся в природе, в виде изоляции микроспоры и химической обработки.

Преимущественно, способ настоящего изобретения позволяет получить большое количество гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) из одного цветка, одного соцветия или одного бутона, в то время как при использовании методов культивирования семязачатков из одного цветка, одного соцветия или одного бутона можно получить максимум четыре растения.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанная выше популяция включает в себя не менее 10 особей, предпочтительно не менее 50 особей, более предпочтительно не менее 100 особей.

Еще одним преимуществом настоящего изобретения является то, что растения, полученные способом согласно изобретению, демонстрируют спонтанное удвоение хромосом более чем на 50%, в то время как растения, полученные с помощью культуры семязачатков, демонстрируют спонтанное удвоение хромосом не более чем на 5%. Таким образом, значительная часть полученных растений может быть непосредственно использована для селекционных целей, без необходимости применения агентов для удвоения хромосом.

В другом из вариантов получения популяции в соответствии с любым из описанных выше вариантов, популяция включает в себя по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% удвоенных гаплоидных растений.

Настоящее изобретение также относится к использованию ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композиции или к использованию набора, определенного в любом из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, для увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом в популяции растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), полученных из одного цветка, одного соцветия или одного бутона и полученных с помощью культуры микроспор.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного использования, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) и сложная белковая композиция или набор, определенные в любом из выше описанных вариантов осуществления, используются в способе получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*), который соответствует любому из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения.

В одном из вариантов осуществления использования, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацедиалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота,

предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидеписин (FK228).

В другом из вариантов осуществления использования, в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютина, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

В предпочтительном варианте использования, описанном выше, степень гидролиза сложной белковой композиции находится в диапазоне от 20% до 80%, предпочтительно от 30% до 80%, особенно предпочтительно от 40% до 60%.

Настоящее изобретение, также, относится к способу увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом в популяции растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), полученных из одного цветка, одного соцветия или одного бутона, включающему:

- i) получение по меньшей мере одной изолированной микроспоры из по меньшей мере одного цветка, одного соцветия или одного бутона свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*),

- ii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе i) в присутствии сложной белковой композиции и по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi),
- iii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе ii) с целью получения каллуса или эмбриона, и
- iv) регенерация и, таким образом, получение популяции растений из каллуса или эмбриона на этапе iii).

Предпочтительно, на этапе i) чтобы плотность микроспор, полученных из по меньшей мере одного цветка, одного соцветия или одного бутона свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) составляла по меньшей мере 10 000 микроспор на мл, предпочтительно по меньшей мере 25 000 микроспор на мл или по меньшей мере 50 000 микроспор на мл, более предпочтительно по меньшей мере 100 000 микроспор на мл, наиболее предпочтительно по меньшей мере 200 000 микроспор на мл.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, перед регенерацией, на этапе iv) структура каллуса или эмбриона может быть разрушена путем приложения физической силы, например, каллус или эмбрион может быть разделен на части, может быть раздавлен или размят.

Предпочтительно, популяция растений, регенерированных на этапе iv) включает в себя не менее 10 особей, предпочтительно не менее 50 особей, более предпочтительно не менее 100 особей.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, популяция, регенерированная на этапе iv), подвергается спонтанному удвоению хромосом не менее чем на 40%, не менее чем на 50%, не менее чем на 60% или не менее чем на 70%

В одном из вариантов осуществления способа увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, этап i) включает в себя следующие шаги:

- (a) предоставление бутона или соцветия или их части, содержащих микроспоры на тетрадной и одноядерной стадии развития,
- (б) необязательно, дезинфекция бутона или соцветия, или их части (a),

- (в) перенос бутона, соцветия или их части, указанных в пунктах (а) или (б) на среду, содержащую макро- и микросоли, сахараиды и сложную белковую композицию,
- (г) гомогенизацию среды из пункта (в), содержащей бутон или соцветие или их часть, и получение таким образом клеточной суспензии,
- (д) необязательно, очистка клеточной суспензии предпочтительно с помощью сетчатого фильтра и/или центрифугирования,
- (е) получение суспензии микроспор с плотностью от 10 000 до 500 000 микроспор на 1 мл среды,
- (ж) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и
- (з) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе (а) бутон, соцветие или их часть удаляют с растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*); соцветие может быть удалено до раскрытия цветка. Часть соцветия может быть верхушкой стебля соцветия. Удаленные бутон, соцветие или их часть можно хранить при комнатной температуре или в режиме охлаждения, при температуре, например, от 2 до 10 °C или от 4 до 8 °C.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе (в), сахарид представляет собой моносахарид, например, глюкоза моногидрат. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, среда, указанная в пункте (в) может дополнительно включать одну или несколько аминокислот, таких как глутамин, и/или нуклеозид, такой как уридин и цитидин. Каждый из этих дополнительных компонентов может присутствовать в концентрации от 20 до 750 мг/л.

В другом из вариантов осуществления способа увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и

депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацедиалин (CI994) и моцетинонат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроовая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

В еще одном из вариантов осуществления способа увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютена, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, степень гидролиза сложной белковой композиции находится в диапазоне приблизительно от 20% до приблизительно 80%, предпочтительно, приблизительно от 30% до приблизительно 80%, более предпочтительно, приблизительно от 40% до приблизительно 60%.

В другом из вариантов осуществления способа увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) присутствует в концентрации приблизительно от 1 нМ до приблизительно 10 мМ,

предпочтительно от 100 нМ до 10 мМ, более предпочтительно от 1 мМ до 10 мМ в культуральной среде, используемой на этапе ii).

В другом из вариантов осуществления способа увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом, в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция присутствует в концентрации приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 20000 мг/л, предпочтительно, приблизительно от 500 мг/л до приблизительно 15000 мг/л, более предпочтительно приблизительно от 2000 мг/л до приблизительно 10000 мг/л в культуральной среде, используемой на этапе ii).

В одном из вариантов осуществления способа для увеличения скорости спонтанного удвоения хромосом в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления изобретения, каллус или эмбрион на этапе iv) контактируют с одним или несколькими регуляторами роста растений, выбранными из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

Удвоенные гаплоидные растения, полученные выше описанными способами фертильны и могут быть непосредственно использованы для дальнейшего скрещивания с другими растениями в качестве материнского или отцовского партнера при скрещивании, предпочтительно для создания удвоенной гаплоидной (DH) линии/удвоенной гаплоидной (DH) популяции или для гибридного скрещивания.

Таким образом, настоящее изобретение также предоставляет способ получения гибридного растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), включающий скрещивание удвоенного гаплоидного растения, полученного или получаемого с помощью культуры микроспор с другим растением того же вида с другим генотипом, и, необязательно, получение, идентификацию или отбор семян, выращенных при скрещивании с материнским родителем или получение, идентификацию или отбор растений-потомков от указанного скрещивания.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к способу получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), включающему этапы:

а) получение удвоенного гаплоидного растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью культуры микроспор,

б) размножение удвоенного гаплоидного растения, полученного на этапе а), путем самоопыления, и

в) получение потомства семян или растений.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), этап а) включает в себя следующие шаги:

i) предоставление по меньшей мере одной изолированной микроспоры свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*),

ii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе i) в присутствии сложной белковой композиции и по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi),

iii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе ii) с целью получения каллуса или эмбриона, и

iv) регенерацию и тем самым получение по меньшей мере одного растения из каллуса или зародыша, полученного на этапе iii).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, перед регенерацией, на этапе iv), структура каллуса или эмбриона может быть разрушена путем приложения физической силы, например, каллус или эмбрион может быть разделен на части, может быть раздавлен или размят.

В одном из вариантов осуществления описанного выше способа, этап i) включает одну или несколько из следующих стадий:

(а) предоставление бутона или соцветия, или их части, содержащей микроспоры на тетрадной и одноядерной стадии развития,

(б) необязательно, дезинфекция бутона или соцветия, или их части (а),

(в) перенос бутона, соцветия или их части, указанных в пунктах (а) или (б) на среду, содержащую макро- и микросоли, сахара и сложную белковую композицию,

(г) гомогенизацию среды из пункта (в), содержащей бутон или соцветие, или их часть, и получение таким образом клеточной суспензии,

- (д) необязательно, очистка клеточной суспензии предпочтительно с помощью сетчатого фильтра и/или центрифугирования,
- (е) получение суспензии микроспор с плотностью от 10 000 до 500 000 микроспор на 1 мл среды,
- (ж) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и
- (з) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M.

В предпочтительном варианте осуществления описанного выше способа, на этапе (а) бутон, соцветие или их часть удаляют с растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*); соцветие может быть удалено до раскрытия цветка. Часть соцветия может быть верхушкой стебля соцветия. Удаленные бутон, соцветие или их часть можно хранить при комнатной температуре или в режиме охлаждения, при температуре, например, от 2 до 10 °C или от 4 до 8 °C.

В предпочтительном варианте осуществления описанного выше способа, на этапе (в), сахарид представляет собой моносахарид, например, глюкоза моногидрат. В другом предпочтительном варианте осуществления описанного выше способа, среда, указанная в пункте (в) может дополнительно включать одну или несколько аминокислот, таких как глутамин, и/или нуклеозид, такой как уридин и цитидин. Каждый из этих дополнительных компонентов может присутствовать в концентрации от 20 до 750 мг/л.

В дополнительном варианте осуществления описанного выше способа, этап и) включает все этапы (а)-(з).

В другом из вариантов осуществления способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, этап ii) способа дополнительно включает один или несколько из следующих этапов:

- (и) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте,

(к) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M и

(л) удаление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) из культуры микроспор, полученной на стадии ii).

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа этап ii) включает все этапы (и)-(л).

В одном из вариантов осуществления способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SANA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацедиалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

В другом из вариантов осуществления способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью

обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютена, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

В одном из вариантов осуществления способа, степень гидролиза находится в диапазоне приблизительно от 20% до приблизительно 80%, предпочтительно, приблизительно от 30% до приблизительно 80%, более предпочтительно, приблизительно от 40% до приблизительно 60%.

В другом из вариантов осуществления способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) присутствует в концентрации приблизительно от 1 nM до приблизительно 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M в культуральной среде, используемой на этапе ii)

В дополнительном из вариантов осуществления способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция присутствует в концентрации приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 20000 мг/л, предпочтительно, приблизительно от 500 мг/л до приблизительно 15000 мг/л, более предпочтительно приблизительно от 2000 мг/л до приблизительно 10000 мг/л в культуральной среде, используемой на этапе ii).

В одном из вариантов осуществления способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, каллус или эмбрион на этапе iv) контактируют с одним или несколькими регуляторами роста растений, выбранными из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

В другом из вариантов осуществления способа получения удвоенной гаплоидной (DH) популяции или удвоенной гаплоидной (DH) линии растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, один или несколько агентов удвоения хромосом, таких как колхицин, добавляют на этапе iii) и/или на этапе iv).

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к способу создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), включающему следующие этапы:

- а) получение удвоенного гаплоидного растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью культуры микроспор,
- б) скрещивание удвоенного гаплоидного растения, полученного на этапе а), с другим растением того же вида с другим генотипом, и
- в) получение гибридного потомства семени или растения.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), этап а) содержит следующие стадии:

- i) предоставление по меньшей мере одной изолированной микроспоры свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*),
- ii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе i) в присутствии сложной белковой композиции и по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi),
- iii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе ii) с целью получения каллуса или эмбриона, и
- iv) регенерацию и тем самым получение по меньшей мере одного растения из каллуса или зародыша, полученного на этапе iii).

В одном из вариантов осуществления описанного выше способа этап i) включает одну или несколько из следующих стадий:

- (а) предоставление бутона или соцветия или их части, содержащих микроспоры на тетрадной и одноядерной стадии развития,
- (б) необязательно, дезинфекция бутона или соцветия, или их части (а),

- (в) перенос бутона, соцветия или их части, указанных в пунктах (а) или (б) на среду, содержащую макро- и микросоли, сахараиды и сложную белковую композицию,
- (г) гомогенизацию среды из пункта (в), содержащей бутон или соцветие или их часть, и получение таким образом клеточной суспензии,
- (д) необязательно, очистка клеточной суспензии предпочтительно с помощью сетчатого фильтра и/или центрифугирования,
- (е) получение суспензии микроспор с плотностью от 10 000 до 500 000 микроспор на 1 мл среды,
- (ж) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и
- (з) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе (а) бутон, соцветие или их часть удаляют с растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*); соцветие может быть удалено до раскрытия цветка. Часть соцветия может быть верхушкой стебля соцветия. Удаленные бутон, соцветие или их часть можно хранить при комнатной температуре или в режиме охлаждения, при температуре, например, от 2°C до 10°C или от 4°C до 8°C.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе (в), сахарид представляет собой моносахарид, например, глюкоза моногидрат. В другом предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, среда, указанная в пункте (в) может дополнительно включать одну или несколько аминокислот, таких как глутамин, и/или нуклеозид, такой как уридин и цитидин. Каждый из этих дополнительных компонентов может присутствовать в концентрации от 20 до 750 мг/л.

В дополнительном варианте осуществления описанного выше способа, этап и) включает все этапы (а)-(з).

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, этап ii) способа дополнительно включает один или несколько из следующих этапов:

(и) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте,

(к) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M и

(л) удаление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) из культуры микроспор, полученной на стадии ii).

В дополнительном из вариантов осуществления выше описанного способа, этап ii) включает все стадии (и)-(л). В одном из вариантов осуществления способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацедиалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

В другом из вариантов осуществления способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ.

Предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации.

Особенно предпочтительно, сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютена, протеолизата животных и растений и из их комбинации.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, степень гидролиза сложной белковой композиции находится в диапазоне приблизительно от 20% до приблизительно 80%, предпочтительно, приблизительно от 30% до приблизительно 80%, более предпочтительно, приблизительно от 40% до приблизительно 60%.

В другом из вариантов осуществления способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) присутствует в концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M в культуральной среде, используемой на этапе ii).

В дополнительном из вариантов осуществления способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция присутствует в концентрации приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 20000 мг/л, предпочтительно, приблизительно от 500 мг/л до приблизительно 15000 мг/л, более предпочтительно приблизительно от 2000 мг/л до приблизительно 10000 мг/л в культуральной среде, используемой на этапе ii).

В одном из вариантов осуществления способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, каллус или эмбрион на этапе iv) контактируют с одним или несколькими регуляторами роста растений, выбранными из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

В другом из вариантов осуществления способа создания гибрида растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), в соответствии с любым из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, один или несколько агентов удвоения хромосом, таких как колхицин, добавляют на этапе iii) и/или на этапе iv).

Примеры

Настоящее изобретение также описывают и демонстрируют следующие примеры. Однако использование этих и других примеров в данной спецификации является исключительно иллюстративным и ни в коем случае не ограничивает объем и значение изобретения или любого, приведенного в качестве примера, термина. Аналогично, изобретение не ограничивается какими-либо конкретными предпочтительными вариантами его осуществления, описанными в настоящем документе. На самом деле, многие модификации и вариации изобретения могут быть очевидны специалистам в данной области после прочтения данной спецификации, и такие вариации могут быть реализованы без отклонения от духа или объема изобретения. Таким образом, изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения, а также полным объемом эквивалентов, на которые распространяется эта формула.

Пример 1:

Выращивание растений-доноров

Яровизированные растения свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), предпочтительно сахарная свекла, выращивается в контролируемых тепличных условиях при температуре 16–20°C и 18-часовом искусственном освещении минимум в 75–150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Предпочтительно, инсоляция снижается с помощью затеняющей ткани при значении $> 900 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Растения развивают соцветия примерно через 40 дней. Предпочтительно, с растения удаляется 4-6 см верхушки стебля соцветия до того, как раскроются цветки. Материал хранится в темноте до дальнейшей обработки.

Изоляция микроспор и приготовление раствора микроспор

С соцветия срезают прицветники и удаляют бутоны размером более 1,8 мм. Оставшуюся часть делят на более мелкие части, предпочтительно на части размером 1 -1,5 см. Бутоны размером менее 1,8 мм обычно содержат микроспоры на тетрадной и одноядерной стадии развития, которые являются оптимальными стадиями развития для дальнейшего прогресса. Однако следует отметить, что в связи с широкой вариабельностью различных генотипов и доноров-источников (например, однозародышевых и многозародышевых), корреляция между максимальным размером цветочного бутона и ядерными стадиями развития микроспор должна быть установлена для каждого генотипа индивидуально. Определение

ядерных стадий проводится методом флуоресцентного окрашивания. Метод включает фиксацию клеток, например, с помощью уксусно-этаноловой кислоты и окрашивание DAPI (Kim, Moon-Za, and In-Chang Jang. "Rapid Assessment of Microspore Development Stage in Pepper Using DAPI and Ferric chloride." *Journal of Plant Biotechnology* 2.3 (2000): 129-134.).

Дезинфекцию поверхности предпочтительно проводить путем погружения растительного материала в 70%-ый этанол с последующей обработкой гипохлоритом натрия (NaOCl) с 3%-ым активным хлором. Отбеливатель можно удалить с помощью простерилизованной фильтром воды.

Сегменты цветочных побегов переносят в буфер для изоляции, например, в смесительное устройство (буфер для изоляции, табл. 1), и добавляют 40 мл. Буфер для изоляции содержит макро- и микросоли, аминокислоты, моносахариды и одну или несколько сложных белковых композиций, pH отрегулирован до pH 7,5. Сложная белковая композиция или ее источник предпочтительно включает гидролизованный или частично гидролизованный белковый материал или источник белка. Белковый материал или источник белка может быть получен из любого известного или дополнительно примененного источника, например из молока (например, из казеина, сыворотки), животного (например, из мяса, рыбы), зерна (например, из риса, кукурузы), растения (например, соевых бобов) или из их комбинации. Этот протеиноид включает изоляты молочного белка, описанные в данном документе, концентрат лактопротеина, изоляты казеина, гидролизат казеина, лактальбумин, казеинат натрия или казеинат кальция, цельное коровье молоко, частично или полностью обезжиренное молоко, изолят соевого белка, концентрат соевого белка и т.д. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, сложная белковая композиция включает источник молочного белка, полученный из коровьего молока.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, источник белка представляет собой композицию протеолизата. Она может включать в себя высокогидролизованный белок, где степень гидролиза, как правило, составляет не менее 20%, предпочтительно приблизительно от 20% до приблизительно 80%, более предпочтительно приблизительно от 30% до приблизительно 80%, наиболее предпочтительно приблизительно от 40% до до приблизительно 60%. Эта степень гидролиза представляет собой степень гидролизации пептидных связей. Композиция протеолизата является коммерчески доступной и предпочтительно выбирается из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата сои, протолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата белка рыбы, гидролизата овальбумина, гидролизата

лактальбумина, гидролизата глютина, протеолизата животных и растений, и/или из их комбинации. Концентрация композиции протеолизата буферф для изоляции может составлять от 100 мг/л до 20000 мг/л, предпочтительно от 500 мг/л до 15000 мг/л, более предпочтительно от 2000 мг/л до 10000 мг/л. Концентрация может варьироваться в зависимости от степени гидролиза и содержания белка.

Таблица 1. Буфер для изоляции

	<i>мг/л</i>
$Ca(NO_3)_2 \times 4 H_2O$	236
KH_2PO_4	136
K_2HPO_4	174
KNO_3	1010
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	247
H_3BO_3	10
Глюкоза моногидрат (Декстроза)	90000
Сложная белковая композиция, такая как гидролизат казеина	100 - 20000

Материал доводят до однородной смеси, например, с помощью гомогенизатора, такого как блендер Waring, или соникатор при 3000 об/мин. Неочищенную суспензию клеток поэтапно пропускают через сетчатые фильтры с размером отверстий от 25 μm до 100 μm . Очищенную суспензию переносят в пробирки для последующего центрифугирования (~ 200g в течение 3 мин).

Надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в соответствующем буфере для изоляции. Аликвоту клеточного раствора отбирают для определения количества клеток на мл с помощью счетной камеры. Плотность клеток предпочтительно доводят с помощью среды ТМ до значения в диапазоне от 25 000 до 500 000 клеток.

Пример 2:

Индукция каллуса

Раствор микроспор выдерживают в пробирках, предпочтительно в течение 2 дней при температуре 26°C, в темноте, до добавления ингибиторов гистондеацетилазы (HDACi). Если в качестве ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) используется трихостатин А (TSA), то его растворяют в диметилсульфоксиде (DMSO) до конечной концентрации от 1 нМ до 10 мМ, предпочтительно от 100 нМ до 10 мМ, более предпочтительно от 1 мМ до 10 мМ, в зависимости от генотипа и доноров-источников (например, однозародышевых и многозародышевых). Другие неограничивающие примеры ингибитора гистондеацетилазы (HDACi), которые могут быть использованы, относятся к классу гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как воринонат (SAHA), белинонат (PXD101), LAQ824 и панобинонат (LBH589). Другие неограничивающие примеры ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) для использования согласно изобретению включают циклические тетрапептиды (такие как трапоксин В) и депсипептиды, такие как ромидепсин (FK228), бензамиды, такие как энтинонат (MS-275), CI994 и моцетинонат (MGCD0103), электрофильные кетоны и соединения алифатических кислот, такие как фенилбутират и вальпроевая кислота.

Через 1-10 дней инкубации при температуре 32°C, трихостатин А (TSA) удаляют центрифугированием, предпочтительно при ~ 200g. Среду заменяют средой NLN в половину крепости, с 130 г/л сахарозы (индукционная среда, табл. 2).

Таблица 2. Индукционная среда

	мг/л
$Ca(NO_3)_2 \times 4 H_2O$	250
KH_2PO_4	62.5
KNO_3	62.5
$MgSO_4$	30.5
H_3BO_3	5
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	5
$MnSO_4 \times H_2O$	9.48

<i>CuSO₄ x 5 H₂O</i>	<i>0.0125</i>
<i>CoCl₂ x6 H₂O</i>	<i>0.0125</i>
<i>Na₂MoO₄ x2 H₂O</i>	<i>0.125</i>
<i>FeNaEDTA</i>	<i>18.35</i>
<i>Мио-Инозитол</i>	<i>100</i>
<i>Глицин</i>	<i>2</i>
<i>Никотиновая кислота (ниацин)</i>	<i>5</i>
<i>Пиридоксин HCL</i>	<i>0.5</i>
<i>Тиамин HCL</i>	<i>0.5</i>
<i>Биотин</i>	<i>0.05</i>
<i>Фолиевая кислота</i>	<i>5</i>
<i>Глутамин</i>	<i>800</i>
<i>Глутатион (восстановленный)</i>	<i>30</i>
<i>Серин</i>	<i>100</i>
<i>Сахароза</i>	<i>130000</i>
<i>Индол-3-уксусная кислота</i>	<i>0.3</i>
<i>Кинетин</i>	<i>0.7</i>

Раствор микроспор переносят в многолуночные планшеты, например, объемом в 500 µl на каждую лунку. Планшеты можно запечатать пленкой Nescofilm для дальнейшего культивирования в темноте при температуре 22-28°C.

Для большинства генотипов, деление клеток индуцируется примерно через 10 дней, а каллус становится виден невооруженным глазом примерно через 21 день.

Пример 3:

Регенерация растений

Каллус извлекают из жидкой среды и переносят на твердую среду MS с 1 мг/л GA3 и 1 мг/л TDZ (регенерационная среда, табл. 3) Каллус выращивают в темноте при температуре 26°C до появления первых признаков пролиферации и деления клеток.

Таблица 3. Регенерационная среда

	<i>мг/л</i>
$CaCl_2$	332.2
KH_2PO_4	170
KNO_3	1900
$MgSO_4$	180.7
NH_4NO_3	1650
H_3BO_3	6.2
KJ	0.83
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	8.6
$MnSO_4 \times H_2O$	16.9
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0.025
$CoCl_2 \times 6 H_2O$	0.025
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	0.25
$FeNaEDTA$	36.7
<i>мио-инозитол</i>	100
<i>Глицин</i>	2

<i>Никотиновая кислота (ниацин)</i>	<i>0.5</i>
<i>Пиридоксин HCL</i>	<i>0.5</i>
<i>Тиамин HCL</i>	<i>0.1</i>
<i>Сахароза</i>	<i>30000</i>
<i>TDZ</i>	<i>1</i>
<i>GA3</i>	<i>1</i>

Развитие побегов происходит через 3-4 недели (Фигура 3).

Побеги переносят в среду для развития растений (Gürel, Songül, E. K. R. E. M. Gürel, and Z. E. K. İ. Kaya. "Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)." Plant Cell Reports 19.12 (2000): 1155-1159.).

Преимущественно, способ получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью культур изолированных микроспор, согласно настоящему изобретению приводит к значительному показателю спонтанного удвоения хромосом. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, показатель спонтанного удвоения хромосом составляет по меньшей мере 40%, предпочтительно по меньшей мере 50% и более предпочтительно по меньшей мере 60%. В другом из вариантов осуществления настоящего изобретения показатель удвоения хромосом дополнительно увеличивается путем добавления одного или нескольких агентов для удвоения хромосом, например, колхицина, во время индукции каллуса на индукционной среде и/или регенерации побега или корня на среде развития.

Пример 4:

На фиг. 4, где показано использование вориностата (SAHA) в сравнении с трихостатином А (TSA) (1 μ M и 5 μ M; в том же буфере, что и трихостатин (TSA), см. примеры выше), видно, что вориностат (SAHA) функционирует как ингибитор гистондиацетилазы (HDACi), но не так хорошо, как трихостатин А (TSA). Использование трихостатина А (TSA) продемонстрировало сильную индукцию каллуса у всех шести тестируемых генотипов (столбцы слева направо на фиг. 4 соответствуют одному генотипу). Как видно из фиг. 4,

вориностат (SAHA) оказывает хороший эффект на некоторые генотипы (без вориностата (SAHA) индукция каллуса не наблюдалась, данные не показаны). Таким образом, вориностат (SAHA) также является хорошим кандидатом для использования, но менее эффективным, чем трихостатин А (TSA), и в то же время более токсичным. Поэтому при прямом сравнении, трихостатин А (TSA) является более подходящим.

На **фигуре 5** продемонстрировано тестирование ромидепсина (2,5 μM) отдельно или в комбинации с трихостатином А (TSA). Сам по себе ромидепсин (нижний ряд) действительно демонстрирует незначительный положительный эффект. Без ромидепсина, индукции каллуса не наблюдалось, так как DR (= однозародышевый), по-видимому, вообще не нуждается в добавке для образования каллуса. И снова эффект трихостатина А (TSA) был выше, чем у ромидепсина. Кроме того, не наблюдалось явного синергетического эффекта.

На **фигуре 6** представлены результаты тестирования CPI-203 на 6 генотипах в концентрациях 1 μM , 2,5 μM и 5 μM . CPI действительно оказал незначительный положительный эффект, но этот ингибитор бромодомена показал худшие результаты, чем трихостатин А (TSA).

На **фигуре 7** представлены результаты тестирования применения ингибитора I-Bet 726. Были использованы концентрации 1 μM , 2,5 μM и 5 μM . Примечательно, что I-Bet оказал явный негативный эффект. Индукции каллуса не наблюдалось. И снова трихостатин А (TSA) показал положительные результаты в качестве контрольного ингибитора.

В представленных примерах, трихостатин А (TSA) использовался в концентрации 5 μM во всех примерах, продемонстрированных на фиг. 4 - фиг. 7, с целью гарантировано продемонстрировать качественное сравнение с другими испытываемыми соединениями. Примечательно, что трихостатин А (TSA), как правило, хорошо проявляет себя и в диапазоне более низких значений μM или даже значений nM , а также в более высоких концентрациях, как указано выше (данные не показаны), однако для сравнительных целей в данном примере использовалась разумная средняя концентрация.

В целом, ингибитор гистондиацетилазы (HDACi) трихостатин А (TSA) показал лучшие результаты по сравнению с ингибиторами, протестированными в данных примерах. В частности, ингибитор гистондиацетилазы (HDACi) показал лучшие результаты по сравнению с ингибиторами бромодоамина I-Bet и CPI. Учитывая ожидаемый эффект ингибитора гистондиацетилазы (HDACi) (а также I-Bet и CPI) на экспрессию LEC-1,

трихостатин А (TSA), таким образом, представляется наилучшим кандидатом для использования. Кроме того, большим потенциалом обладают ромидепсин и другие ингибиторы, которые в настоящее время проходят испытания. В частности, можно ожидать определенные синергетические эффекты при комбинировании некоторых ингибиторов.

Перечень вариантов осуществления настоящего изобретения

Ниже приведен неполный перечень дополнительных вариантов осуществления, охватываемых настоящим изобретением.

1. Способ получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью культур изолированных микроспор, как раскрыто в настоящем документе.

2. Способ получения каллусов свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), эмбрионов, проростков и растений, регенерированных из эмбриона; потомства таких растений и семян таких растений, используемых в способе получения или получаемых с помощью способа получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) с помощью культур изолированных микроспор, как раскрыто в настоящем документе.

3. Способ получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных эмбрионов и/или растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из изолированных микроспор, включающий следующие этапы:

а) культивирование изолированных микроспор для получения каллуса или эмбриона, пригодного для регенерации растения, где микроспоры были выделены из растительного материала растения-донора вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*); и

б) необязательно, регенерацию растения из каллуса или эмбриона;

предпочтительно где этап (а) включает в себя контакт микроспор с ингибитором гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композицией.

4. Способ, согласно любому из пунктов 1-3 включающий контактирование микроспор с ингибитором гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композицией.

5. Способ, согласно любому из пунктов 1-4 дополнительно включающий контакт микроспор с одним или несколькими регуляторами роста растений, выбранными из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

6. Способ, согласно любому из пунктов 1-5 f дополнительно включающий контактирование микроспор с одним или несколькими агентами для удвоения хромосом, например, с колхицином.

7. Набор для осуществления способа получения гаплоидных, полиплоидных и/или удвоенных гаплоидных эмбрионов и/или растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из изолированных микроспор, включающий:

ингибитор гистондиацетилазы (HDACi); и

сложную белковую композицию,

где ингибитор гистондиацетилазы (HDACi) и сложная белковая композиция находятся в одном или в двух или в нескольких отдельных контейнерах.

8. Набор, согласно пункту 7, где набор включает первую композицию, содержащую ингибитор гистондеацетилазы (HDACi), и вторую композицию, содержащую сложную белковую композицию.

9. Набор, согласно пунктам 7 или 8, где или первая, или вторая, или обе композиции представляют собой среду для культуры растительных клеток.

10. Набор, согласно пунктам 7-9, где первая композиция находится в первом контейнере, а вторая композиция находится во втором контейнере.

11. Набор, согласно пункту 7, где набор включает единую композицию, состоящую из ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и сложной белковой композиции.

12. Набор, согласно пункту 11, где единая композиция представляет собой среду для культуры растительных клеток.

13. Набор, согласно любому из пунктов 7-12 дополнительно включает набор инструкций по применению ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) и/или сложной белковой композиции.

14. Набор, согласно любому из пунктов 7-13, где или ингибитор гистондеацетилазы (HDACi), или сложная белковая композиция, или и то и другое находятся в концентрированной форме и требуют разбавления перед использованием.

15. Набор, согласно любому из пунктов 7-14 дополнительно включает один или несколько регуляторов роста растений, выбранных из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

16. Набор, согласно пункту 15, где один или несколько регуляторов роста растений могут находиться в том же контейнере, что и ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) и/или сложная белковая композиция, или в отдельном контейнере.

17. Набор, согласно любому из пунктов 7-16 дополнительно включает один или несколько агентов, удваивающих хромосомы, таких как колхицин, содержащихся в другом контейнере.

18. Использование способа согласно любому из пунктов 1-6 или использование набора согласно любому из пунктов 7-17 для получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) методом андрогенеза из изолированных микроспор.

19. Использование ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) или сложной белковой композиции для получения гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных эмбрионов и/или растений вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) путем андрогенеза из изолированных микроспор.

* * * * *

Несмотря на то, что в настоящем документе раскрыто несколько возможных вариантов осуществления настоящего изобретения, варианты осуществления не являются столь ограниченными. Эти варианты осуществления настоящего изобретения даны в качестве примеров и не предназначены для того, чтобы быть исчерпывающими или излишне ограничивать объем изобретения; вместо этого они были выбраны и описаны для того, чтобы объяснить принципы настоящего изобретения, с целью обеспечить другим специалистам в данной области возможность осуществления настоящего изобретения. На самом деле, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными для специалистов в данной области из выше приведенного раскрытия. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Кроме того, терминология, используемая в настоящем документе, используется только для описания примеров вариантов осуществления, и не является ограничивающей, поскольку объем различных вариантов осуществления настоящего изобретения ограничивается только прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами. Поэтому, объем изобретения определяется следующей формулой изобретения, а не вышеприведенным описанием и вышеописанными вариантами

осуществления настоящего изобретения, и все изменения, которые входят в значение и диапазон эквивалентов формулы изобретения, предназначены для включения в нее.

Все патенты, заявки на патенты, публикации, методы испытаний, литература и другие материалы, приведенные в настоящем документе, включены в настоящую спецификацию посредством ссылки в полном объеме, как если бы они присутствовали в ней физически.

Формула изобретения изначально поданная

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*), включающий:

- i) предоставление по меньшей мере одной изолированной микроспоры свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*),
- ii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе i) в присутствии сложной белковой композиции и по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi),
- iii) культивирование по меньшей мере одной микроспоры, полученной на этапе ii) с целью получения каллуса или эмбриона, и
- iv) необязательно, регенерацию и тем самым получение по меньшей мере одного растения из каллуса или зародыша, полученного на этапе iii), и предпочтительно, получение по меньшей мере одного гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного семени.

2. Способ согласно пункту 1, где этап i) включает одну или несколько следующих стадий:

- (а) предоставление бутона, или соцветия, или их части, содержащей микроспоры на тетрадной и одноядерной стадии развития,
- (б) необязательно, дезинфекция бутона или соцветия, или их части (а),
- (в) перенос бутона, соцветия или их части, указанных в пунктах (а) или (б) на среду, содержащую макро- и микрополисахариды и сложную белковую композицию,
- (г) гомогенизацию среды из пункта (в), содержащей бутон или соцветие или их часть, и получение таким образом клеточной суспензии,
- (д) необязательно, очистка клеточной суспензии предпочтительно с помощью сетчатого фильтра и/или центрифугирования,

- (е) получение суспензии микроспор с плотностью от 10 000 до 500 000 микроспор на 1 мл среды,
 - (ж) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте, и
 - (з) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M.
3. Способ согласно пунктам 1 или 2, дополнительно включающий на этапе ii) одну или несколько следующих стадий:
- (и) необязательно, культивирование суспензии микроспор в темноте,
 - (к) добавление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) до конечной концентрации от 1 nM до 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M и
 - (л) удаление по меньшей мере одного ингибитора гистондеацетилазы (HDACi) из культуры микроспор, полученной на стадии ii).
4. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацединалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).
5. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ, и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина,

гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютина, протеолизата животных и растений и из их комбинации, предпочтительно степень гидролиза находится в диапазоне приблизительно от 20% до приблизительно 80%, предпочтительно, приблизительно от 30% до приблизительно 80%, более предпочтительно, приблизительно от 40% до приблизительно 60%.

6. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) присутствует в концентрации приблизительно от 1 nM до приблизительно 10 μ M, предпочтительно от 100 nM до 10 μ M, более предпочтительно от 1 μ M до 10 μ M в культуральной среде, используемой на этапе ii), и/или сложная белковая композиция присутствует в концентрации приблизительно от 100 мг/л до приблизительно 20000 мг/л, предпочтительно, приблизительно от 500 мг/л до приблизительно 15000 мг/л, более предпочтительно приблизительно от 2000 мг/л до приблизительно 10000 мг/л в культуральной среде, используемой на этапе ii).

7. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где каллус или эмбрион на этапе iv) контактируют с одним или несколькими регуляторами роста растений, выбранными из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей.

8. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где один или несколько агентов удвоения хромосом, таких как колхицин, добавляют на этапе iii) и/или на этапе iv).

9. Набор для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса, семени и/или растения вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*) из по меньшей мере одной изолированной микроспоры, содержащий:

- (a) по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi), и
- (б) сложную белковую композицию,

где по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) и сложная белковая композиция содержатся в одном контейнере или в двух или более отдельных контейнерах.

10. Набор согласно пункту 9, где по меньшей мере один ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) выбран из группы, состоящей из трихостатина А (TSA); гидроксамовых кислот и гидроксаматов, таких как вориностат (SAHA), белиностат (PXD101), дациностат (LAQ824) и панобиностат (LBH589); циклических тетрапептидов, таких как трапоксин В и депсипептидов, таких как ромидепсин (FK228); бензамидов, таких как энтиностат (MS-275), тацединалин (CI994) и моцетиностат (MGCD0103); электрофильных кетонов и соединений алифатических кислот, таких как фенилбутират и вальпроевая кислота, предпочтительно, ингибитор гистондеацетилазы (HDACi) представляет собой трихостатин А (TSA) или ромидепсин (FK228).

11. Набор согласно пункту 9 или 10, где сложная белковая композиция включает или состоит из гидролизованного или частично гидролизованного белкового вещества, полученного из молочных продуктов, таких как казеин или сыворотка, из животных продуктов, таких как мясо или рыба, из зерновых, таких как рис или кукуруза, из растений, таких как соя или из комбинации таких белковых веществ, и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из гидролизованных изолятов молочного белка, гидролизованного концентрата лактопротеина, гидролизованных изолятов казеина, гидролизатов казеина, гидролизованного лактальбумина, гидролизованного казеината натрия, гидролизованного казеината кальция, гидролизованного цельного коровьего молока, частично или полностью обезжиренного молока, гидролизованного изолята соевого белка, гидролизованного концентрата соевых бобов или их комбинации и/или сложная белковая композиция включает в себя или состоит из протеолизата, выбранного из группы, состоящей из гидролизата казеина, гидролизата соевых бобов, протеолизата риса, гидролизата картофельного белка, гидролизата рыбного белка, гидролизата овальбумина, гидролизата лактальбумина, гидролизата глютина, протеолизата животных и растений и из их комбинации, предпочтительно степень гидролиза находится в диапазоне от 20% до 80%, предпочтительно, от 30% до 80%, более предпочтительно, от 40% до 60%.

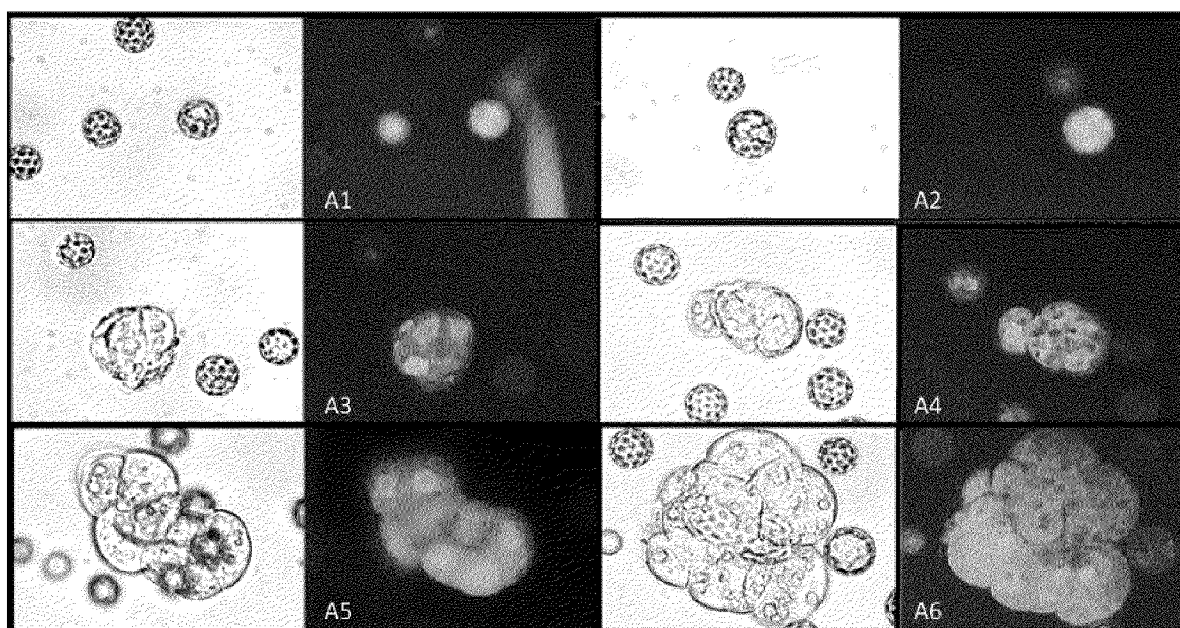
12. Набор, согласно любому из пунктов 9 - 11, где набор дополнительно включает один или несколько регуляторов роста растений, выбранных из ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты и их смесей и/или где набор дополнительно включает один или несколько агентов, удваивающих хромосомы, например, колхицин.

13. Использование ингибитора гистондеацетилазы (HDACi), предпочтительно, определенного в пункте 4, и сложной белковой композиции, предпочтительно, определенной в пункте 5, или использование набора, определенного в любом из пунктов 9-12, для получения гаплоидного, полигаплоидного и/или удвоенного гаплоидного эмбриона, каллуса и/или растения или семени вида свёкла обыкновенная (*Beta vulgaris*), предпочтительно способом в соответствии с любым из пунктов 1-8.

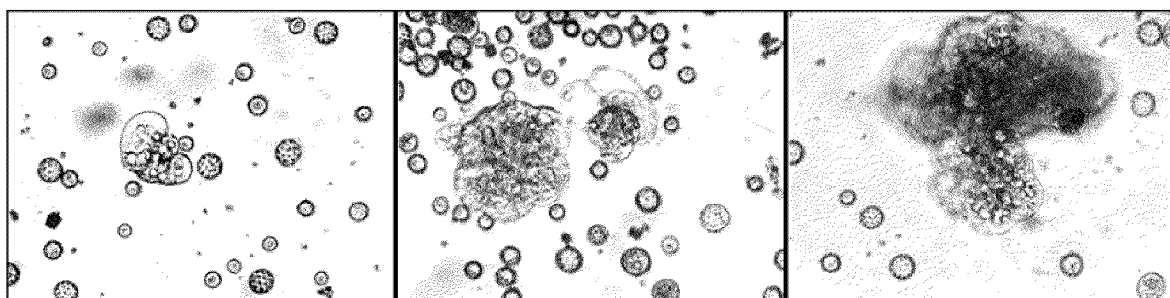
14. Популяция гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*), полученная непосредственно из одного цветка, одного соцветия или одного бутона, предпочтительно полученная или получаемая способом в соответствии с любым из пунктов 1-8.

15. Популяция гаплоидных, полигаплоидных и/или удвоенных гаплоидных растений свёклы обыкновенной (*Beta vulgaris*) согласно пункту 14, где популяция включает по меньшей мере 10 особей.

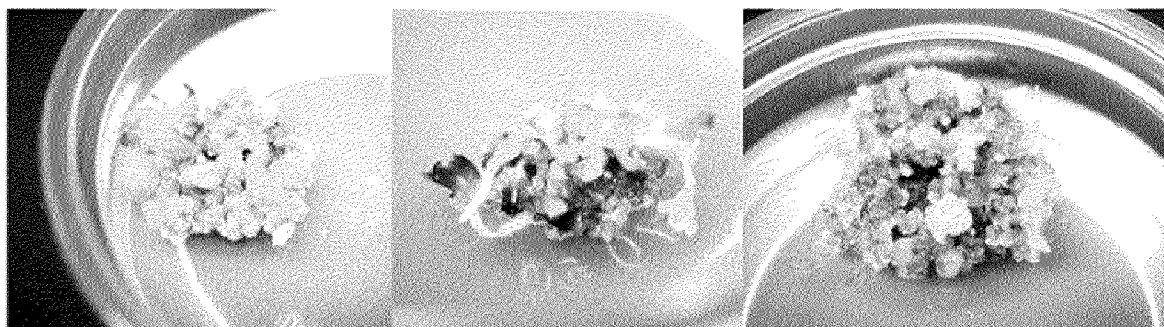
Фиг. 1



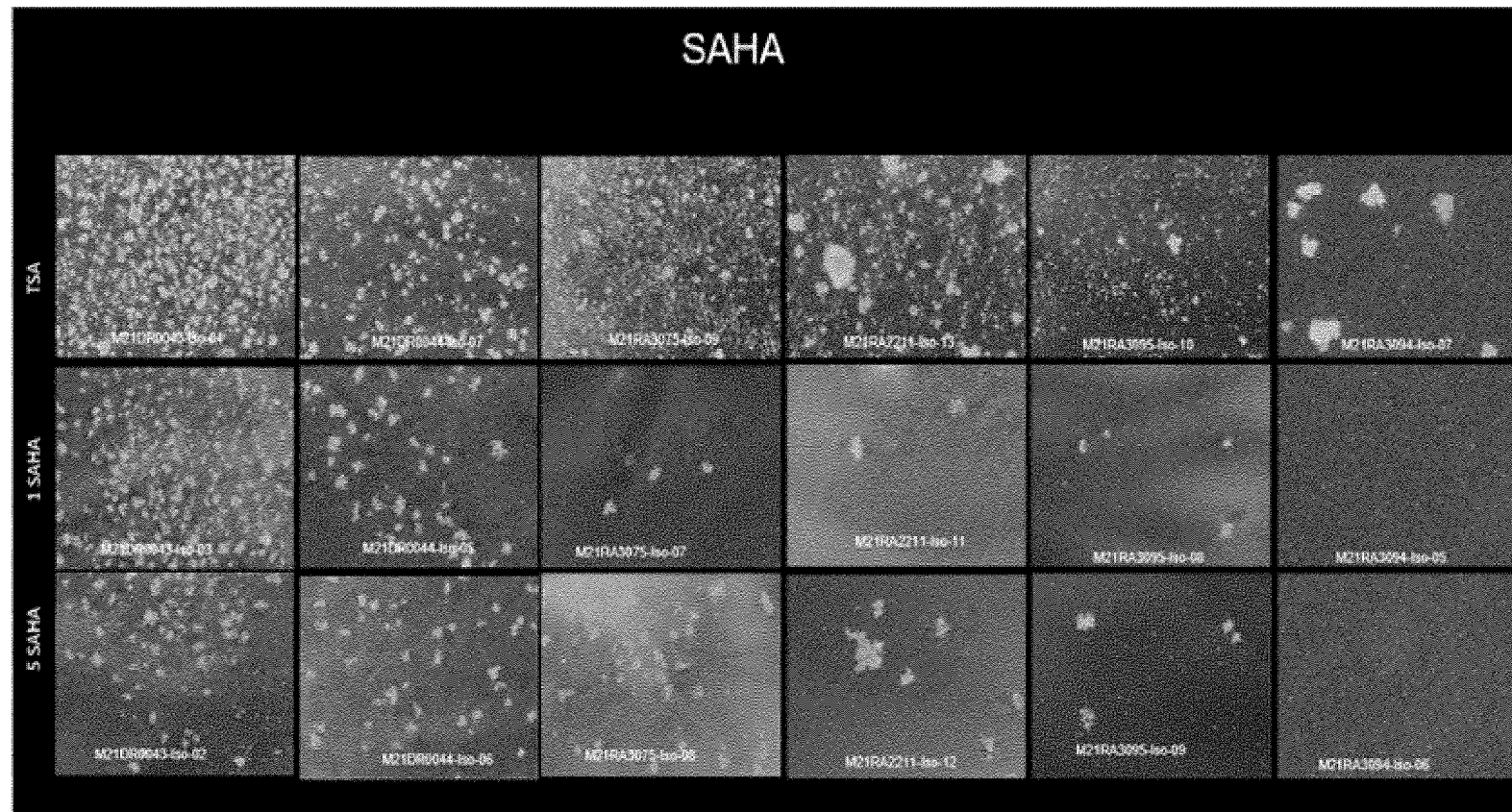
Фиг. 2



Фиг 3.

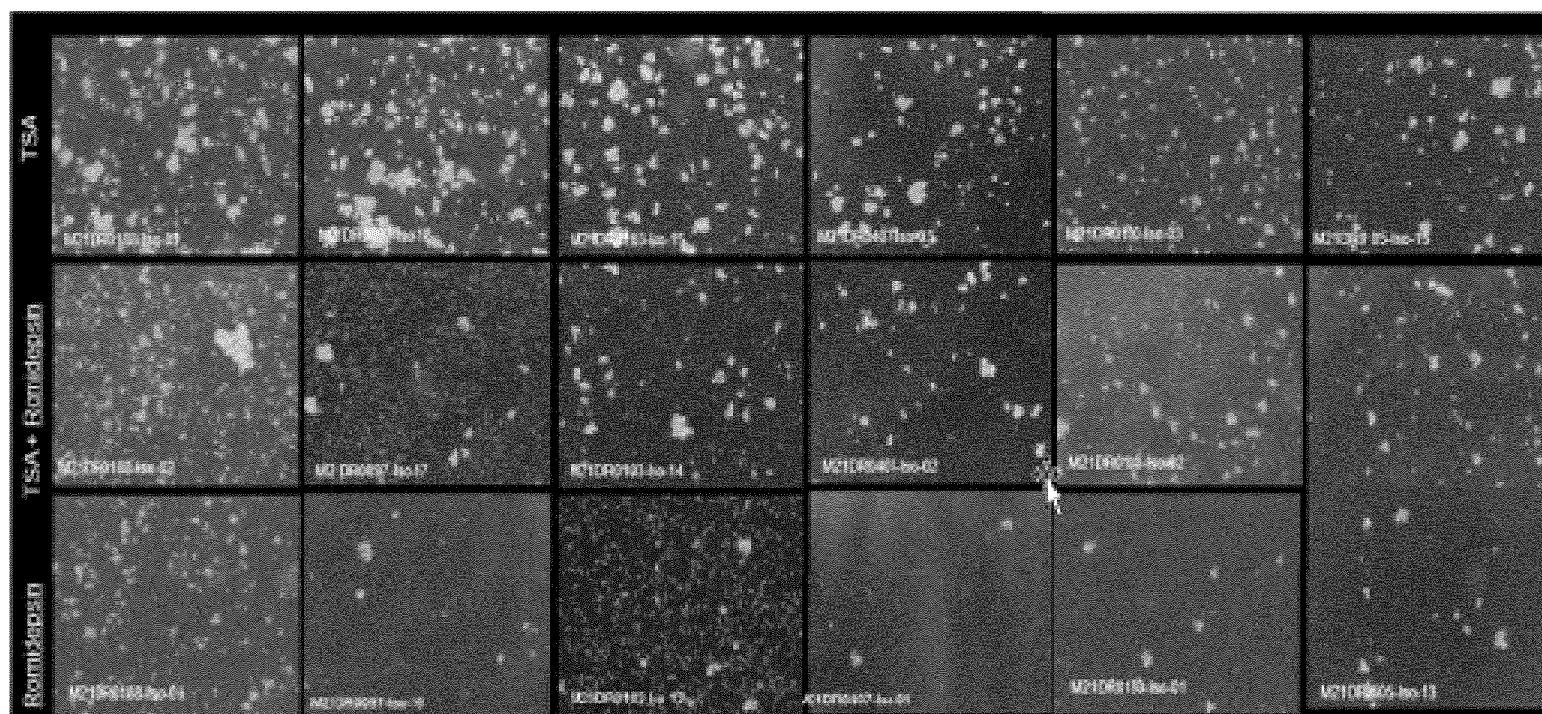


Фиг. 4

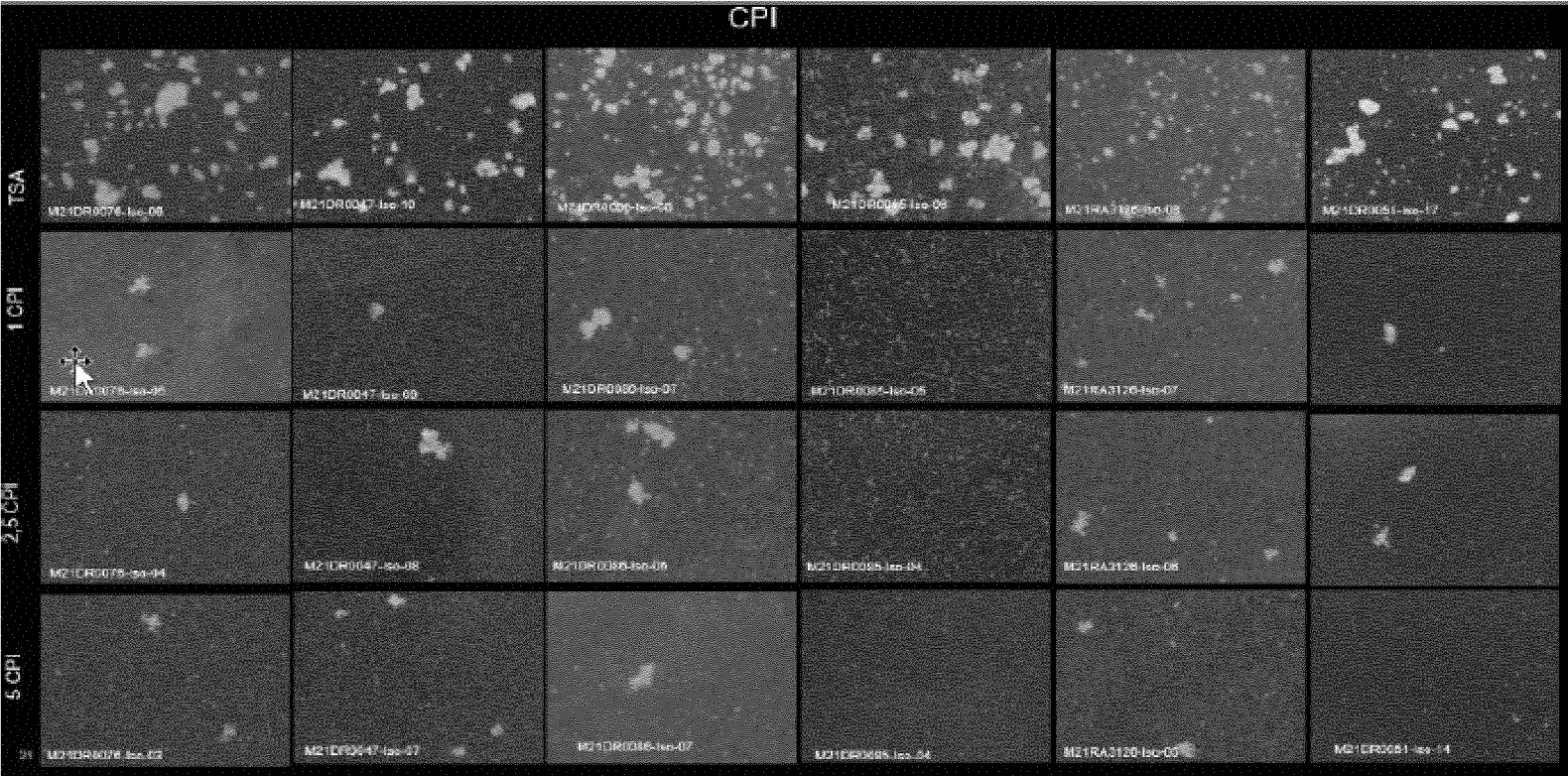


Фиг. 5

• сравнение трихостатина А (TSA) и Ромидеписина



Фиг. 6



Фиг. 7

