

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391479

(13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.15

(22) Дата подачи заявки
2021.11.19

(51) Int. Cl. A01H 1/06 (2006.01)
A01H 1/08 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)
A61N 1/18 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(54) УДВОЕНИЕ ЧИСЛА ХРОМОСОМ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ ПУТЕМ ПРИЛОЖЕНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

(31) 63/116,555

(32) 2020.11.20

(33) US

(86) PCT/US2021/060144

(87) WO 2022/109303 2022.05.27

(71) Заявитель:

СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН
АГ (СН); ПЕРДЬЮ РИСЕРЧ
ФАУНДЕЙШН (US)

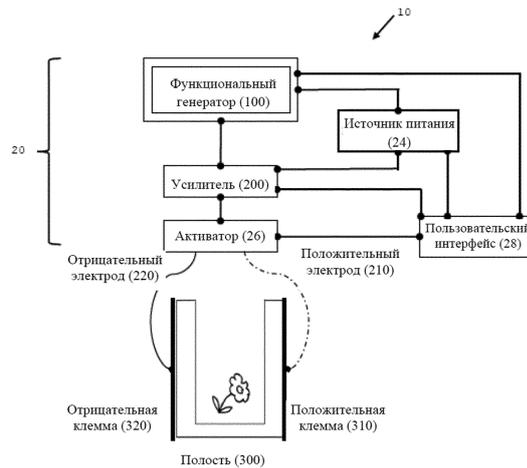
(72) Изобретатель:

Буллок Уильям Пол, Эггер Рэйчел Л.,
Гарнер Аллен Л., Дханабал
Агинипракаш (US)

(74) Представитель:

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

(57) Раскрыты способы удвоения числа хромосом растительной клетки путем приложения электромагнитного поля и способы получения двойной гаплоидной растительной клетки. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка выбрана из группы, включающей маис, рис, томат и табак. Также раскрыто устройство для приложения электромагнитного поля к растительной клетке.



A1

202391479

202391479

A1

УДВОЕНИЕ ЧИСЛА ХРОМОСОМ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ ПУТЕМ
ПРИЛОЖЕНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ

5

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка заявляет преимущество и приоритет предварительной заявки на патент США № 63/116555, поданной 20 ноября 2020 г., полное раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

10 **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

[0002] Настоящее изобретение относится к способам получения двойных гаплоидных растений и двойных гаплоидных семян для ускорения селекции растений, а также к вспомогательным устройствам для этого.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 [0003] Двойные гаплоидные растения широко применяются в современных программах селекции растений. Как правило, это предусматривает получение гаплоидного растения в результате скрещивания нормального растения и растения, являющегося индуктором гаплоидии, или путем культивирования гаплоидных гаметофитов до гаплоидных спорофитов посредством культивирования микроспор, культивирования пыльников, культивирования семяпочек или культивирования завязи. Гаплоидные спорофиты растений, у которых отсутствует какая-либо форма спонтанного удвоения числа хромосом, являются стерильными, если им позволяют развиваться без дополнительного вмешательства человека, и содержат только половину нормального количества хромосом для такого вида растения. См. S.T. Chalyk, 20 *Properties of maternal haploid maize plants and potential application to maize breeding*, ЕВРНУТИСА 79:13–18 (1994), стр. 14, столбец 2. Например, маис считается диплоидным организмом, содержащим 20 хромосом (т. е. по две копии каждого набора из 10 различных хромосом). См., например, M.P. Maguire, *Chromosome behavior at premeiotic mitosis in maize*, J. HEREDITY 74:93–96 (1983), в таблице 1. Для сравнения, гаплоидное 25 растение маиса содержит только 10 хромосом (т. е. по одной копии каждой из 10 хромосом). Для того, чтобы сделать гаплоидное растение фертильным, набор хромосом должен быть удвоен, по меньшей мере в мужских и женских клетках репродуктивной 30 линии, если не во всем растении.

[0004] Межвидовая гибридизация является широко применяемой методикой в современных и исторических программах селекции растений. Как правило, она предусматривает скрещивание двух растений разных видов или подвидов с получением гибрида с двумя наборами разных хромосом. В селекции растений такое скрещивание зачастую применяют для интрогрессии признаков дикорастущего родственного вида в одомашненный культурный вид или для интрогрессии признаков одного одомашненного вида в другой. Примеры, полученные в результате селекции растений, включают межвидовые гибриды пшеницы и ржи и межвидовые гибриды *Brassica rapa* и *oleracea*. Межвидовые гибриды зачастую являются частично или полностью стерильными вследствие проблем спаривания хромосом и мейотической сегрегации. Для того, чтобы преобразовать растения, являющиеся межвидовыми гибридами, из стерильных в фертильные, число их хромосом удваивают посредством ингибирования митоза, как описано ниже.

[0005] Удвоение числа хромосом растения обычно осуществляют с помощью жидкого(жидких) митотического(митотических) веретенного(веретенных) яда(ядов) — токсичных химических веществ, которые иногда применяются при лечении различных форм рака у людей, или эти химические вещества могут быть гербицидами, ингибирующими образование микротрубочек. См. Y. Wan, et al., *The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus*, THEOR. APPL. GENET. 81(2):205–211 (1991). В качестве альтернативы для достижения удвоения числа хромосом можно применять газообразный оксид одновалентного азота. Антимитотические химические вещества препятствуют способности клетки к сборке микротрубочек и формированию нитей веретена деления, необходимых для клеточного деления во время митоза. В случае средств для лечения рака токсины применяют для предотвращения митозу в течение определенного периода времени, чтобы вызвать гибель клеток. См. Z.Y. Lin, et al., *Anticancer effects of clinically acceptable colchicine concentrations on human gastric cancer cell lines*, J. MED. SCI. 32(2):68–73 (2016). Клетки не могут делиться; клетки умирают. У растений данные токсины также будут вызывать гибель клеток, если клетки подвергаются воздействию в течение слишком длительного периода (называемого "летальным периодом"). Следует отметить, что репликация ДНК (то есть удвоение числа хромосом клетки в ожидании клеточного деления) может протекать нормально, если токсин применяется в течение менее длительного периода, чем летальный. Таким образом, необходимо соблюдать тщательный баланс применения токсина в течение периода, достаточно

продолжительного для доведения до максимума удвоения числа хромосом гаплоидной растительной клетки с ингибированием при этом митоза и в то же время достаточно короткого для сведения к минимуму гибели клеток. Это можно иронично назвать способом "замочить и надеяться".

5 [0006] То, способна ли растительная клетка выдержать действие токсина и как долго она способна это делать, зависит от вида растения, тканевой специфичности, стадии развития, а также от самого токсина. Колхицин является преобладающим средством для удвоения числа хромосом ("CDA"), применяемым для растений; однако другие известные веретенные яды включают трифлуралин, пронамид и т. д. См., например, 10 А.М. Castillo et al., *Chromosome Doubling in Monocots*, стр. 331–332, в *ADVANCES IN HAPLOID PRODUCTION IN HIGHER PLANTS* (A. Toureav et al. eds., 2009); и таблицу 1 из патента США № 8859846, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. У маиса и многих других видов гаплоидные, диплоидные и являющиеся межвидовыми гибридами зародыши и сеянцы способны пережить удвоение числа 15 хромосом под действием колхицина, хотя коэффициент выживаемости составляет значительно менее 100%, а фертильность имеет склонность оставаться низкой, обычно на уровне менее 50%. Другими словами, данный тип обработки зачастую не очень эффективен.

[0007] Есть несколько проблем, связанных со способом "замочить и надеяться" 20 применения токсичного CDA в отношении гаплоидной растительной ткани. Во-первых, CDA необходимо дать достаточно времени для его проникновения в мишень и обеспечения репликации ДНК с ингибированием при этом митоза. Затем CDA необходимо удалить, прежде чем оно вызовет гибель клеток. Вторая проблема заключается в безопасном обращении с CDA и надлежащей его утилизации. Таким 25 образом, существует потребность в более эффективном и менее летальном препятствовании митозу в растительной клетке при дополнительном создании более безопасной среды для персонала, работающего на практике со способами удвоения числа хромосом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 [0008] Данное краткое описание представляет собой общий обзор различных аспектов настоящего изобретения и представляет некоторые из идей, которые описаны и проиллюстрированы в данном документе и на прилагаемых фигурах. Данное краткое описание не предназначено для определения ключевых или существенных признаков заявляемого объекта изобретения, а также не предназначено для использования

отдельно с целью определения объема заявляемого объекта изобретения. Объект настоящего изобретения следует понимать со ссылкой на соответствующие части всего описания, любые или все из фигур и каждый пункт формулы изобретения. Ниже обсуждаются некоторые из иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения.

[0009] Настоящее изобретение отчасти основано на разработке авторами настоящего изобретения способа удвоения числа хромосом растительной клетки путем приложения электромагнитного поля ("EMF"). Авторами настоящего изобретения было установлено, что EMF, настроенное на эффективную частоту и прилагаемое с достаточной напряженностью и/или в течение достаточной продолжительности, может нарушить формирование нитей веретена деления, не вызывая гибели клеток. При приложении EMF во время митоза растительные клетки проходят репликацию ДНК без успешного завершения митоза. По сути, в гаплоидных или являющихся межвидовыми гибридами растительных клетках, подвергающихся воздействию EMF, удваивается число их хромосом в отсутствие жидкого веретенного яда и без претерпевания каких-либо летальных побочных эффектов от яда.

[0010] В одном аспекте в данном документе предусмотрены способы удвоения числа хромосом в растительных клетках, включающие приложение EMF к растительной клетке и обеспечение возможности нарушения митоза под действием EMF, где в растительной клетке реплицируются ее хромосомы без прохождения клеточного деления, за счет чего обеспечивается получение растительной клетки с удвоенным числом хромосом. В некоторых вариантах осуществления EMF нарушает митоз путем нарушения формирования нитей веретена деления. В некоторых вариантах осуществления EMF прилагают с эффективной частотой и напряженностью в течение достаточной продолжительности приложения для нарушения митоза в растительной клетке. В некоторых вариантах осуществления эффективная частота находится в диапазоне от 1 кГц до 300 ГГц включительно. В некоторых вариантах осуществления достаточная продолжительность приложения выбрана из группы, состоящей из (i) по меньшей мере продолжительности, эквивалентной профазе митоза для растительной клетки; (ii) продолжительности, эквивалентной полному циклу митоза для растительной клетки; и (iii) приблизительно 5 часов. В некоторых вариантах осуществления продолжительность, эквивалентная профазе митоза, составляет примерно 25 минут для клетки маиса.

[0011] В некоторых вариантах осуществления предусмотренных в данном документе способов прилагаемое EMF характеризуется формой волны, и параметры прилагаемого EMF включают одну или несколько из частоты, периодичности и амплитуды формы волны.

5 **[0012]** В некоторых вариантах осуществления предусмотренных в данном документе способов растительная клетка представляет собой клетку однодольного или двудольного растения. В некоторых вариантах осуществления однодольное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, пшеницы, риса, сорго и ячменя. В некоторых вариантах осуществления двудольное растение выбрано из группы, состоящей из сои, 10 подсолнечника, томата, табака, разновидностей тыквы, разновидностей капусты, салата латука, петунии, розы, каллиопы и лука. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой гаплоидную растительную клетку. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой меристематическую клетку. В некоторых вариантах осуществления растительная 15 клетка представляет собой клетку-гамету. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка содержится в образце ткани. В некоторых вариантах осуществления образец ткани представляет собой зародыш растения. В некоторых вариантах осуществления образец ткани выбран из группы, состоящей из цветка, початка, метелки, семянки, семени, зародыша и части любого из предыдущих, при 20 условии, что образец ткани содержит жизнеспособные клетки.

[0013] В данном документе также предусмотрены растительные клетки с удвоенным числом хромосом, полученные посредством способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка с удвоенным числом хромосом содержится в зародыше растения. В данном документе также предусмотрены 25 растения, выращенные из растительных клеток с удвоенным числом хромосом, и их потомство.

[0014] В объем настоящего изобретения также включены устройства для приложения EMF к растительной клетке с целью удвоения числа хромосом в растительной клетке, независимо от того, содержится ли растительная клетка в зародыше, микроспоре, 30 каллюсной ткани, суспензии растительных клеток, целом растении (будь то сеянец или зрелое растение), мужских или женских репродуктивных тканях целого растения или любой ткани, содержащей клетки апикальной меристемы побега ("SAM"). В некоторых вариантах осуществления устройства содержат полость для размещения образца, содержащего растительную клетку, контур для генерирования и усиления EMF от

энергии, получаемой от источника питания, резервуар для удержания растительной клетки на месте в полости и пару электродов. В некоторых вариантах осуществления устройства дополнительно содержат осциллограф для измерения EMF, прилагаемого к растительной клетке, и отображения показаний, представляющих измеренное EMF.

- 5 **[0015]** В некоторых вариантах осуществления устройств, предусмотренных в данном документе, резервуар содержит пару электродов. В некоторых вариантах осуществления резервуар содержит первую пару противоэлектродов, расположенных параллельно друг другу, где расстояние между парой противоэлектродов определяет границы полости для удержания растительной клетки. В некоторых вариантах
- 10 осуществления резервуар содержит изолированные электроды. В некоторых вариантах осуществления резервуар содержит неизолированные электроды. В некоторых вариантах осуществления резервуар представляет собой чашку Петри, содержащую полость и необязательно среду. В некоторых вариантах осуществления среда представляет собой жидкую среду, твердую среду или газообразную среду (например,
- 15 воздух). В некоторых вариантах осуществления чашка Петри содержит пару электродов. В некоторых вариантах осуществления чашка Петри содержит две электродные пластины, ориентированные параллельно и на противоположных сторонах полости, так что электроды контактируют со средой. В некоторых вариантах осуществления чашка Петри содержит две электродные пластины, ориентированные
- 20 параллельно и на противоположных сторонах полости, так что один электрод контактирует со средой, и один электрод выполнен с возможностью отделения от среды пластиком или воздухом. В некоторых вариантах осуществления чашка Петри содержит две электродные пластины, ориентированные параллельно и на
- 25 противоположных сторонах полости, так что электроды выполнены с возможностью отделения от среды пластиком или воздухом. В некоторых вариантах осуществления чашка Петри содержит матрицу игольчатых электродов, выполненных с возможностью размещения вокруг образца для создания однородного электрического поля. В некоторых вариантах осуществления чашка Петри содержит крышку, и при этом игольчатые электроды проходят сквозь крышку.
- 30 **[0016]** В некоторых вариантах осуществления устройств, предусмотренных в данном документе, резервуар представляет собой кювету, содержащую полость и необязательно среду. В некоторых вариантах осуществления кювета содержит пару электродов. В некоторых вариантах осуществления кювета содержит две электродные пластины, ориентированные параллельно и на противоположных сторонах полости и

выполненные с возможностью контакта со средой. В некоторых вариантах осуществления кювета представляет собой кювету для электропорации.

[0017] В некоторых вариантах осуществления устройств, предусмотренных в данном документе, пара электродов представляет собой первую пару противозлектродов, и устройства дополнительно содержат вторую пару противозлектродов, ориентированных перпендикулярно по отношению к первой паре противозлектродов. В некоторых вариантах осуществления устройства дополнительно содержат третью пару противозлектродов, ориентированных перпендикулярно по отношению к каждой из первой пары электродов и второй пары электродов.

[0018] В другом аспекте в данном документе предусмотрены способы получения двойной гаплоидной растительной клетки, включающие получение гаплоидной растительной клетки, воздействие на гаплоидную растительную клетку посредством EMF и обеспечение возможности нарушения митоза под действием EMF, вследствие чего в гаплоидной растительной клетке реплицируются ее хромосомы, но не происходит клеточное деление, за счет чего обеспечивается получение двойной гаплоидной растительной клетки. В некоторых вариантах осуществления EMF представляет собой поле AC с напряженностью прилагаемого электрического поля от 0,5 до 100 В/см и частотой от 1 кГц до 300 ГГц. В некоторых вариантах осуществления EMF характеризуется электрическим импульсом длительностью от 10 нс до 1 мс, напряженностью прилагаемого электрического поля от 1 В/см до 300 кВ/см, значениями времени нарастания и спада от 0,5 нс до 5000 нс и частотой повторения от 0,1 Гц до 100 Гц.

[0019] В данном документе также предусмотрены двойные гаплоидные растительные клетки, полученные посредством способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка содержится в зародыше растения. В некоторых вариантах осуществления зародыш растения представляет собой зародыш маиса. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка содержится в микроспоре маиса. В данном документе также предусмотрены двойные гаплоидные растения, выращенные из двойных гаплоидных растительных клеток, и их потомство.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0020] Настоящее изобретение включает нижеследующие фигуры. Данные фигуры предназначены для иллюстрации определенных вариантов осуществления и/или признаков способов и устройств, а также для дополнения любого(любых)

описания(описаний) способов и устройств. Фигуры не ограничивают объем способов и устройств, если письменное описание прямо не указывает, что это так.

[0021] На **фиг. 1** показан иллюстративный вариант осуществления устройства для генерирования и приложения электромагнитного поля (EMF) к растению (или части растения).

[0022] На **фиг. 2** показан другой иллюстративный вариант осуществления устройства, показанного на **фиг. 1**, содержащий осциллограф.

[0023] На **фиг. 3** показан эффект приложения EMF в отношении хромосом клеток табака ВУ-2, которые были генетически модифицированы для экспрессии мономеров тубулина, слитых с доменом зеленого флуоресцентного белка ("GFP"), в соответствии с аспектами настоящего изобретения. На **(a)** (крайняя левая панель) и **(b)** (вторая панель слева) изображены клетки, которые не подвергались воздействию приложенного EMF, включая необработанные контроли и контроли, обработанные полем DC; на **(c)** (третья панель слева) показаны клетки, подвергнутые воздействию EMF с частотой 250 кГц; на **(d)** (крайняя правая панель) показаны клетки, подвергнутые воздействию EMF с частотой 275 кГц. На **(a)** и **(b)** показаны две стадии нормального развития фрагмопласта во время митоза. На **(c)** и **(d)** показаны аномальные фрагмопласты с дезорганизованными микротрубочками. Стрелками показаны фрагмопласты; масштабные полосы соответствуют 10 мкм.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Терминология

[0024] Предполагается, что все технические и научные термины, используемые в данном документе, если ниже не определено иное, имеют такое же значение, которое обычно понятно среднему специалисту в данной области. Предполагается, что ссылки на используемые в данном документе методики относятся к методикам, общепринятым в данной области техники, в том числе к видоизменениям этих методик и/или заменам на эквивалентные методики, которые будут очевидны специалисту в данной области. Хотя предполагается, что следующие термины хорошо понятны среднему специалисту в данной области, следующие определения приведены для облегчения пояснения раскрытого в данном документе объекта изобретения.

[0025] Используемые в данном документе формы единственного числа включают ссылку на формы множественного числа, если содержание четко не определяет иное. Так, например, ссылка на "антитело" необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и т. п.

[0026] Используемый в данном документе термин "приблизительно" относится к обычному диапазону погрешности для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники, например, под его предполагаемый смысл для указанного значения подпадает $\pm 20\%$, $\pm 10\%$ или $\pm 5\%$.

5 **[0027]** Используемый в данном документе термин "содержащий" или "содержать" является открытым.

[0028] Термин "множество" относится к более чем одному объекту. Таким образом, "множество особей" относится к по меньшей мере двум индивидуумам. Множество может составлять 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше индивидуумов в более крупной популяции. Кроме того, множество может быть представлено 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 10 **7%**, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% популяции.

[0029] "Растение" представляет собой любое растение на любой стадии развития (например, семенное растение).

15 **[0030]** "Растительная клетка" представляет собой структурную и физиологическую единицу растения, содержащую протопласт и клеточную стенку. Растительная клетка может быть представлена в форме выделенной одиночной клетки или культивируемой клетки или в виде части более высокоорганизованной единицы, такой как, например, растительная ткань или целое растение.

20 **[0031]** "Культура растительных клеток" означает культуры растительных единиц, таких как, например, протопласты, клетки в культуре клеток, клетки в растительных тканях, пыльца, пыльцевые трубки, семязпочки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития.

[0032] Термины "ткань" или "образец" используются в данном документе для обозначения любого растения или части растения, включая без ограничения пыльники, микроспоры, зародыши, жидкие или твердые культуры растительных тканей, растительный каллус, зародыши, зародышеподобные структуры, проростки, сеянцы и молодые или зрелые растения, в том числе растения, растущие в полях.

30 **[0033]** Термин "потомство" относится к любому растению, полученному в результате вегетативного или полового размножения от одного или нескольких родительских растений или их потомков. Как правило, потомство является результатом скрещивания двух индивидуумов, хотя некоторые виды (особенно некоторые растения и гермафродитные животные) могут подвергаться самооплодотворению (т. е. одно растение выступает в качестве донора как мужских, так и женских гамет).

Потомок(потомки) могут быть, например, из F1, F2 или любого последующего поколения.

[0034] Растение, называемое в данном документе "гаплоидным", имеет уменьшенное количество хромосом (n) в гаплоидном растении, и его набор хромосом соответствует
5 такому у гаметы. В гаплоидном организме присутствует только половина от нормального количества хромосом. Таким образом, гаплоидные формы диплоидных ($2n$) организмов (например, маиса) демонстрируют моноплоидию ($1n$); гаплоидные формы тетраплоидных ($4n$) организмов (например, разновидностей плевела)
10 демонстрируют диплоидию ($2n$); гаплоидные формы гексаплоидных ($6n$) организмов (например, пшеницы) демонстрируют триплоидию ($3n$) и т. д. Как используется в данном документе, растение, называемое "двойным гаплоидом", развивается при удвоении гаплоидного набора хромосом. Растение или семя, полученные из двойного гаплоидного растения, самооплодотворяемого в течение любого количества поколений, все еще можно идентифицировать как двойное гаплоидное растение. Двойное
15 гаплоидное растение считается гомозиготным растением. Растение считается двойным гаплоидным, если оно является фертильным, даже если вся вегетативная часть растения не состоит из клеток с удвоенным набором хромосом; то есть растение будет считаться двойным гаплоидным, если оно содержит жизнеспособные гаметы, даже если оно является химерным в вегетативных тканях.

[0035] Используемый в данном документе термин "полость" относится к любому объекту, содержащему пространство, способное удерживать, сохранять и т. д.
20 растительную клетку, растительную ткань, зародыш растения, меристему растения или часть растения. В некоторых вариантах осуществления полость может быть выполнена из металла, стекла, пластика или их комбинации. Полость может представлять собой кювету. Полость может содержать электроды в корпусе объекта, или полость может располагаться рядом с электродами.

[0036] Термин "средство для удвоения числа хромосом" ("CDA") относится к любому токсину или химическому веществу, такому как колхицин, которое применяют для
25 препятствования формированию нитей веретена деления.

[0037] Термины "электромагнитное поле", "EM-поле" и "EMF" используются
30 взаимозаменяемо. EMF представляет собой поле, содержащее как электрическую, так и магнитную составляющие, возникающие в результате движения электрического заряда и содержащие определенное количество электромагнитной энергии. Можно создать EMF путем передачи переменного тока по проводу/электроду/антенне, как описано в

настоящем изобретении. Другим способом создания EMF является перемещение электрически заряженных объектов. См. в целом RICHARD P. FEYNMAN ET AL., THE FEYNMAN LECTURES ON PHYSICS VOL. II, ISBN 978-0-201-02115-8 (Addison W. Longman, ed., 1970).

5 **[0038]** Как используется в данном документе, "приложение EMF" к образцу включает приложение электромагнитного поля к образцу, необязательно представленному в контейнере, где электромагнитное поле генерируется переменным током (AC), который обычно является синусоидальным во времени (хотя он может иметь другое временное поведение). Электромагнитное поле определяется его величиной (или пиковым
10 электрическим полем) и частотой (или периодом синусоидального поля). Кроме того, "приложение EMF" означает воздействие на образец условий EMF.

[0039] Термин "репликация ДНК" означает репликацию всего генома клетки, т. е. каждой ее хромосомы, в ожидании митоза — независимо от того, успешно завершается митоз или каким-то образом прерывается.

15 **[0040]** Используемый в данном документе термин "синхронизировать" относится к состоянию, в котором популяция клеток была обработана для обеспечения того, чтобы приемлемое множество клеток в популяции (которое может составлять всего 1%, но предпочтительно составляет 30% или выше и в оптимальном случае превышает 80%) находилось на одной и той же или на близких стадиях клеточного деления. Таким
20 образом, когда клетки синхронизированы, они подвергаются репликации ДНК в одно и то же или примерно в одно и то же время и проходят митоз в одно и то же или примерно в одно и то же время. И наоборот, популяция клеток, которые не были синхронизированы, содержит клетки на различных стадиях развития от интерфазы до клеточного деления, включая репликацию ДНК и митоз, независимо от момента
25 времени.

[0041] "Широкое скрещивание", "широкая гибридизация", "межвидовое скрещивание", "межвидовая гибридизация" и тому подобное во всех случаях относятся к принудительному скрещиванию между неродственными или отдаленно
родственными видами или сортами, которые неспособны, за исключением случаев
30 вмешательства человека, производить фертильное или жизнеспособное потомство. В основе процедур широкого скрещивания обычно лежит спасение зародыша, и они могут также предусматривать процедуры удвоения числа хромосом. В качестве примера и без ограничения, широким скрещиванием является опыление цветка маиса пылью пшеницы, и оно приводит к получению гаплоидного потомства маиса.

II. Введение

[0042] В ожидании митоза материнская клетка проходит репликацию ДНК и таким образом копирует свой геном, так чтобы каждая дочерняя клетка после цитокинеза материнской клетки содержала полную копию генома материнской клетки. В качестве неограничивающего примера, диплоидная клетка маиса обычно содержит 20 хромосом. После репликации ДНК материнская клетка маиса будет содержать 40 хромосом. Во время митоза данные хромосомы будут делиться на две группы по 20 хромосом, которые затем сформируют геном для каждой дочерней клетки маиса. В качестве неограничивающего примера, гаплоидная клетка маиса содержит 10 хромосом. После репликации ДНК в указанной клетке число хромосом удваивается до 20. При прерывании митоза гаплоидной клетки на данной стадии и предотвращении клеточного деления гаплоидная клетка маиса становится двойной гаплоидной клеткой маиса, содержащей нормальное количество хромосом: 20. Как подробно описано в данном документе, авторы настоящего изобретения выяснили, что приложение EMF к растительной клетке можно преимущественно применять для прерывания митоза и индукции удвоения числа хромосом. Путем корректировки EMF, прилагаемого к растительному образцу (в том числе целому растению, части растения, растительной клетке или культуре растительных тканей), например, путем оптимизации параметров амплитуды, частоты, мощности и формы волны EMF, можно достичь удвоения числа хромосом, не влияя на жизнеспособность растительного образца. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что достаточным может быть прерывание митоза только во время подпериода профазы митоза, в котором формируются нити веретена деления. Однако текущие наблюдения показывают, что прерывание митоза для всех подпериодов митоза достигает цели способа без необходимости использования ядов для нитей веретена деления.

III. Способы удвоения числа хромосом

[0043] В одном аспекте в данном документе предусмотрены способы индукции удвоения числа хромосом в растительных клетках. В некоторых вариантах осуществления способы включают приложение электромагнитного поля (EMF) к растительной клетке и обеспечение возможности нарушения митоза под действием EMF, как обсуждается выше. В некоторых вариантах осуществления EMF нарушает митоз путем нарушения формирования нитей веретена деления. В некоторых вариантах осуществления в растительной клетке реплицируются ее хромосомы (например, до приложения EMF, одновременно с приложением EMF или после приложения EMF) без

прохождения клеточного деления, за счет чего обеспечивается получение растительной клетки, имеющей двойной набор хромосом.

[0044] В данном документе также предусмотрены способы получения двойной гаплоидной растительной клетки, включающие получение гаплоидной растительной клетки, воздействие на гаплоидную растительную клетку посредством ЭМФ и обеспечение возможности нарушения митоза под действием ЭМФ. В некоторых вариантах осуществления в гаплоидной растительной клетке реплицируются ее хромосомы, но не происходит клеточное деление, за счет чего обеспечивается получение двойной гаплоидной растительной клетки.

[0045] В некоторых вариантах осуществления приложение ЭМФ оптимизировано для конкретного порядка применения или для конкретного результата. Например, параметры прилагаемого ЭМФ могут быть выбраны с учетом вида растения и/или типа ткани. В некоторых вариантах осуществления прилагаемое ЭМФ характеризуется формой волны. В некоторых вариантах осуществления параметры прилагаемого ЭМФ (например, параметры, выбранные с учетом вида растения и/или типа ткани) включают одну или несколько из частоты, периодичности и амплитуды формы волны ЭМФ. В некоторых вариантах осуществления параметры прилагаемого ЭМФ могут быть выбраны с учетом типа среды, т. е. жидкой среды, твердой среды или газообразной среды (например, воздуха), в которой находится растительная ткань.

[0046] В некоторых вариантах осуществления ЭМФ прилагают к растительной клетке с эффективной частотой и напряженностью в течение достаточной продолжительности приложения для нарушения митоза в растительной клетке. В некоторых вариантах осуществления частота прилагаемого ЭМФ составляет от 1 кГц до 300 ГГц, или от 10 кГц до 1 ГГц, или от 100 кГц до 500 кГц. В некоторых вариантах осуществления напряженность прилагаемого ЭМФ составляет от 0,5 В/см до 100 В/см, или от 1,0 В/см до 50 В/см, или от 2,5 В/см до 25 В/см. В некоторых вариантах осуществления ЭМФ представляет собой поле АС с напряженностью прилагаемого электрического поля от 0,5 до 100 В/см и частотой от 1 кГц до 300 ГГц. В некоторых вариантах осуществления ЭМФ характеризуется электрическим импульсом длительностью от 10 нс до 1 мс, напряженностью прилагаемого электрического поля от 1 В/см до 300 кВ/см, значениями времени нарастания и спада от 0,5 нс до 5000 нс и частотой повторения от 0,1 Гц до 100 Гц.

[0047] В некоторых вариантах осуществления продолжительность приложения ЭМФ представляет собой период времени, достаточный для предотвращения митоза в

достаточном количестве клеток зародыша. В некоторых вариантах осуществления продолжительность позволяет репликации ДНК проходить без клеточного деления, что тем самым вызывает удвоение числа хромосом. Достаточная продолжительность приложения EMF может составлять по меньшей мере 24 часа, или по меньшей мере 12 часов, или по меньшей мере 8, или по меньшей мере 6 часов, или по меньшей мере 4 часа, или по меньшей мере 2 часа, или по меньшей мере 1 час, или по меньшей мере 30 минут. В некоторых вариантах осуществления достаточная продолжительность составляет приблизительно 15 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 1,5 часа, приблизительно 2 часа, приблизительно 2,5 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 24 часа или более 24 часов. В некоторых вариантах осуществления достаточная продолжительность приложения выбрана из группы, состоящей из (i) по меньшей мере продолжительности, эквивалентной профазе митоза для растительной клетки (например, которая известна специалисту в данной области или которая определена экспериментально); (ii) продолжительности, эквивалентной полному циклу митоза для растительной клетки (например, которая известна специалисту в данной области или которая определена экспериментально); и (iii) приблизительно 5 часов. В некоторых вариантах осуществления (например, для клетки маиса) продолжительность, эквивалентная профазе митоза для растительной клетки, составляет примерно 25 минут.

[0048] Способы по настоящему изобретению можно применять к растительной клетке из любого представляющего интерес растения. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку однодольного или двудольного растения. В некоторых вариантах осуществления однодольное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, пшеницы, риса, сорго и ячменя. В некоторых вариантах осуществления двудольное растение выбрано из группы, состоящей из сои, подсолнечника, томата, табака, разновидностей тыквы, разновидностей капусты, салата латука, пегунии, розы, каллиопы и лука. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой гаплоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой меристематическую клетку. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку-

гамету. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка содержится в образце ткани. В некоторых вариантах осуществления образец ткани выбран из группы, состоящей из цветка, початка, метелки, семянки, семени, зародыша и части любого из предыдущих, при условии, что образец ткани содержит жизнеспособные клетки. В некоторых вариантах осуществления образец ткани представляет собой зародыш растения.

[0049] В данном документе также предусмотрены растительные клетки с удвоенным числом хромосом и двойные гаплоидные растительные клетки, полученные посредством любого из описанных выше способов. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка с удвоенным числом хромосом или двойная гаплоидная растительная клетка содержится в зародыше растения. В некоторых вариантах осуществления зародыш растения представляет собой зародыш маиса. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка с удвоенным числом хромосом или двойная гаплоидная растительная клетка содержится в микроспоре маиса. Также предусмотрены растения, выращенные из растительных клеток с удвоенным числом хромосом, двойные гаплоидные растения, выращенные из двойных гаплоидных растительных клеток, и потомство указанных растений.

IV. Устройство для приложения EMF

[0050] На **фиг. 1–2** показаны иллюстративные варианты осуществления устройства, которое можно применять для приложения электромагнитного поля к растительному образцу. Приложение электромагнитного поля с оптимизированной силой и частотой поля, а также с дополнительной оптимизацией продолжительности приложения может привести к удвоению числа хромосом растительной клетки без ухудшения жизнеспособности клетки. Конкретные способы описаны со ссылкой на перечисленные примеры.

[0051] На **фиг. 1** показан иллюстративный вариант осуществления устройства для генерирования EMF (**10**), имеющего полость **300** для размещения растительного образца (такого как целое растение, или часть растения, или растительная клетка) и электромагнитный контур (**20**), выполненный с возможностью испускания электромагнитного поля ("EMF") при активации. Устройство выполнено с возможностью испускания поля над всей поверхностью растительного образца, размещенного в полости, так чтобы излучаемое электромагнитное поле воздействовало на все растительные клетки. В некоторых вариантах реализации устройство является

одноразовым и/или портативным. Источник **24** питания подает электроэнергию на устройство.

[0052] Электромагнитный контур **20** включает в себя функциональный генератор (**100**), функционально соединенный с усилителем (**200**). Функциональный генератор ("FG") (**100**) включает в себя контур генератора поля, напечатанный на печатной плате. Усилитель **200** включает в себя контур усилителя, напечатанный на той же или другой печатной плате. FG **100** получает питание от источника **24** питания и вырабатывает энергию, необходимую для создания EMF. FG выполнен с возможностью создания напряжения с выбранной комбинацией частоты и амплитуды на основе входных значений, установленных пользователем устройства (например, выбранной настройки мощности). В силу этого FG может быть способен создавать любую схему напряжений, имеющую любую из множества комбинаций частоты и амплитуды. В качестве неограничивающих примеров FG может быть способен генерировать синусоидальные, прямоугольные, пилообразные или треугольные формы волны. Тогда как контур FG выполнен с возможностью создания различных форм волны напряжения, усилитель выполнен с возможностью усиления входного сигнала, получаемого от FG. В некоторых вариантах осуществления электрические контуры FG и усилителя напечатаны на одной и той же печатной плате и размещены в электрическом корпусе, который отделен от остальных компонентов устройства **10** для генерирования EMF. В другом примере контуры FG и усилителя напечатаны на чипе управления контурами для миниатюризации электрических компонентов и улучшения портативности устройства. В некоторых вариантах осуществления, исходя из потребности в мощности, усиление может не требоваться, и выходная мощность генератора поля подается напрямую без усиления через контур усилителя.

[0053] Для инициирования излучения электромагнитного поля от устройства можно применять активатор **26**. Активатор может включать в себя переключатель однократного или многократного типа применения и может быть мгновенного или переменного действия. Приведение в действие активатора можно осуществлять различными способами, в том числе вручную пользователем, с помощью давления, света или электронного сигнала — либо дистанционно, либо непосредственно. Активатор **26** может быть представлен как часть пользовательского интерфейса **28**, через который пользователь управляет устройством для генерирования и приложения EMF. На пользовательском интерфейсе могут быть предусмотрены и другие переключатели и кнопки. Например, пользовательский интерфейс может иметь

дисплей, с помощью которого пользователь может вводить требуемый параметр поля, которое будет прилагаться, такой как настройка частоты, настройка продолжительности приложения поля, настройка мощности и т. д. На основе установленных пользователем входных значений, получаемых через пользовательский интерфейс **28**, можно корректировать одну или несколько настроек источника питания, FG и/или усилителя для создания EMF.

[0054] В некоторых вариантах осуществления устройство для генерирования EMF содержит контроллер, такой как микроконтроллер или другой вычислительный процессор, который функционально соединен с пользовательским интерфейсом и контуром FG. Контроллер может содержать машиночитаемые инструкции, которые могут выполняться с получением установленных пользователем входных значений через пользовательский интерфейс и корректировкой параметров контуров FG и/или усилителя на основе полученных установленных пользователем входных значений.

[0055] Устройство **10** для генерирования EMF дополнительно содержит пару электродов, а именно положительный электрод (**210**) и отрицательный электрод (**220**), которые функционально соединены с выходом усилителя **200** и FG **100**. Другими словами, мощность от FG **100** усиливается усилителем **200** перед подачей на электроды **210-220**. В вариантах осуществления, где усиление не требуется, мощность от FG **100** может подаваться непосредственно на электроды **210-220**, минуя усилитель **200**.

Питание, подаваемое от источника **24** питания, обеспечивает подачу первого электрического сигнала на положительный электрод и второго электрического сигнала на отрицательный электрод, где первый и второй электрические сигналы объединяются, создавая требуемое EMF с выбранной частотой в пространстве между электродами. В одном варианте осуществления электроды могут быть выполнены в виде проволочных электродов. В другом иллюстративном варианте осуществления пара электродов может быть выполнена в виде жестких поверхностей, определяющих конструкцию устройства, таких как параллельные металлические пластины с центральной проволокой, проходящей через пластину. Кроме того, часть пластин может быть изолирована. В другом примере электроды могут быть выполнены в виде изолированных стержневых электродов с удлиненной жесткой структурой, центральной проволокой из легированной стали и внешним изолирующим покрытием.

[0056] Электроды могут быть электрически соединены с положительной и отрицательной клеммами устройства. В частности, положительный электрод **210** соединен с положительной клеммой **310**, а отрицательный электрод **220** соединен с

отрицательной клеммой **320**. Положительная и отрицательная клеммы могут иметь жесткую поверхность. В одном примере положительная и отрицательная клеммы могут быть выполнены в виде параллельных металлических пластин, где расстояние между пластинами определяет границы полости **300**. При подаче питания от источника **24** питания на электроды в полости **300** между электродами **310, 320** создается требуемое EMF с выбранной частотой. Полость представляет собой место, где размещают растительный образец (твердый или жидкий) и где к растительному образцу прилагается EMF. В одном примере в случае, когда растительный образец включает в себя жидкую среду для культивирования растительных тканей, по меньшей мере одна из клемм может быть выполнена с возможностью контактирования со средой (например, по меньшей мере одна из электродных пластин кюветы может быть расположена так, чтобы она контактировала со средой, помещенной внутрь кюветы).

[0057] Расстояние между жесткими поверхностями положительной и отрицательной клемм может быть выполнено таким образом, чтобы полость имела определенную форму, размер или объем. В одном примере клеммы расположены таким образом и имеют такой размер, чтобы полость вмещала кювету стандартного размера (например, кювету для электропорации). В таком примере клеммы могут включать в себя электродные пластины кюветы для электропорации. В других примерах клеммы включают в себя электроды, встроенные в чашку Петри, так чтобы EMF можно было прилагать в полости, образованной чашкой Петри. Например, клеммы могут включать в себя матрицу электродов (например, матрицу игольчатых электродов), соединенную с чашкой Петри. В таком варианте осуществления верхняя пластина чашки Петри может содержать отверстия для размещения в них матрицы игольчатых электродов. Расположение матрицы игольчатых электродов в отверстиях и вокруг образца в чашке Петри позволяет прилагать по сути однородное электрическое поле ко всему образцу в чашке Петри. В еще нескольких других вариантах осуществления клеммы расположены так, чтобы полость вмещала химический стакан, колбу или другой контейнер.

[0058] В вариантах осуществления, где полость имеет такой размер, чтобы вмещать чашку Петри, а клеммы выполнены в виде двух электродных пластин, электродные пластины могут быть ориентированы параллельно и на противоположных сторонах полости, так чтобы один из электродов контактировал со средой, а другой электрод был отделен от среды пластиком или воздухом. В другом примере чашка Петри содержит две электродные пластины, ориентированные параллельно и на противоположных

сторонах полости, так что ни один из электродов не контактирует со средой, и оба электрода отделены от среды пластиком или воздухом.

[0059] В дополнительном варианте осуществления устройство может иметь резервуар, выполненный из изолирующей подложки или имеющий изолирующее покрытие. Резервуар может быть выполнен с возможностью помещения в нем кюветы или чашки Петри, в которой удерживается растительный образец и к которой прилагают EMF. Противоположные стороны резервуара могут быть соединены с электродами или клеммами устройства. Например, противоположные стороны поверхности резервуара могут иметь встроенные в них положительный и отрицательный электроды. Например, стержневые электроды могут иметь открытый сердечник на одном конце. Открытый сердечник положительного электрода может быть встроен в одну поверхность контейнера, тем самым определяя положительную клемму контейнера, а открытый сердечник отрицательного электрода может быть встроен в противоположную поверхность контейнера, тем самым определяя отрицательную клемму контейнера. В качестве альтернативы неизолированные электроды могут быть встроены внутрь противоположных поверхностей контейнера. В таком устройстве положительный электрод (210) соединен с положительной клеммой (310) контейнера, а отрицательный электрод (220) соединен с отрицательной клеммой (320). Растительная клетка, растительная ткань, зародыш растения или растение находятся в полости (300). В зависимости от требуемой реализации резервуар может иметь такую форму и размер, чтобы вмещать контейнер, в который помещен растительный образец. В качестве неограничивающих примеров, резервуар может иметь такую форму и размер, чтобы вмещать кювету, чашку Петри, химический стакан, колбу и т. д. Будучи помещенным в резервуар, контейнер, удерживающий растительный образец, удерживается в полости в плотном прилегании, а EMF прилагается к образцу через электроды, встроенные в поверхность резервуара.

[0060] В некоторых вариантах осуществления может быть предусмотрен индикатор, который выполнен с возможностью выдачи индикации того, что устройство для генерирования EMF активно и что в полости прилагается EMF. Индикатор в случае его наличия может включать в себя один или несколько из визуального индикатора, такого как светоизлучающий диод (LED), лампа или электролюминесцентный дисплей, звукового индикатора, такого как генератор шума, или тактильного индикатора, такого как вибратор. В различных вариантах реализации индикатор может иметь постоянный, прерывистый или импульсный сигнал.

[0061] В одном иллюстративном варианте осуществления индикатор может быть соединен с детектором электромагнитного поля в чипе управления контурами и указывать на наличие или отсутствие генерирования EMF устройством. Кроме того, индикатор может обеспечивать возможность измерения прилагаемого EMF. На **фиг. 2** показан альтернативный вариант осуществления устройства из **фиг. 1**, включающий осциллограф (**400**), функционально соединенный с полостью (**300**), для наблюдения и измерения EMF, присутствующего в полости (**300**). Это позволяет пользователю измерять EMF, воздействующее на растительную клетку, растительную ткань, зародыш растения или растение.

[0062] В некоторых вариантах осуществления устройство является портативным, что позволяет прилагать EMF к растению в поле. Например, электроды и клеммы могут быть расположены таким образом, чтобы растение в поле или часть растения в поле можно было поместить в полость устройства, а EMF с требуемой характеристикой приложить непосредственно к растению (или части растения). Например, устройство может быть выполнено с наличием резервуара, который можно разместить над початком кукурузы или вокруг него, за счет чего обеспечивается приложение EMF непосредственно к растению, растущему в поле.

[0063] В качестве неограничивающего примера устройство применяют для генерирования EMF с помощью электрического поля AC со значениями амплитуды от 1 В/см до 300 кВ/см и частоты повторения от 0,1 Гц до 100 Гц. Продолжительность приложения может составлять 24 часа или больше, или продолжительность приложения может составлять 4-6 часов.

ПРИМЕРЫ

[0064] Нижеследующие примеры предложены для иллюстрации, но не для ограничения заявляемого изобретения.

Пример 1. EMF, прилагаемое к культуре растительных клеток

[0065] Трансгенная линия клеток табака (*Nicotiana tabacum*) BY-2 была получена из Центра исследования биоресурсов RIKEN (epd.brd.riken.jp/en/). Данная линия клеток экспрессирует зеленый флуоресцентный белок ("GFP"), слитый с α -тубулином табака. См. F. Kumagai, et al., *Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY02 cells stably expressing GFP-tubulin: Time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells*, PLANT & CELL PHYS. 42: 723–732 (2001). При рассмотрении с помощью флуоресцентного микроскопа микротрубочки флуоресцируют и позволяют визуализировать

полимеризацию микротрубочек, в том числе, например, формирование нитей веретена деления и фрагмoplasta во время клеточного деления. Клетки ВУ-GT16 выращивали на модифицированной среде LS, дополненной 0,2 мг/л 2,4-D. Клетки выдерживали в темноте при 27°C на ротационном шейкере при 130 об./мин с субкультивированием с 7-дневными интервалами.

[0066] Для облегчения визуализации и повышения вероятности наблюдения множества клеток, проходящих митоз после S-фазы, клетки ВУ-GT16 были синхронизированы. Для этого 20 мл 7-дневной суспензионной культуры переносили в 14 мл среды ВУ-2 (рецепты указаны ниже в примере 4). К полученной суспензии добавляли 14 мкл афидиколина (5 мг/мл), и суспензию инкубировали в темноте в течение 24 часов при 25°C на ротационном шейкере при 130 об./мин. После инкубации афидиколин удаляли путем десятикратной промывки с помощью 16 мл стерильной среды ВУ-2. По окончании последней промывки клетки ресуспендировали в 16 мл свежей среды ВУ-2, и промывную суспензию возвращали в инкубатор. Клетки ВУ-2 достигают максимального митотического индекса через примерно восемь часов. Как правило, пиковое количество клеток с фрагмoplastами наблюдалось через примерно одиннадцать часов после промывки. Таким образом, было синхронизировано приемлемое множество клеток.

[0067] После промывки клеток от афидиколина клеткам давали возможность возобновить нормальные клеточные процессы в течение шести часов (т. е. клетки "освобождались"). Затем популяцию синхронизированных клеток подготавливали для помещения в устройство для генерирования EMF (**фиг. 1**). В этот момент 775 мкл культуры клеток помещали в кювету для электропорации с зазором 4 мм, которую удерживали на месте в полости устройства с помощью пластиковой рамки.

Пластиковая рамка была сконструирована так, чтобы она помещалась внутри полости устройства, и была создана с помощью 3D-печати. Рамка была сконструирована для размещения внутри полости таким образом, чтобы электроды (**210** и **220**) от усилителя (**200**) могли устойчиво контактировать с жесткими поверхностями металлических пластин (клеммами **310** и **320**), определяющих границы полости (**300**), которая в данном случае была выполнена с возможностью удержания кюветы (**фиг. 1**).

Функциональный генератор (**100**) подключали к усилителю и применяли для управления частотой (кГц) и напряженностью поля (эффективным значением В/см в кювете) у прилагаемого EMF. Необязательный осциллограф (**400**) также присоединяли к положительному электроду (**210**) в точке контакта с металлической пластиной (**310**) в

полости (**фиг. 2**). С помощью осциллографа отслеживали синусоидальное изменение EMF, прилагаемого к клеткам в кювете, в зависимости от времени.

[0068] В течение периода времени между часами 7 и 11 после митотического освобождения клеток к клеткам в кювете прилагали EMF (в течение общей продолжительности четыре часа). После приложения функциональный генератор (100) выключали, и клетки удаляли для окрашивания на жизнеспособность и наблюдения за фрагментами. Остальные клетки фиксировали в параформальдегиде для последующего наблюдения. См. **фиг. 3**.

[0069] Для определения того, при какой частоте или диапазоне частот митотические структуры ВУ-2 будут восприимчивы к эффектам EMF, проводили тесты частоты в парах с контролями. Контроли включали контроль "без обработки", когда EMF не прилагали в течение нескольких сеансов (см. столбец "Дата эксперимента"). Поскольку EMF генерировали посредством приложения напряжения AC, в некоторых тестах контроли включали приложение соответствующего напряжения DC. По завершении каждой обработки жизнеспособность клеток и количество фрагментов оценивали одновременно с помощью окрашивания трипановым синим и конфокальной микроскопии соответственно. В каждом случае окончательные данные затем нормализовали к контролю без обработки, где контроль считался жизнеспособным на 100% и имел максимально возможное количество фрагментов. Для получения дополнительного контекста обработки колхицином проводили после экспериментов с EMF, но таким же образом и с результатами, аналогичными полученным при обработках, проведенных с приложением EMF. Приложение EMF приводило к уменьшению количества фрагментов при частотах 250 и 275 кГц с минимальным влиянием на жизнеспособность клеток.

Таблица 1. Тестирование частоты

Частота (кГц)	Фрагменты (на 30 мкл покровного стекла)	Фрагменты (нормализованные к контролю)	Живые клетки (на 3 вертикальных столбца)	Мертвые клетки (на 3 вертикальных столбца)	Жизнеспособность (% живых)	Жизнеспособность (нормализованная к контролю)
225	50	41,7	508	48	91,4%	95,9%
250	12	2,4	728	78	90,3%	94,9%
250	25	4,2	782	136	85%	87,7%
250	12	2,6	625	114	85%	93,0%
275	9	1,2	765	156	83,1%	89,1%
275	22	3,3	986	223	82%	84,0%
275	14	3,5	634	183	78%	85,3%

Частота (кГц)	Фрагмо-пласты (на 30 мкл покровного стекла)	Фрагмопласты (нормализованные к контролю)	Живые клетки (на 3 вертикальных столбца)	Мертвые клетки (на 3 вертикальных столбца)	Жизнеспособность (% живых)	Жизнеспособность (нормализованная к контролю)
300	49	35,3	958	48	95,2%	102,2%
Без обработки	68	68,0	862	63	93,2%	100,0%
Без обработки	60	60,0	678	34	95,2%	100,0%
Без обработки	148	148,0	806	24	97%	100,0%
Без обработки	56	56,0	681	67	91%	100,0%
1,25 мМ колхицина	1	0,1				
1,25 мМ колхицина	7	0,9				
1,25 мМ колхицина	5	0,7				
Без обработки	19	19,0				
Без обработки	53	53,0				
Без обработки	34	34,0				
1,25 мМ колхицина			732	87	89,4%	112,4%
1,25 мМ колхицина			740	112	86,9%	94,1%
1,25 мМ колхицина			766	120	86,5%	95,4%
Без обработки			462	119	79,5%	100,0%
Без обработки			625	52	92,3%	100,0%
Без обработки			677	70	90,6%	100,0%

[0070] Из необработанных данных, полученных во время тестов частоты, представленных в таблице 1, выявляли значения и диапазоны частоты, в которых наблюдался значительный эффект обработки посредством EMF. Затем проводили дополнительные испытания при выявленных частотах. Дополнительные испытания включали эксперименты, проводимые на нескольких наборах при заданных настройках частоты, а затем результаты усредняли (таблица 2). Анализ результатов демонстрировал сходное значительное уменьшение количества фрагмопластов при обработках посредством EMF при частотах 250 и 275 кГц по сравнению с необработанным контролем "без EMF". Также было обнаружено, что результаты обработок посредством EMF аналогичны результатам, полученным при обработках колхицином. Обработки посредством EMF также приводили к значительному снижению потери жизнеспособности клеток, тогда как с обработкой колхицином это не наблюдалось. Другими словами, клетки, обработанные колхицином, характеризовались более высокой потерей жизнеспособности по сравнению с клетками, обработанными EMF. Каждую группу сравнивали с контролями без обработки посредством EMF с

помощью t-критерия Стьюдента и сравнений, при этом обработка, которая приводила к значительному снижению количества фрагмопластов или жизнеспособности, отмечена звездочкой (таблица 2; * означает $p \leq 0,05$).

Таблица 2. Повторности частоты

n	Обработка	Среднее количество фрагмопластов (нормализованное)	Фрагмопласты, стандартное отклонение	Средняя выживаемость (нормализованная)	Выживаемость, стандартное отклонение
3	EMF 250 кГц	3,1*	1,0	87%*	3%
3	EMF 275 кГц	2,7*	1,3	81%*	3%
3	1,25 мМ колхицина	1,0*	0,5	101%	10%
7	Без EMF	62,6	41,2	100%	0%

5

[0071] Для определения минимальной напряженности поля, необходимой для наблюдения эффектов ингибирования митоза, характерных для прилагаемого EMF, значение В/см EMF-поля изменяли в дальнейших испытаниях с использованием той же экспериментальной установки, что и описанная ранее, но поддерживая постоянную частоту поля на уровне 275 кГц. Данные эксперименты не проводили в повторностях. Уменьшение количества фрагмопластов, наблюдаемое при напряженности поля 25 В/см, сохранялось при снижении напряженности поля до 22,5 В/см, но не при более низких значениях напряженности 12,5 В/см и 2,5 В/см. Однако более эффективные поля с более высокой напряженностью также вызывали большее снижение жизнеспособности клеток (таблица 3).

10

15

Таблица 3. Тестирование напряженности

Напряженность (В/см), во всех случаях при 275 кГц	Фрагмопласты (на 30 мкл покровного стекла)	Фрагмопласты (нормализованные к контролю)	Живые клетки (на 3 вертикальных столбца)	Мертвые клетки (на 3 вертикальных столбца)	Жизнеспособность (% живых)	Жизнеспособность (нормализованная к контролю)
2,5	66	53	456	44	91%	100%
12,5	69	58	634	49	93%	102%
22,5	6	1	561	89	86%	91%
25	22	3	986	223	82%	84%
Максимальная	6	1	302	99	75%	79%
Без EMF	82	82	790	79	91%	100%
Без EMF	36	36	692	35	95%	100%
Без EMF	148	148	806	24	97%	100%

[0072] Можно оценивать ряд параметров EMF для различных типов растительных клеток, растительных тканей или целых растений, поскольку эффективная частота и напряженность EMF для нарушения сборки микротрубочек и препятствования митозу могут варьироваться между типами клеток, типами тканей и даже видами растений.

20

Используемые в данном документе значения частоты и напряженности приведены в качестве иллюстрации для клеток табака и не являются ограничениями для применения на каких-либо конкретных видах растительных клеток или тканей. Например, у гаплоидного зародыша маиса может удваиваться число его хромосом в присутствии ЭМФ, имеющего другую частоту и напряженность, нежели проиллюстрированные в данном документе для культуры клеток табака. Кроме того, на удвоение числа хромосом также может влиять продолжительность приложения данного ЭМФ. Хотя надлежащее тестирование и может помочь оптимизировать результаты, данные принципы все равно остаются применимыми.

10 **Пример 2. Приложение ЭМФ к культуре клеток BMS**

[0073] Культуру клеток BMS получали и поддерживали в жидкой среде MS, дополненной 2 мг/л 2,4-D, как описано у Green and Phillips (1975). Через пять-семь дней после субкультивирования жидкую культуру клеток помещали в кювету для электропорации с зазором 0,4 мм и подвергали воздействию прилагаемого ЭМФ с частотой 275 кГц, напряженностью 25 В/см в течение продолжительности 18 часов при постоянном встряхивании при комнатной температуре для нарушения формирования нитей веретена деления и препятствования митозу. Для каждой обработки также ставили три других теста с той же культурой: (i) обработка посредством 1,25 мМ колхицина, (ii) культура без обработки в кювете для электропорации и (iii) культура без обработки, оставшаяся в колбе инкубатора. Данная продолжительность позволяет репликации ДНК проходить без клеточного деления, что тем самым вызывает удвоение числа хромосом.

[0074] Для измерения удвоения сразу после обработки культуру клеток готовили для анализа ядерной ploидности вначале путем выделения протопластов клеток в течение 3 часов в буфере для расщепления/промывки протопластов растений (Sigma-Aldrich D9692), содержащем 1% целлюлазу R-10 (GoldBio C8001.0001) и 0,1% мацерозим R-10 (GoldBio M8002.0001), при 25°C при встряхивании при 120 об./мин. После выделения протопластов клетки осаждали путем центрифугирования при 14000 об./мин в течение 1 мин в настольной микроцентрифуге, и пипеткой удаляли буфер для протопластов.

Затем клетки ресуспендировали путем пипетирования в 400 мкл буфера для экстракции ядер (Sysmex, буфер для экстракции ядер CyStain UV Precise P, 05-5002) и смешивали с 800 мкл раствора для окрашивания ядер (Sysmex, буфер для окрашивания CyStain UV Precise P, 05-5002). Затем окрашенные ядра пропускали через фильтр с размером пор 30 мкм (Sysmex, нестерильный фильтр CellTrics, зеленый, 04-0042-2316) в кювету для

сбора, и фильтр прополаскивали дополнительными 800 мкл раствора для окрашивания ядер. Затем кювету загружали в анализатор плоидности Sysmex (анализатор плоидности CyFlow, оснащенный UV-LED-лазером, работающим при 365 нм), и получали данные для всего образца. Необработанная культура клеток BMS обычно имеет 2-3 пика плоидности, что согласуется с тем, что большая часть клеток находится в стабильном состоянии плоидности (пик 1), а меньшая часть клеток находится в процессе митоза и имеет состояние двукратного превышения стандартной плоидности (пик 2). После обработки в поле в культурах неизменно обнаруживались 3-4 пика плоидности, указывающие на присутствие клеток с более высокими уровнями удвоения геномов (пики 3 и 4). Увеличение доли клеток, представленных в пиках более высокого уровня (3 и 4), было связано с уменьшением количества клеток в пиках более низкого уровня (1 и 2), что является прямым свидетельством того, что обработка в поле приводила к удвоению геномов клеток, перемещая их из пиков 1 и 2 в категорию пиков 3 и 4 (таблица 4). Для определения того, было ли данное изменение в относительных долях уровней плоидности культур клеток статистически значимым, данные из восьми экспериментальных повторностей усредняли, а значения сравнивали с помощью парных t-критериев (таблица 5 и таблица 6). Данные анализы отчетливо демонстрируют, что как колхицин, так и обработка в поле приводят к получению культур клеток со значительно большим количеством клеток с более высоким содержанием генома по сравнению с любым из необработанных контролей (колбой или кюветой), что является прямым свидетельством того, что, подобно колхицину, обработка в поле индуцирует удвоение генома в растительных клетках.

Таблица 4. Результаты анализа плоидности при обработках в поле суспензионных культур клеток BMS

Обработка	Доля клеток в каждом пике плоидности (%)			
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4
Поле 275 кГц	36,97%	58,65%	4,32%	0,06%
Поле 275 кГц	17,66%	60,96%	20,14%	1,24%
Поле 275 кГц	20,70%	61,69%	16,53%	1,08%
Поле 275 кГц	33,29%	53,21%	11,88%	1,62%
Поле 275 кГц	12,99%	61,95%	24,49%	0,57%
Поле 275 кГц	21,47%	57,69%	19,47%	1,37%
Поле 275 кГц	20,32%	62,98%	14,68%	2,02%
Поле 275 кГц	25,24%	64,97%	9,46%	0,33%

Обработка	<i>Доля клеток в каждом пике плоидности (%)</i>			
	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4
Колхицин	38,88%	57,77%	3,35%	0,00%
Колхицин	11,65%	59,12%	26,77%	2,46%
Колхицин	11,29%	74,64%	13,43%	0,64%
Колхицин	27,74%	57,21%	13,56%	1,49%
Колхицин	26,54%	57,50%	15,34%	0,62%
Колхицин	19,87%	58,10%	20,30%	1,72%
Колхицин	35,15%	54,88%	8,73%	1,23%
Колхицин	33,87%	53,99%	11,35%	0,79%
Необработанная кювета	53,80%	44,22%	1,98%	0,00%
Необработанная кювета	30,81%	51,51%	16,86%	0,82%
Необработанная кювета	33,59%	54,30%	11,59%	0,53%
Необработанная кювета	34,48%	52,37%	11,65%	1,49%
Необработанная кювета	27,26%	56,68%	14,53%	1,54%
Необработанная кювета	28,07%	52,88%	17,95%	1,10%
Необработанная кювета	41,06%	49,50%	8,26%	1,18%
Необработанная кювета	34,01%	54,59%	11,31%	0,08%
Необработанная колба	60,55%	37,60%	1,85%	0,00%
Необработанная колба	37,92%	47,60%	13,34%	1,14%
Необработанная колба	37,14%	53,08%	9,63%	0,16%
Необработанная колба	48,81%	45,40%	5,47%	0,32%
Необработанная колба	34,41%	51,12%	13,39%	1,08%
Необработанная колба	28,83%	51,84%	17,80%	1,53%
Необработанная колба	41,29%	47,97%	9,44%	1,30%
Необработанная колба	38,06%	51,53%	10,06%	0,35%

Таблица 5. Средние значения для 8 повторностей обработки в поле и контролей

Обработка	Средняя доля пика 1, %	Средняя доля пика 2, %	Средняя доля пика 3, %	Средняя доля пика 4, %
Поле 275 кГц	23,58%	60,26%	15,12%	1,04%
Колхицин	25,62%	59,15%	14,10%	1,12%
Необработанная кювета	35,39%	52,01%	11,77%	0,84%
Необработанная колба	40,88%	48,27%	10,12%	0,73%

Таблица 6. Парные t-критерии для сравнения между средними значениями для 8 повторностей (статистически значимые значения с использованием порога отсечения $p \leq 0,05$ обозначены *)

Т-критерии, пик 1	Поле 275 кГц	Колхицин	Необработанная кювета
Колхицин	0,5539		
Необработанная кювета	0,001*	0,0121*	
Необработанная колба	0,000*	0,0024*	0,0105*
Т-критерии, пик 2	Поле 275 кГц	Колхицин	Необработанная кювета
Колхицин	0,6833		
Необработанная кювета	0,0014*	0,0213*	
Необработанная колба	0,0002*	0,0029*	0,0033*
Т-критерии, пик 3	Поле 275 кГц	Колхицин	Необработанная кювета
Колхицин	0,5804		
Необработанная кювета	0,0381*	0,0213*	
Необработанная колба	0,0064*	0,0441*	0,0836
Т-критерии, пик 4	Поле 275 кГц	Колхицин	Необработанная кювета
Колхицин	0,7028		
Необработанная кювета	0,3378	0,3213	
Необработанная колба	0,2057	0,1154	0,5857

Пример 3. Приложение ЕМФ к каллюсу маиса

[0075] Каллюсную ткань маиса получают, например, посредством способа, изложенного в Y. I. Dolgykh (1994) *Establishment of Callus Cultures and Regeneration of Maize Plant*, в: Bajaj Y.P.S. (eds) *Maize, BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY*, vol 25, Springer, Berlin, Heidelberg, doi.org/10.1007/978-3-642-57968-4_2, которая

5 включена в данный документ во всей своей полноте. Каллюсную ткань помещают в подходящий резервуар (иногда называемый средством для расположения), например, в кювету или чашку Петри, и подвергают воздействию прилагаемого EMF с частотой, напряженностью и продолжительностью, достаточными для нарушения формирования нитей веретена деления и препятствования митозу. Прилагаемая частота составляет от

10 1 кГц до 300 ГГц, или от 10 кГц до 1 ГГц, или от 100 кГц до 500 кГц. Напряженность прилагаемого EMF составляет от 0,5 В/см до 100 В/см, или от 1,0 В/см до 50 В/см, или от 2,5 В/см до 25 В/см. Продолжительность представляет собой период времени, достаточный для предотвращения митоза в достаточном количестве клеток зародыша. Продолжительность приложения EMF может составлять по меньшей мере 24 часа, или

15 по меньшей мере 12 часов, или по меньшей мере 8, или по меньшей мере 6 часов, или по меньшей мере 4 часа, или по меньшей мере 2 часа, или по меньшей мере 1 час, или по меньшей мере 30 минут. Данная продолжительность позволяет репликации ДНК проходить без клеточного деления, что тем самым вызывает удвоение числа хромосом.

Пример 4. EMF, прилагаемое к растительным тканям, в том числе к зародышам и микроспорам

20

А. Гаплоидные зародыши маиса

[0076] Гаплоидные зародыши маиса получают через несколько дней после опыления ("DAP"). Сбор можно производить через 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 DAP, но предпочтительно его производят в период от 4

25 до 20 DAP. Сбор можно производить вручную или с помощью устройства. См., например, патент США № 8980632 (включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и патент США № 9648814 (включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0077] Собранный зародыш маиса помещают в среду для культивирования

30 растительных тканей, такую как среда Мурасиге-Скуга (среда "MS"), или среда Чу и др. (среда "N6"), или среда Гамборга и др. ("B5"), или другие смеси солей для тканевых культур, или раствор для гидропоники (Хогланда), содержащий источники углеводов (например, сахарозу, мальтозу и т. д.). Они способствуют быстрому прорастанию, росту и развитию образующихся сеянцев. Кроме того, можно включить один или

несколько растительных гормонов из группы цитокининов (например, кинетин, зеатин, 6-бензиламинопурин, тидиазурон), или ауксинов (например, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту, альфа-нафталинуксусную кислоту, индол-3-масляную кислоту или индол-3-уксусную кислоту), или гибберелловых кислот (например, GA3) или различные комбинации растительных гормонов в среде для культивирования растений на заданные периоды времени для оказания влияния на клеточное деление в апикальной меристеме побега или для усиления роста и развития образующегося сеянца.

[0078] Гаплоидные зародыши можно идентифицировать по наличию или отсутствию пигментации, вызванной цветовым маркером, например, антоциановым маркером R1-Navajo и другими подобными маркерами (R1-scm122, R1-scm2, R1-scm:3, R1-scm, R1-mb (мраморный алейрон), R1-r:стандарт, R1-Randolph, R1-ch:Stadler, R1-d:Catpaw, A, C, R1-d:Arapaho, R1-nj, (R1-nj:Cudu), (R1-nj:Chase), R1-sc:124, R1-sup-R1-подавляемый, R1-K10-11;R1 M-X1, R1-ch, R1-g, R1-lsk, R1-r, R1-sc122, R1-sc*5691, R1-sk:nc-2, R1-sk, R1-st и т. д. и другие, известные из уровня техники). См., например, V. Chaikam et al., *Analysis of effectiveness of R1-nj anthocyanin marker for in vivo haploid identification in maize and molecular markers for predicting the inhibition of R1-nj expression*, THEOR. APPL. GENET. 128(1):159–71 (2015). В качестве альтернативы другие антоциановые маркеры обеспечивают возможность идентификации гаплоидов на стадии сеянцев по наличию или отсутствию пигментации в корнях 3-5-дневных сеянцев. См. Turnov and Zavalishina, DAN 276:735-738 (1984). В зависимости от того, какой из ряда известных генов, регулирующих экспрессию антоцианов в ткани зародышевой оси и щитка, используется, пурпурная окраска зародыша будет появляться на разных стадиях зрелости семян и зародышей. Следовательно, не все антоциановые маркеры семян пригодны для способа идентификации на основе спасения гаплоидного зародыша, поскольку идентифицирующий цвет не виден на ранних стадиях развития зародыша. Гаплотипы антоциановых маркеров семян R1scm2, R1scm3, R1scm4 и R1sc122 дают пигментацию щитка в течение 24 часов после спасения зародыша у незрелых зародышей (12 DAP). Кроме того, интрогрессия гаплотипа антоцианового маркера R1scm2 в маис, являющийся индуктором гаплоидии, обеспечивает возможность идентификации гаплоидных зародышей к по меньшей мере 12 DAP и уже в 8, 9 или 10 DAP. Возможно, что некоторые из вышеперечисленных цветовых маркеров могут давать пигментацию щитка еще раньше.

[0079] После сбора гаплоидный зародыш кукурузы подвергают воздействию прилагаемого ЭМФ с частотой, напряженностью и продолжительностью, достаточными для нарушения формирования нитей веретена деления и препятствования митозу.

Прилагаемая частота составляет от 1 кГц до 300 ГГц, или от 10 кГц до 1 ГГц, или от 100 кГц до 500 кГц. Напряженность прилагаемого ЭМФ составляет от 0,5 В/см до 100 В/см, или от 1,0 В/см до 50 В/см, или от 2,5 В/см до 25 В/см. Продолжительность представляет собой период времени, достаточный для предотвращения митоза в достаточном количестве клеток зародыша. Продолжительность приложения ЭМФ может составлять по меньшей мере 24 часа, или по меньшей мере 12 часов, или по меньшей мере 8, или по меньшей мере 6 часов, или по меньшей мере 4 часа, или по меньшей мере 2 часа, или по меньшей мере 1 час, или по меньшей мере 30 минут. Данная продолжительность позволяет репликации ДНК проходить без клеточного деления, что тем самым вызывает удвоение числа хромосом.

[0080] Стадии спасения и прорастания зародышей. Незрелые зародыши аккуратно выделяют из стерилизованных початков и помещают в чашки Петри, содержащие среду для культивирования растительных тканей, описанную ранее. После идентификации гаплоидных зародышей и применения обработки для удвоения числа хромосом зародыши затем инкубируют в вегетационной камере (16-часовой фотопериод, 226 мкЭ/м^2 , 26°C) до стадии V3. Затем все проростки переносят в горшки, содержащие почву или беспочвенную смесь, и выращивают в вегетационной камере или теплице (16-часовой фотопериод, 226 мкЭ/м^2 , 26°C и 90% влажность) для закаливания в течение 1 недели. После этого проростки переносили в 5-галлонные горшки и выращивали в теплице (16-часовой фотопериод, 650 мкЭ/м^2 , дневная/ночная температура $30\text{-}20^\circ\text{C}$) до созревания.

25 **В. Микроспоры растений**

[0081] Собирают цветки с пыльниками на стадии одноядерных микроспор от средней до поздней и подвергают необязательной стрессовой обработке маннитом, солью, холодом или теплом, а затем стерилизуют в растворе этанола и гипохлорита натрия. Микроспоры высвобождают из пыльников посредством механического возмущения (например, в измельчителе), а затем извлекают с помощью серии стадий фильтрации и центрифугирования. См. патент США № 5322789 (поданный 21 декабря 1992 г.), включенный в данный документ посредством ссылки. Полученный изолят ресуспендируют в градиенте на основе мальтозы или другого сахара и подвергают дополнительному центрифугированию для отделения чистых микроспор. Эти

выделенные микроспоры затем промывают, оценивают количественно и высевают в специализированные культуральные среды, например, как изложено в Zheng M.Y., Weng Y., Sahibzada R., Konzak C.F. (2003) *Isolated microspore culture in maize (Zea mays L.), production of doubled-haploids via induced androgenesis*, в: DOUBLED HAPLOID PRODUCTION IN CROP PLANTS, Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds). Springer, Dordrecht; doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_15, включенной в данный документ посредством ссылки, перед инкубацией в темноте. Часть данных культивируемых микроспор, которые успешно преобразовываются в зародышеподобные структуры (ELS), перемещают на следующую стадию со средой для регенерации зеленых растений. ELS, из которых образуются зеленые растения, затем обрабатывают EMF-полями с получением двойных гаплоидных растений, из которых затем выращивают зрелые растения, самоопыляемые с получением семян. В качестве альтернативы проростки на стадии ELS обрабатывают посредством EMF для индукции удвоения генома. В качестве альтернативы выделенные микроспоры обрабатывают посредством EMF для индукции удвоения генома на ранней стадии — вскоре после выделения микроспор из пыльника. В качестве альтернативы вместо выделенных микроспор выделяют и культивируют целые пыльники в процессе, сходном с процессом для микроспор, и для индукции удвоения генома в процессе культивирования применяют обработку посредством EMF.

20 **Пример 5. Приложение EMF к сеянцам, молодым растениям или зрелым растениям**

[0082] Электроды от усилителя устойчиво контактируют с металлическими пластинами в полости, в данном случае небольшом пространстве, в которое может быть помещен стебель растения, содержащий апикальную меристему побега. 25 Функциональный генератор подключают к усилителю и применяют для управления частотой (кГц) и напряженностью поля (эффективным значением В/см в пространстве) у прилагаемого EMF. Необязательный осциллограф также присоединяют к положительному электроду в точке контакта с металлической пластиной в полости. С помощью осциллографа отслеживают напряжение EMF, прилагаемое к клеткам в 30 кювете. В пространство между электродами (в полость между металлическими пластинами) помещают часть растения, которая содержит вегетативные, пазушные или репродуктивные (меристемы соцветий) или цветковые меристемы, и прилагают EMF. Затем растение культивируют или выращивают до стадии цветения, а полученные цветки применяют для самоопыления или ауткроссинга. В данном примере растение

может быть гаплоидным растением или растением с более высокой ploидностью. Оно может быть межвидовым гибридом между двумя разными видами, или внутривидовым гибридом, или линией с добавочными хромосомами, или любым другим растением.

Пример 6. Конструкция устройства для генерирования EMF

5 **[0083]** Подробности об изолированных электродах. В некоторых примерах EMF можно прилагать посредством кондуктивной связи, когда электроды в кювете находятся в непосредственном контакте с суспензией клеток; однако это не обязательно должно быть именно так. EMF также можно прилагать с помощью емкостной связи, когда один или оба электрода не находятся в непосредственном
10 контакте с суспензией. Избегание прямого контакта электродов с суспензией позволяет снизить риск загрязнения образца вследствие высвобождения ионов из электродов в образец. Это также может содействовать обеспечению стерильности обрабатываемого образца, поскольку образец может быть закрыт от воздействия атмосферы. Применение емкостной связи позволяет уменьшить электрическое поле, которое достигает
15 биологической клетки, что может приводить к снижению интенсивности биологического эффекта и обуславливать необходимость увеличения прилагаемого напряжения по сравнению с прилагаемым выше к кювете. Емкостная связь может быть осуществлена путем размещения электродов на любой одной или обеих сторонах чашки Петри и приложения к ним EMF с целью индукции требуемого эффекта.

20 Достижение подачи электрического поля на образец, сходной с таковой при кондуктивной связи, может обуславливать необходимость приложения более сильных электрических полей и даже приложения их в виде импульсов длительностью от 10 нс до 1 мс, напряженности прилагаемого электрического поля от 1 В/см до 300 кВ/см, значений времени нарастания и спада от 0,5 нс до 5000 нс и частоты повторения от
25 0,1 Гц до 100 Гц в чашке Петри. Предыдущие расчеты продемонстрировали, что емкостная связь может обеспечивать снижение трансмембранного потенциала, индуцируемого прилагаемым полем, на вплоть до 3-5 порядков величины. В таких случаях трансмембранный потенциал становился биполярным, что означает, что биологические клетки, подвергаемые воздействию электрических импульсов при
30 емкостной связи, будут подвергаться воздействию электрического поля, сходному с описанным выше для EMF, но при этом будет требоваться гораздо более высокое прилагаемое напряжение.

[0084] Подробности о размещении игольчатых электродов. Лечение рака в условиях *in vivo* электрическими импульсами зачастую не позволяет применять стандартные

геометрические параметры параллельных пластин, что затрудняет достижение однородных электрических полей в обрабатываемых тканях. Вместо этого для достижения более равномерного распределения поля можно применять матрицы электродов "игольчатой" формы. Матрицу игольчатых электродов можно разместить вокруг каллюса или образца в чашке Петри с геометрическими параметрами, ориентацией и размещением игл, скорректированными для достижения равномерного распределения электрического поля.

[0085] Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, предназначены только для иллюстративных целей, и что в свете этого специалистам в данной области будут предложены различные модификации или изменения, и они должны быть включены в пределы сущности и содержания настоящей заявки и объема прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и заявки на патент, цитируемые в настоящем раскрытии, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

5

10

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ удвоения числа хромосом в растительной клетке, включающий:
- 5 а) приложение электромагнитного поля ("EMF") к растительной клетке и
б) обеспечение возможности нарушения митоза под действием EMF;
где в растительной клетке реплицируются ее хромосомы без
прохождения клеточного деления, за счет чего обеспечивается получение
растительной клетки с удвоенным числом хромосом.
- 10 2. Способ по п. 1, где EMF нарушает митоз путем нарушения формирования
нитей веретена деления.
3. Способ по п. 1, где EMF прилагают с эффективной частотой и
напряженностью в течение достаточной продолжительности приложения для
15 нарушения митоза в растительной клетке.
4. Способ по п. 1, где прилагаемое EMF характеризуется формой волны, и
где параметры прилагаемого EMF включают одну или несколько из частоты,
периодичности и амплитуды формы волны.
- 20 5. Способ по п. 3, где эффективная частота находится в диапазоне от 1 кГц
до 300 ГГц включительно.
6. Способ по п. 3, где достаточная продолжительность приложения выбрана
25 из группы, состоящей из (i) по меньшей мере продолжительности, эквивалентной
профазе митоза для растительной клетки; (ii) продолжительности, эквивалентной
полному циклу митоза для растительной клетки; и (iii) приблизительно 5 часов.
7. Способ по п. 6, где продолжительность, эквивалентная профазе митоза,
30 составляет примерно 25 минут для клетки маиса.
8. Способ по п. 1, где растительная клетка представляет собой клетку
однодольного или двудольного растения.

9. Способ по п. 8, где однодольное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, пшеницы, риса, сорго и ячменя.
10. Способ по п. 8, где двудольное растение выбрано из группы, состоящей из сои, подсолнечника, томата, табака, разновидностей тыквы, разновидностей капусты, салата латука, петунии, розы, каллиопы и лука.
11. Способ по п. 1, где растительная клетка представляет собой гаплоидную растительную клетку.
12. Способ по п. 1, где растительная клетка представляет собой меристематическую клетку.
13. Способ по п. 1, где растительная клетка представляет собой клетку-гамету.
14. Способ по п. 1, где растительная клетка содержится в образце ткани.
15. Способ по п. 14, где образец ткани представляет собой зародыш растения.
16. Способ по п. 14, где образец ткани выбран из группы, состоящей из цветка, початка, метелки, семянки, семени, зародыша и части любого из предыдущих, при условии, что образец ткани содержит жизнеспособные клетки.
17. Растительная клетка с удвоенным числом хромосом, полученная посредством способа по п. 1.
18. Растительная клетка с удвоенным числом хромосом по п. 17, где растительная клетка с удвоенным числом хромосом содержится в зародыше растения.
19. Растение, выращенное из растительной клетки с удвоенным числом хромосом по п. 17.

20. Потомок растения по п. 19.

21. Устройство для приложения электромагнитного поля к растительной клетке, содержащее полость для размещения образца, содержащего растительную клетку, контур для генерирования и усиления электромагнитного поля от энергии, 5 получаемой от источника питания, резервуар для удержания растительной клетки на месте в полости и пары электродов.

22. Устройство по п. 21, дополнительно содержащее осциллограф для измерения ЭМФ, прилагаемого к растительной клетке, и отображения показаний, представляющих измеренное ЭМФ. 10

23. Устройство по п. 21, где резервуар содержит пару электродов, и где пара электродов представляет собой первую пару противоэлектродов, расположенных 15 параллельно друг другу, где расстояние между парой противоэлектродов определяет границы полости для удержания растительной клетки.

24. Устройство по п. 23, где резервуар содержит изолированные электроды.

25. Устройство по п. 23, где резервуар содержит неизолированные электроды. 20

26. Устройство по п. 21, где резервуар представляет собой чашку Петри, содержащую полость и необязательно среду. 25

27. Устройство по п. 26, где чашка Петри содержит пару электродов, и где пара электродов представляет собой две электродные пластины, ориентированные параллельно и на противоположных сторонах полости, так что электроды контактируют со средой. 30

28. Устройство по п. 26, где чашка Петри содержит пару электродов, и где пара электродов представляет собой две электродные пластины, ориентированные параллельно и на противоположных сторонах полости, так что один электрод

контактирует со средой, и один электрод выполнен с возможностью отделения от среды пластиком или воздухом.

5 29. Устройство по п. 26, где чашка Петри содержит пару электродов, и где пара электродов представляет собой две электродные пластины, ориентированные параллельно и на противоположных сторонах полости, так что электроды выполнены с возможностью отделения от среды пластиком или воздухом.

10 30. Устройство по п. 26, где чашка Петри содержит матрицу игольчатых электродов, выполненных с возможностью размещения вокруг образца для создания однородного электрического поля.

15 31. Устройство по п. 30, где чашка Петри содержит крышку, и где игольчатые электроды проходят сквозь крышку.

32. Устройство по п. 21, где резервуар представляет собой кювету, содержащую полость и необязательно среду.

20 33. Устройство по п. 32, где кювета содержит пару электродов, и где пара электродов представляет собой две электродные пластины, ориентированные параллельно и на противоположных сторонах полости и выполненные с возможностью контакта со средой.

25 34. Устройство по п. 32, где кювета представляет собой кювету для электропорации.

30 35. Устройство по п. 21, где пара электродов представляет собой первую пару противоэлектродов, и устройство дополнительно содержит вторую пару противоэлектродов, ориентированных перпендикулярно по отношению к первой паре противоэлектродов.

36. Устройство по п. 35, дополнительно содержащее третью пару противоэлектродов, ориентированных перпендикулярно по отношению к каждой из первой пары электродов и второй пары электродов.

37. Способ получения двойной гаплоидной растительной клетки, включающий:

а) получение гаплоидной растительной клетки;

б) воздействие на гаплоидную растительную клетку электромагнитным полем ("EMF") и

в) обеспечение возможности нарушения митоза в гаплоидной растительной клетке под действием EMF;

вследствие чего в гаплоидной растительной клетке реплицируются ее хромосомы, но не происходит клеточное деление, за счет чего обеспечивается получение двойной гаплоидной растительной клетки.

38. Способ по п. 37, где EMF представляет собой поле AC с напряженностью прилагаемого электрического поля от 0,5 до 100 В/см и частотой от 1 кГц до 300 ГГц.

39. Способ по п. 37, где EMF характеризуется электрическим импульсом длительностью от 10 нс до 1 мс, напряженностью прилагаемого электрического поля от 1 В/см до 300 кВ/см, значениями времени нарастания и спада от 0,5 нс до 5000 нс и частотой повторения от 0,1 Гц до 100 Гц.

40. Двойная гаплоидная растительная клетка, полученная посредством способа по п. 37.

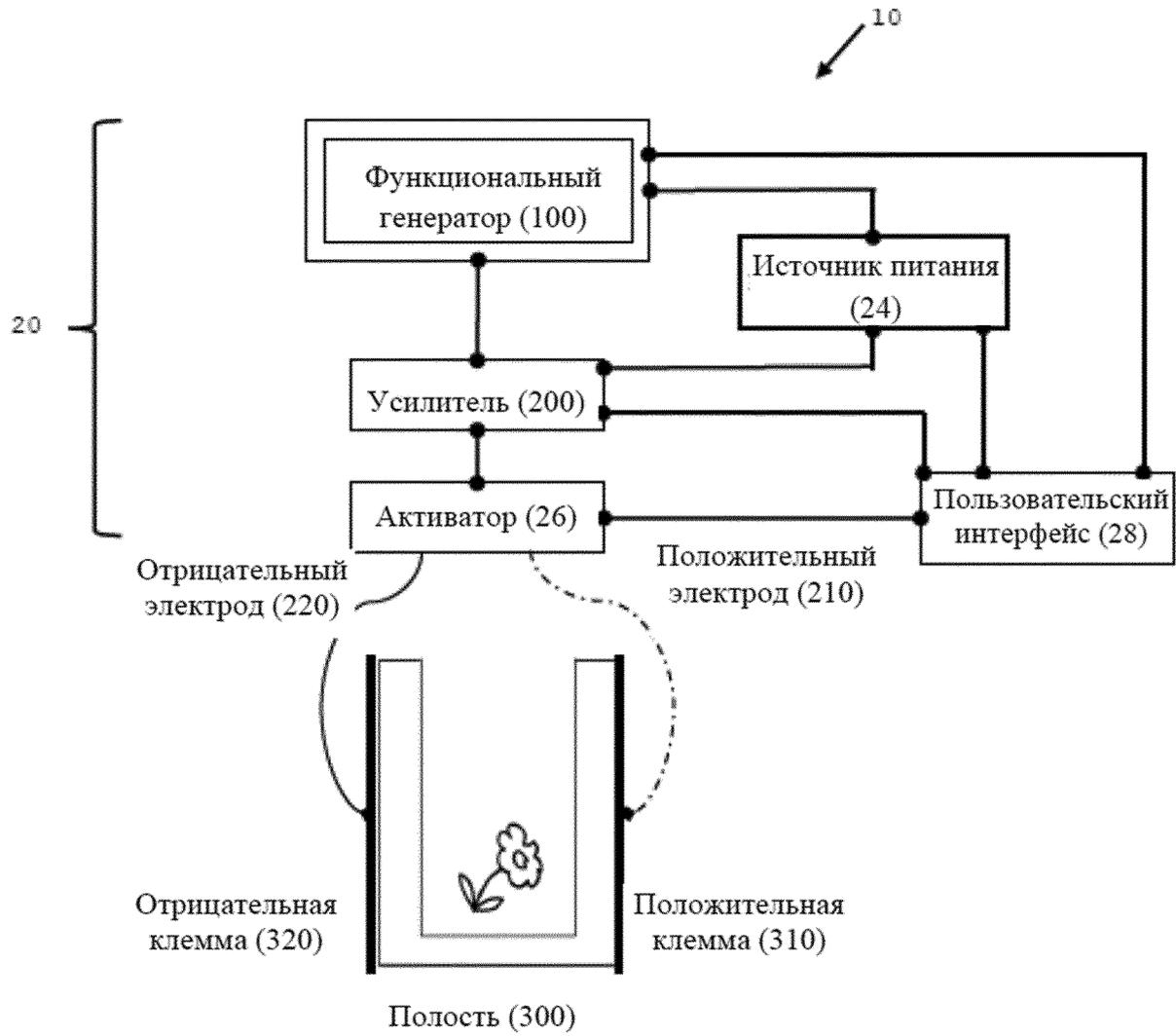
41. Двойная гаплоидная растительная клетка по п. 40, где растительная клетка содержится в зародыше растения.

42. Двойная гаплоидная растительная клетка по п. 41, где зародыш растения представляет собой зародыш маиса.

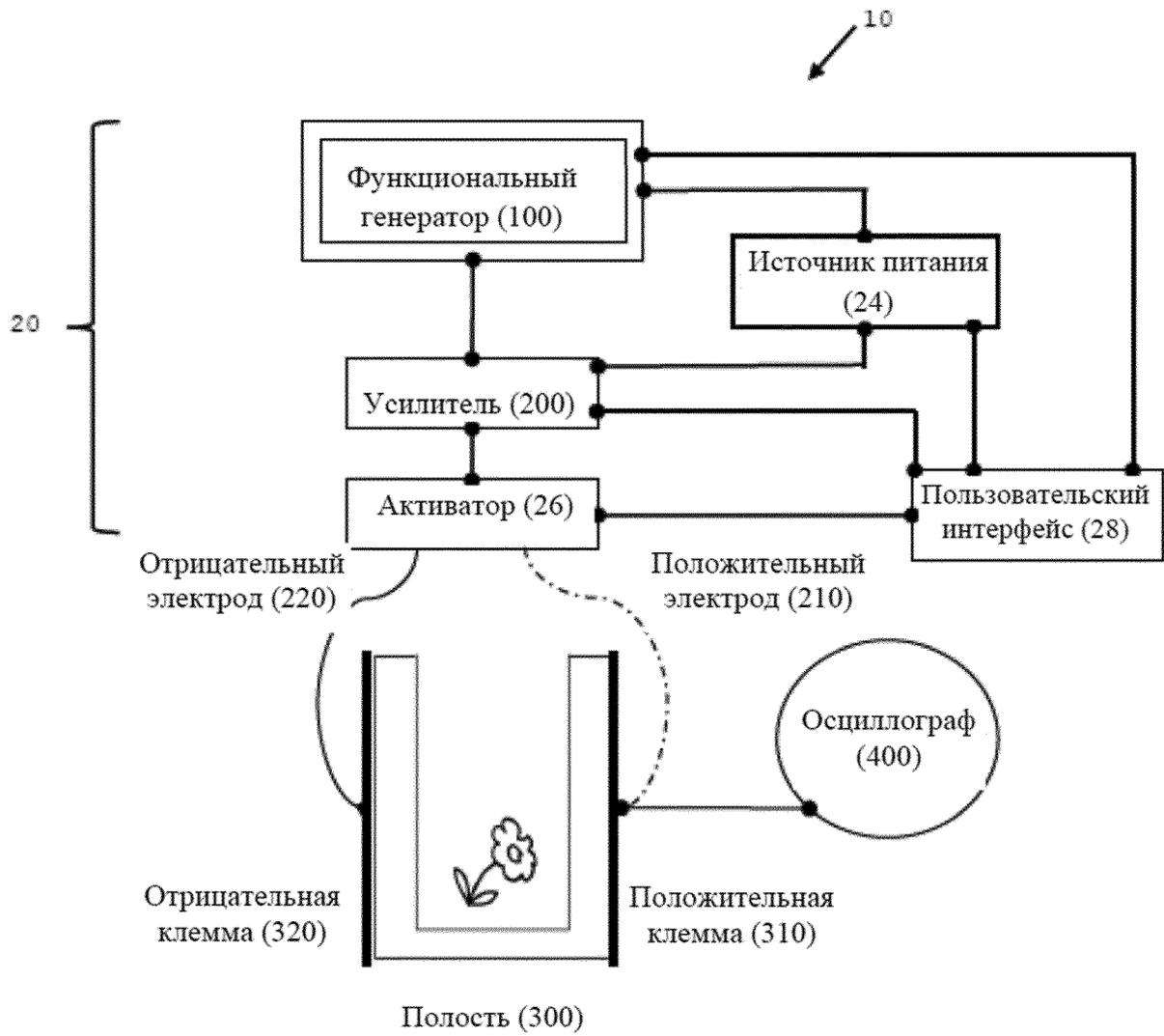
43. Двойная гаплоидная растительная клетка по п. 40, где растительная клетка содержится в микроспоре маиса.

44. Двойное гаплоидное растение, выращенное из двойной гаплоидной растительной клетки по п. 40.

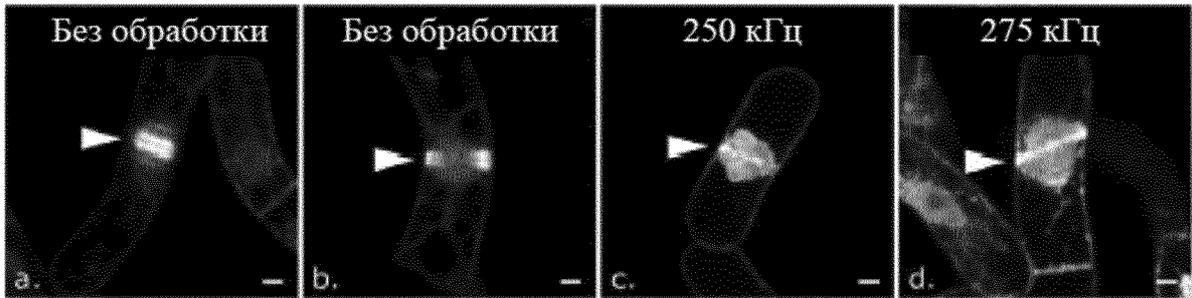
45. Потомок двойного гаплоидного растения по п. 44.



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3