

Винахід стосується способів одержання соняшникових рослин, їх частин та насіння, з якого одержують соняшникові рослини, що мають стійкість до *Orobancha cumana*.

Культивований соняшник (*Helianthus annuus* L.) вирощують як масляну культуру, важливість якої все більше зростає, в багатьох помірних, напівсухих регіонах світу.

Культивований соняшник — основне всесвітнє джерело рослинної олії. Масляні види соняшнику містять 40-48 процентів олії в насінні. Соняшникова олія цінується як їстівна олія через високий вміст ненасичених жирів та світлий колір. Соняшкову олію використовують для салатів, масла для жарки та для маргарину. Протеїновмісна соняшникова мука, одержана з насіння після екстракції олії, корисна як корм для великої рогатої худоби. Насіння як з олії, так і з кондитерських різновидів культивованого соняшнику корисне як корм для птахів.

Паразитична рослина *Orobancha* spp. або вовчак стала обмежуючим фактором для соняшникових культур в уражених країнах. Зменшення врожайності культур може досягнути 95% на інвазованих полях. Основні види *Orobancha*, що уражає соняшник, переважно включають *Orobancha aegyptiaca* Pers., *O. ramosa* L., *O. minor* Sm., *O. cumana* Wallr. and *O. cernua* Loefl.

O. cumana Wallr. and *O. cernua* Loefl. (альтернативна назва для однакових видів) - паразит соняшнику в східній Європі, розповсюджена в південній Європі. Понад декілька останніх років була загально помічена прогресія цих паразитичних рослин, їх поява в нових країнах, а також розвиток нових, більш небезпечних сортів. *Orobancha* представляють всесвітній ризик, а деякі види, такі як *O. minor*, з'явилися як екзотичні в Сполучених Штатах.

Починаючи з 1996 року, поява 3 нових сортів вовчаку була помічена на полях Туреччини, Іспанії та Болгарії. Біля 2000 року кількість уражених полів на цих територіях значно зросла. Деякі виробники припинили вирощувати соняшник через досвід значного зменшення врожайності.

Ці бур'яни викликані кореневими голопаразитами. Види *Orobancha* дуже важко викоринити, тому що за виключенням квітів, вони живуть в ґрунті; їх насіння миттєво та ефективно продукується, легко поширюється та дуже довго живе. Таким чином, гербіциди, що використовують на сьогодні для соняшнику, в загальному забезпечують недостатню боротьбу.

Інші засоби боротьби з *Orobancha* включають біологічні контролюючі агенти, усунення генів, що відповідають за стійкість *Orobancha* в соняшнику, і вирощування стійких ліній соняшнику.

Було повідомлено, що *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Orthoceras* може бути потенційним агентом у біологічній боротьбі з *Orobancha cumana* [Thomas-Heiko et al., Biological Control., Sept., 1998; 13(1):41-48]. Однак, застосовувати методи та постійні дози для польових умов все ще повинні бути визначені.

Ген Or3 забезпечує стійкість до нападів *Orobancha*, але відомо, що він є ефективним лише по відношенню до сорту С. Малоймовірні докази дещо більшої ефективності до п'яти сортів *Orobancha* надані в [Antonova, T. S. et al, Weed Research., 1996, 36(2):113-121].

Ідентифікація додаткових джерел стійкості до *Orobancha*, особливо до нових сортів, корисна при керуванні змінами сортів та виробничими втратами.

Винахід стосується композицій та способів одержання соняшникових рослин та соняшникових ліній, стійких до нових сортів *Orobancha cumana*, що включають схрещення першої вихідної соняшnikової рослини з другою вихідною соняшnikовою рослиною та збір урожаю з отриманого насіння, в яких першою вихідною рослиною є будь-яка лінія соняшнику, представлена АТСС депозитними номерами РТА-3792, РТА-3793 або РТА-3791.

Даний винахід стосується композицій та способів одержання соняшникових рослин та соняшникових ліній, що мають риси високоспадкової стійкості до *Orobancha*, отримані доборою та селекцією. Ці лінії корисні при вирощуванні комерційних культурних рослин соняшнику, що мають цінні агрономічні та якісні характеристики зерна та/або насіння.

Якщо не вказано інше, всі технічні та наукові терміни, що використовуються в описі, мають значення, що є зрозумілим для будь-якої особи, що має звичайні знання в галузі техніки, до якої відноситься даний винахід. Якщо не вказано інше, вживані або розглянуті в описі технологічні методи є стандартною методологією, добре відомою спеціалісту в даній галузі техніки. Матеріали, способи та приклади лише пояснені і не обмежені. Нижченаведене стосується пояснення і не має наміру обмежувати об'єму винаходу.

В контексті даного відкриття використовуватимуться ряд термінів. Для того, щоб забезпечити чіткість та послідовність розуміння подробиць та формули винаходу, включаючи рамки, надані цими термінами, приведені наступні визначення.

Терміни «вовчак», «*Orobancha cumana*», «*Orobancha cumana* Wallr», «*O. cernua* Loefl.» та «*O. Cumana*» використовуються альтернативно по відношенню до описаного паразитичного бур'яну та його сортів.

«Схрещення» (або «перехресне запилення») стосується перенесення пилку з однієї рослини на іншу.

«Цитоплазматична чоловіча стерильність» або («ЦЧС»): лінія соняшнику, яка не продукує життєздатний пилкок, називається чоловічою стерильною. Цитоплазматична чоловіча стерильність успадковується по материнській лінії, тобто чоловіча стерильна рослина використовується як жіноча вихідна рослина в схрещенні з пилком від іншого соняшнику. ЦЧС лінії одержують шляхом схрещення вміщуючої лінії з соняшnikовою рослиною з ознакою цитоплазматичної чоловічої стерильності і потім зворотнього схрещення до вміщуючої лінії, поки не почне розвиватись чоловіча стерильна лінія, гомологічна вміщуючій лінії в усіх інших відношеннях. ЦЧС лінії також вказані як жіночі лінії.

«Лінія» означає групу рослин, яка проявляє менше відхилень від індивідуальних рослин, як правило, в результаті декількох поколінь самозапилення. Також лінія може включати групу рослин, вегетативно поширених від однієї вихідної рослини, використовуючи методи культури клітин або клітин тканин.

«Рослина або частини рослин» стосуються клітин рослин, рослинних протопласт, тканин клітин, з яких соняшникові рослини можуть бути відновлені, рослинних каллі, груп пагонів рослин та клітин рослин, які непошкоджені в рослинах або частинах рослин, такі як зародки, пилкок, насінний зачаток, квіти, листя, оболочка, стебло, коріння, верхівки коріння, пильник, насіння або мука і тому подібне.

В цілях даного винаходу «стійкість до вовчаку (або *Orobanchе*)» визначено як генетично контрольовану властивість соняшникових рослин перешкоджати вовчаку прикріплюватися до соняшнику та заповнювати його життєвий цикл під час репродуктивного (насіннєсного) періоду. Сстійкість може бути результатом декількох відгуків на паразитів, включаючи, але не обмежуючись: (1) запобігання достатнього проростання насіння вовчаку, стимульованого соняшnikовою рослиною (прийнято, як хімічний кореневий екструдат); (2) блокування проникнення відростку вовчаку на поверхню соняшnikової рослини або (3) блокування зв'язку відростку вовчаку з судинною системою соняшnikової рослини.

«Нові» сорти *Orobanchе sumana* визначені як сорти, що не відносяться до сортів А-Е.

«Відновлююча лінія»: лінія, що володіє геном або генами для відновлення чоловічої родючості або життєздатного пилку у гібридного соняшнику або в отриманій від інбредних осіб лінії та потомства з материнською цитоплазмою, яка обумовила чоловічу стерильність.

Цей термін також розглянутий в літературі. Наприклад, Fick, «Breeding and Genetics», в *Sunflower Science and Technology* 279-338 (J. F. Carter ed. 1978), зміст якого включений в опис посиланням.

«Селекція» означає вибір бажаного фенотипу з широкої, генетично гетерогенної добірної групи, як правило, названої популяцією. Індивідуальні рослини з популяції відбираються за ознаками, пов'язаними з морфологією рослин, морфологією квітки; стійкістю до комах та хвороб, стиглістю та врожайністю.

«Різновид» або «культурний сорт рослин» стосується групи рослин з сортів (наприклад *Helianthus annuus*), які мають певні постійні характеристики, що відрізняють їх від інших типових форм та від інших можливих різновидів цього сорту. Не дивлячись на притаманну їм принаймні одну відмітну ознаку, «різновид» також характеризується значною кількістю всебічних варіацій серед індивідуумів з різновиду, що базується в основному на менделівському виділенні ознак серед потомства вдалого покоління.

Польові культури виводять методами, що переважають серед способів запилення рослин. Рослина є самозапиленою, якщо пилок з однієї квітки переноситься на цю ж або іншу квітку цієї рослини. Рослина є перехреснозапиленою у випадку, коли пилок переноситься з квітки на іншу рослину. Таким чином, термін «само» в програмі добору стосується самозапилення і термін «схрещена» означає рослину, запилену з іншої рослини.

Соняшники мають суцвіття корзинки зі стерильними променевими квітками і довершеними (що мають тичинку і маточку) в формі диску квітками. В диких умовах соняшник самостерильний або не здатний до самозапилення, тому це перехресно-запилена культура, запилення якої здебільшого залежить від медоносної бджоли. Більшість виробничих площ не мають достатньої популяції бджіл, здатних в достатній мірі заплити - культуру. Це має значення для селекціонерів при доборі для самосумісності або самозапиленні, що збільшує врожайність насіння, коли присутні декілька бджіл.

Соняшnikова добірна популяція повинна бути в основному гомогенна та відтворювана як для наступного добору, так і для розвитку комерційних культурних сортів рослин. Існує ряд аналітичних методів, придатних для визначення генотипної стабільності соняшnikової популяції.

Найдавнішим та самим традиційним методом аналізу є дослідження на фенотипні ознаки. Дані зазвичай збирають на полях на протязі життя досліджуваних соняшникових рослин. Фенотипні характеристики найчастіше перевіряють на ознаки, пов'язані з врожайністю насіння, вмістом олії в насінні, вмістом протешу в насінні, жирнокислотною композицією в олії, вмістом глюкозінолату в муці, характером росту, стійкістю до полягання, висотою рослини, стійкістю до опадання і т.д. Як правило, досліджують інші фенотипні характеристики, включаючи стійкість до хвороб, комах та стійкість до гербіцидів.

Було виявлено, що завдяки композиціям та способам даного винаходу можна створити соняшникові рослини через поєднання генетичних детермінантів соняшнику, які до того не були визнані можливими формувати нові лінії соняшників, стійкі до нових сортів *Orobanchе sumana*.

Декілька нових сортів *Orobanchе* були ідентифіковані на виробничих полях Туреччини. Набір гермплазм соняшнику був відібраний на полях Туреччини з наступних причин. Два типи стійких реакцій були ідентифіковані в джерелах диких сортів, схрещених з гермплазмою Піонера. Обидва виявили стійкість до нових сортів.

Одне джерело стійкості (Система 1), очевидно, діє шляхом перешкоджання проникнення відростків *Orobanchе* в кореневу систему рослини. Ця форма стійкості представлена в соняшnikовій лінії U00S9LM та ATCC Accession # PTA-3793.

Друге джерело стійкості, очевидно, діє шляхом затримання розвитку паразитичних паростків, які розвиваються на кореневій системі рослини, але до появи їх на рівні ґрунту. Ця форма стійкості представлена в соняшnikовій лінії 8556UG та ATCC Accession # PTA-3792.

Третій механізм поєднує джерела стійкості обох систем для створення більшої стійкості. Ця форма стійкості представлена в соняшnikовій лінії 01UL2365 та ATCC Accession # PTA-3791.

Композиції та способи даного винаходу можуть репродуктивно створити соняшникові лінії, які виявляють ознаки стійкості до *O. sumana* (вовчаку) по відношенню до фенотипних основ високої врожайності насіння, прискореного дозрівання, стійкості до засухи, стійкості до холоду, збільшеного вмісту протейну в насінні, модифікації складу амінокислотної композиції в насінні, карликовості, стійкості до опадання, стійкості до комах або хвороб, викликаних бактеріями, грибами або вірусами, або стійкості при гербіцидній обробці, які є додатньо стійкими при комерційному застосування. З протилежного боку, вихідні культурні сорти рослин виявляють значну мінливість в виявленні таких характеристик.

Для полегшення включення об'єднаних бажаних рис в програму добору ознака стійкості до *Orobanchе* повинна бути високоспадковою, тобто домінантною або напівдомінантною. Це підтверджується в даних заявлених композиціях та способах (див. Приклад 3).

Гібридне соняшnikове насіння типово продукується чоловічою стерильною системою, що включає генетичні або цитоплазматичні чоловічі стерильні (ЦЧС) спадкові риси. Рослини ЦЧС спадковості є чоловічо стерильними як результат факторів, що впливають з цитоплазматичності, як противага, ядру, геному. Таким чином, ця характеристика успадковується виключно через жіночу форму в соняшникових рослинах, оскільки

лише жіноча форма надає цитоплазму заплідненому насінню. ЦЧС рослини запліднюються з пилку від інших спадкових форм, які не є чоловічо стерильними. Пилок з другої спадкової форми може чи не здатний внести гени, що зроблять гібридні рослини чоловічі стерильними.

Цитоплазматичні чоловічі стерильні лінії традиційно виводять методом зворотнього схрещення, в якому бажані лінії, які піддавали добору та селекції в декількох поколіннях, схрещують спочатку з рослиною з цитоплазматичною чоловічою, стерильністю. Після цього перетворювану інбредну лінію використовують як, періодично повторювану форму в способі зворотнього схрещення. Кінцеве потомство, крім того, що буде стерильним, буде генетично подібне до періодично повторюваної форми.

Отриманий початковий матеріал даного винаходу може бути перетворений в цитоплазматичний чоловічий стерильний шляхом схрещення відібраного насіння з соняшниковими лініями, добре відомими з рівня техніки та загальною доступними, такими як CMS HA89 (USDA), що включають цитоплазматичну детермінанту для чоловічої стерильності. Основи CMS HA89 (USDA) є в матеріалі Leclercq, «Цитоплазматична стерильність соняшнику», *Ann. Amelior Plant* 19:99-106 (1969).

Фертильні відновлюючі лінії виводять шляхом перенесення домінантного відновлюючого гену до встановленої інбредної лінії зі звичайною цитоплазмою зворотнім схрещенням. Якщо використовувати цей метод, відібрані рослини повинні бути схрещені з цитоплазматичною чоловічою стерильною лінією після кожного покоління, для того, щоб визначити, чи присутні фертильні відновлюючі гени. Більш загальний метод - самозапилення та добір чоловічих фертильних рослин з комерційних гібридів або заплановане схрещення вихідних форм, які мають відновлюючі гени в чоловічій стерильній цитоплазмі. Цей метод не потребує тестового схрещення з чоловічою стерильною лінією при селекції, оскільки рослини будуть повністю чоловічі фертильними, якщо присутні необхідні відновлюючі гени.

Необхідна відновлююча лінія може бути одержана шляхом схрещення гермплазми згідно даного винаходу з будь-якою загальнодоступною відновлюючою лінією, такою як RHA274, RHA271, та RHA273 (USDA) або іншими лініями, що містять гени для відновлення чоловічої фертильності. Лінії та різновиди, отримані таким чином, з яких одержують насіння, що має стійкість до вовчаку, та які справжньо-виведене за, принаймні, фертильні відновлюючі гени, можуть надалі бути усунені тривалим самозапиленням та схрещенням зі стійкими до ЦЧС лініями, які попередньо були описані.

Даний винахід також стосується способів одержання F1 гібридного насіння схрещенням першої вихідної соняшникової рослини з другою вихідною соняшниковою рослиною, де перша вихідна соняшникова рослина вирощена з будь-якого насіння: лінії 01UL2365, представленої ATCC Accession # PTA-3791; лінії 8556UG, представленої ATCC Accession # PTA-3792; або лінії U00S9LM, представленої ATCC Accession # PTA-3793.

Даний винахід також стосується рослин, одержаних з F1 гібридного насіння, та клітин та інших частин цих рослин.

Використання чоловічих стерильних інбредних ознак - єдиний фактор при вирощуванні соняшникових гібридів. Розвиток соняшникових гібридів потребує в основному розвитку гомозиготних інбредних ліній, схрещення цих ліній та оцінку схрещень. Методи селекції на основі родоходу та періодично повторюваної селекції використовують для розвитку інбредних ліній з популяцій добору. Програми добору об'єднують генетичні середовища від двох чи більше інбредних ліній або різноманітних інших широкоосновних джерел в селекційних об'єднаннях, з яких розвиваються нові інбредні лінії шляхом самозапилення або селекції бажаних фенотипів. Нові інбредні форми схрещують з іншими інбредними лініями, а гібриди від цих схрещень оцінюють, щоб визначити, які з них мають комерційний потенціал.

Селекцію на основі родоходу загально використовують для удосконалення культур. Селекцію на основі родоходу починають зі схрещення двох фенотипів, кожен з яких може мати один або більше бажаних характеристик, які відсутні в інших або які доповнюють інші. Якщо дві первісні вихідні форми не забезпечують усіх бажаних характеристик, додаткові вихідні форми можуть бути включені в схему схрещення.

Ці вихідні форми схрещують простим або складним методом для одержання F1. F2 популяцію одержують, шляхом самозапилення однієї або декількох F1 або перехресним запиленням двох F1 (наприклад, схрещенням сибсів). Селекція найкращих індивідуумів може починатися з F2 популяції та, починаючи з F3 популяції, відбираються найкращі індивідууми з найкращих сімейств. Повторні дослідження сімейств (ліній) можуть починатися з F4 покоління для покращення ефективності селекції за ознаками з низькою спадковістю. Покращена стадія інбрідингу (наприклад, F6 та F7), найкращі лінії або суміші фенотипно подібних ліній, як правило, досліджуються на потенційне виділення як нові культурні сорти рослин.

Покращені різновиди можуть також бути виведені періодично повторюваною селекцією. Генетично різноманітні популяції гетерозиготних індивідуумів як ідентифікують, так і одержують перехресним схрещенням декількох, різних вихідних форм. Найкращі рослини відбираються на основі їх індивідуальних переваг, чудового потомства або гарної поєднуючої здатності. Відібрані рослини перехресно запилюють для виведення нової популяції, з якої продовжують наступні цикли селекції.

Метою програми розвитку комерційних соняшникових гібридних ліній є розвиток нових інбредних ліній, з яких одержують гібриди, що поєднують високу врожайність та високоякісну агрономічну продуктивність. Основний показник, необхідний селекціонерам - це врожайність. Крім того, багато інших агрономічних показників є важливими в гібридних комбінаціях та мають вплив на врожайність або, в іншому випадку, забезпечують високоякісну продуктивність в гібридних комбінаціях. Основні наміри при виведенні соняшнику включають покращену врожайність насіння, покращений процент олії в насінні або якість олії, прискорене дозрівання, менша висота рослин, однотипність рослин або стійкість до хвороб або комах. В доповнення до цього, лінії переважно мають прийнятну продуктивність для таких вихідних ознак, як врожайність насіння та продуктивність пилку, усі з яких впливають на здатність забезпечувати вихідним лініям необхідну кількість та якість гібридизації. Було показано, що ці риси знаходяться під контролем багатьох і багато, якщо не всі з цих ознак, викликані безліччю генами.

Не дивлячись на те, що технологічні прийоми стерилізації, включаючи використання ЦЧС детермінантів, можуть сприятливо застосовуватися при одержанні вихідних ліній та різновидів, стійких до вовчаку, а також

гібридів згідно даного винаходу, застосування таких прийомів не є передумовою виконання винаходу. Вихідні лінії та різновиди, використовуючи способи винаходу, можуть бути одержані маніпулюванням вихідних соняшникових матеріалів, використовуючи інші звичайні методи, основані на вдалій селекції та доборі, або новорозвинуті молекулярні наближення до змін генетичного вмісту рослин. В будь-якому випадку, одержання придатних вихідних ліній та різновидів згідно даного винаходу веде за собою усунення певної кількості мінливості, принаймні до величини значної кількості потомства, отриманих самозапиленням принаймні однієї вихідної форми насіння, що має ознаки стійкості до вовчаку.

Завдяки методам добору, покращена стійкість до *Orobance citrana* може поєднуватися або «укладатися» з будь-якої іншою бажаною насінневою, агрономічною ознакою або стійкістю до комах або хвороб. Приклади бажаних ознак включають, але не обмежуються, видозмінений профіль або віст олії в насінні, висока врожайність насіння, модифікація композиції амінокислотного складу в насінні, карликовість, стійкість до осипання, стійкість до комах або хвороб, викликаних бактеріями, грибами, вірусами або стійкість до обробки гербіцидами.

Способи даного винаходу знаходять особливе застосування в програмах добору соняшникових ліній, стійких до сульфонілсечовинних гербіцидів. Було виявлено, що сульфонілсечовинні гербіциди є ефективними проти паразитичних бур'янів соняшнику, таких як повитиця та сортів *Orobance* [L. Garci-Torres et al. *Weed Research*, 1994, 34:395-402].

Даний винахід також стосується частин описаних тут рослин, включаючи клітини рослин, рослинні протопласти, культури тканини клітин рослин, з яких соняшникові рослини можуть бути регенеровані, каллі рослин, групи, пагонів рослин та клітини рослин, які непошкоджені в рослинах або частинах рослин, такі як зародки, пилок, насінний зачаток, квіти, листя, оболочка, стебло, коріння; верхівки коріння, пильник, насіння або мука і тому подібне.

Рослини, одержані відповідно до даного винаходу, можуть бути регенеровані з частин рослин, використовуючи відомі методи. З цих рослин надалі одержуватимуть насіння наступним самозапиленням.

Соняшникові рослини також можуть бути регенеровані, використовуючи культуру тканин та регенерацію. Культура різних клітин та тканин соняшнику та регенерація рослин з них відома спеціалісту в даній галузі техніки. Наприклад, виведення соняшнику з культури тканин описано в наступних посиланнях: Henderson et al, «Культура звичайного напливу на стеблі соняшнику» (1952), *Am. J. Bot.* 39:444-451; Levine, M, «Реакція волокнистого коріння культури тканин соняшнику та тютюну на сполуки для вирощування рослин» (1951), *Bot. Gaz.* 112:281-289; Henrickson, C.E., «Цвітіння соняшникового експлантату в асептичній культурі» (1954), *Plant Physiol.* 29:536-538; Sadhu, M. K. «Дія різних ауксинів на ріст та диференціацію в тканині напливу серцевини стебла соняшнику» (1974), *Indian J. Exp. Biol.* 12:110-111.

Насіння рослин даного винаходу може використовуватися для одержання рослинної олії та муки. Насіння цих різновидів, рослини, вирощені з такого насіння, гібридні соняшникові рослини, вирощені шляхом схрещення цих різновидів з іншими видами, отримане гібридне насіння та різні частини гібридної соняшникової рослини можуть бути використані при одержанні їстівної рослинної олії або інших харчових продуктів відповідно до відомих методів.

Насіння соняшнику упаковане в захисну лушпайку, яку необхідно облущити перед екстракцією олії та наступною обробкою. Більшість сучасних заводів обладнані для переробки соняшнику спеціальним обладнанням для лушення, хоча насіння може бути подрібнене менш ефективно в своїй масі з лушпайкою. Більшість заводів Сполучених Штатів по переробці соняшнику використовують поєднання гвинтового пресу та розчинника екстракції при виділенні олії. Виявлено дуже ефективний спосіб видалення олії з насіння, який залишає все, крім близько 1% олії в отриманому рослинному матеріалі.

Неочищена соняшникова олія надалі обробляється для застосування її в харчових продуктах. Очистка зменшує вміст вільних жирних кислот та зменшує побічні включення. Процес відбілювання забезпечує видалення пігментів, що призводять до проблем. Пристосування до зимових умов заключається в поступовому заморожуванні олії таким чином, що як салатна олія, вона може витримувати зберігання в холодильнику без потемніння. Дезодорування видаляє залишки включень для досягнення смаку та запаху олії. Коли їстівна олія вказана як RBD, її піддавали при обробці операціям очистки, відбілення та дезодорування.

Отриманий твердий помелений компонент з насіння може бути використаний як поживний корм для великої рогатої худоби. Соняшникова мука - побічний продукт обробки соняшникової олії з високим вмістом протеїну. Її використовують в основному додатково до корму для великої рогатої худоби для підвищення рівня протеїну та як заміник соєвої муки. Немає жодних токсичних факторів та дуже низький рівень антипоживних факторів (таких як інгібітори трипсину), які потребують додаткової обробки. Це четверте найбільше джерело муки з насіння масляної культури. Якість протеїну в муці з насіння соняшнику висока: вона має значний амінокислотний індекс 68, який сприятливо порівнюється з соєвою мукою і має обмеження лише в лізіні.

Наступні Приклади представлені як специфічна ілюстрація заявленого винаходу. Крім того, слід розуміти, що винахід не обмежується особливостями, що містяться надалі в Прикладах.

Примітка:

1) Літнім місцезнаходженням розсаднику були Ахметбей, Люлебургаз, Кіркарларі, Туреччина. Дослідження на цих розсадниках проводилися в умовах масової штучної інвазії насінням нового(-их) сорту(-ів) *Orobance citrana*, зібраним на природних масово інвазованих полях.

2) «Масова інвазія» або «масово інвазований» означає ураження новим(-и) сортом(-ами) *Orobance citrana*, здатним (-и) зменшити врожайність чутливих соняшникових ліній до 80-100%.

3) Зимові місцезнаходження соняшнику були Ката, Каліобія, Єгипет, на полях, повністю вільних від інвазії *Orobance citrana*.

4) Природньо та масово інвазовані поля були локалізовані в Текке кой, Малкарі, Текірдазі, Туреччина.

5) Стійкість до вовчаку визначають (при доборі в полі) безпосередньо перед збором врожаю, рахуючи кількість соняшникових рослин, вільних від інвазії вовчаком в радіусі 50см навколо кожної рослини.

6) Чутливі індивідууми мали багато виниклих та/або прикріплених паростків вовчаку. Ніяких проміжних видів стійкості не було винайдено. Чутливі рослини показали різну ступінь інтенсивності нападу.

Приклад 1:

Добір за стійкістю Системи 1 в камерах вирощування.

165 проб соняшникового насіння (165 індивідуальних головок) з припущеною стійкістю до нових сортів О. Сутапа були зібрані на інвазійних полях в Трейсі, Туреччина. Насіння, отримане випадковими схрещеннями в диких умовах гермплазми Піонера, вирощували в Вудланді, Канада.

Соняшникове насіння було посаджене в 5 горщиках в суміші піску та ґрунту (1:1), які були уражені насінням нових сортів О. Сутапа, в концентрації 100г/1кг. Соняшникове насіння було посаджене в розрахунку 10 соняшникових насінин/горщик. Рослини вирощували в камері вирощування при 25°C при постійному освітленні. NPK-вмісне добриво додавали один раз на протязі росту. Через 75 днів півля посіву рослини видаляли з горщиків, кореневу систему промивали та записували кількість стійких рослин на горщик. Отримане насіння цих проб використовували в дослідженнях при польовому доборі.

Приклад 2:

Селекція рослин за стійкістю Системи 2

В результаті відсіювання в вирощувальній камері, насіння головок, яке показало розділення за стійкістю, було посаджено як F1 насіння в наступних літніх розсадниках. Насіння нових сортів О. Сутапа, зібрані з природньо інвазованих заново поміченими сортами вовчаку. Це були поля, на яких попередня врожайність соняшникових культур була зменшена до приблизно 80-100% внаслідок нападів нових сортів вовчаку. Відсіювання проводились, використовуючи рандомізований блочний пристрій з 2 копіями на кожен гібрид. Стійкість до вовчаку визначали безпосередньо перед збором врожаю, рахуючи кількість соняшникових рослин, вільних від інвазії вовчаку в радіусі 50см навколо кожної рослини. Стійкі рослини були видалені з землі для підтвердження відсутності будь-яких паростків вовчаку, які могли прикріпитися до кореневої системи під поверхню ґрунту.

а) Гібридні комбінації:

З цього F2 потомства 20 головок були відібрані за припущеною стійкістю та були проведені індивідуальні схрещення (головка да головки) з 4 різними чутливими жіночими вихідними лініями з метою створення досліджуваних гібридів:

Добір досліджуваних схрещень та нових гібридів для досягнення стійкості до нових сортів вовчаку проводився на протязі декількох років в Ахметбеї, Люлебургаз-Кірклабі, Туреччина, на полях, природньо та масово інвазованих заново поміченими сортами вовчаку. Це були поля, на яких попередня врожайність соняшникових культур була зменшена до приблизно 80-100% внаслідок нападів нових сортів вовчаку. Відсіювання проводились, використовуючи рандомізований блочний пристрій з 2 копіями на кожен гібрид. Стійкість до вовчаку визначали безпосередньо перед збором врожаю, рахуючи кількість соняшникових рослин, вільних від інвазії вовчаку в радіусі 50см навколо кожної рослини. Стійкі рослини були видалені з землі для підтвердження відсутності будь-яких паростків вовчаку, які могли прикріпитися до кореневої системи під поверхню ґрунту.

Селекція для досягнення стійкості та тестові схрещення продовжувалися в масово природньо інвазованих полях до F1 покоління. З цієї точки зору було визначено, що F1 лініям притаманні стійкість, родючість, постійний вміст олії та відсутність осипання насіння.

б) Інбредні лінії та добірні гермплазми:

З F2 селекцій F3 насіння висаджують в літніх розсадниках.

Добір нових джерел добору гермплазм та інбредних ліній для досягнення стійкості до нових сортів вовчаку проводився на протязі декількох років в Ахметбеї, Люлебургаз-Кірклабі, Туреччина. Літні добірні розсадники були штучно, уражені насінням нових сортів О. Сутапа, яке було зібране на природньо масово інвазованих полях. Інвазію ґрунту розсадників повторювали кожен рік. Відсіювання здійснювали, висаджуючи 15 рослин в 4-метрові ряди для кожної селекції добірної гермплазми та інбредних ліній. Стійкість до вовчаку визначали безпосередньо перед збором врожаю, рахуючи кількість соняшникових рослин, вільних від інвазії вовчаку в радіусі 50 см навколо кожної рослини. Стійкі рослини були видалені з землі для підтвердження відсутності будь-яких паростків вовчаку, які могли прикріпитися до кореневої системи під поверхню ґрунту.

Ця лінія представлена ATCC номером РТА-3793.

Приклад 3

Дослідження спадковості Системи 1

Гібриди були створені між стійкими та чутливими інбредними лініями з метою одержання популяцій для дослідження їх спадковості. Ці дві популяції були наступними:

а) U9605LF (чутлива)/U00T3LM (стійка).

б) U9612LM (чутлива)/U00Z0LM (стійка).

F2 популяція U9605LF/U00T3LM та її F1 зворотньо схрещений гібрид були розсаджені на масово та природньо інвазованих насінням; нових сортів вовчаку полях. 5 реплікацій кожної з 250 рослин були розсажені в Текке кой; Малькарі, Текірдагу, Туреччина.

F2 популяція U9612LM/U00Z0LM була розсаджена на тих самих полях Туреччини в 4 реплікаціях (250 рослин кожна) та інші 526 рослин тієї ж популяції були висаджені на природньо інвазованих полях Ла Карлоти, Кордори, Іспанія.

Як показано нижче в таблиці, F2 рослини двох популяцій розподілили 3:1 стійкість-до -чутливості, в той час як F1 зворотньо схрещені гібриди розподілили 1:1 стійкість-до-чутливості., демонструючи, що стійкість до нових сортів за Системою 1 контролюється одним домінантним геном.

Дані, зібрані при дослідженні спадковості:

I. F2 популяція U9505LF/U00T3LM та її F1BC1

F2		
№	Стійкі росл.	Чутл. Росл.
1	180	61
2	179	57
3	176	65

4	178	61
5	184	60
Сума	897	304,
Віднош.	2,95	1

F1BC1

№	Стійкі росл.	Чутл. Росл.
1	110	115
2	101	112
3	116	112
4	112	113
5	100	115
	539	569
	0,95	1

II. F2 популяція U9612LM/U00Z0LM

Туреччина

№	Стійкі росл.	Чутл. Росл.
1	171	55
2	168	70
3	163	56
4	188	60
Сума	690	241
Віднош.	2,86	1

Іспанія

№	Стійкі росл	Чутл. Росл
	393	133
	2,95	1

Приклад 4:

Селекція та польовий добір рослин зі стійкістю Системи 2

Стійкість Системи 2 була винайдена з гермплазми колекції Фрімана Джонсона (купленої Піонером). Це джерело було використане для розведення з інбредних ліній Піонера.

Матеріали були отримані з Вудланду, Канада. Вони були позасаджені як F3 насіння на літніх розсадниках (Ахметбей, Люлебургаз, Кіркларлі, Туреччина). Стійкі рослини були відібрані, зібраний врожай, а їх насіння позасаджене в зимових розсадниках. З F4 рослин близько 20 головок було відібрані та схрещені головка до головки з U9605LF (чутлива жіноча інбредна лінія) для одержання досліджуваних гібридів.

а) Гібридні комбінації:

Добір досліджуваних схрещень та нових гібридів для досягнення стійкості до нових сортів вовчаку проводився протягом декілька років в Текке кой, Малькарі, Текірдагу, Туреччина, на полях, природньо та масово інвазованих заново поміченими сортами вовчаку. Це були поля, на яких попередня врожайність соняшникових культур була зменшена до приблизно 80-100% внаслідок нападу нових сортів вовчаку. Добір був виконаний, використовуючи рандомізований блочний пристрій з 2 копіями на кожен гібрид. Стійкість до вовчаку визначали безпосередньо перед збором врожаю, рахуючи кількість соняшникових рослин, вільних від інвазії вовчаку в радіусі 50см навколо кожної рослини. Стійкі рослини були видалені з землі для підтвердження відсутності будь-яких паростків вовчаку, які могли прикріпитися до кореневої системи під поверхнею ґрунту.

Чутливі індивідууми мали багато виниклих та/або прикріплених паростків вовчаку та показали різну ступінь інтенсивності нападу.

б) Інбредні лінії та добір гермплазм:

Добір нових джерел добору гермплазм та інбредних ліній для досягнення стійкості до нових сортів вовчаку проводився протягом декількох років в літніх розсадниках в Ахметбей, Люлебургаз-Кірклабі, Туреччина. Розсадники були штучно заражені насінням нових сортів О. Сутапа, яке було зібране на природно масово інвазованих полях. Інвазію ґрунту розсадників повторювали кожен рік. Відсіювання здійснювали, висаджуючи 15 рослин в 4-метрові ряди для кожної селекції добірної гермплазми та інбредних ліній. Стійкість до вовчаку визначали безпосередньо перед збором врожаю, рахуючи кількість соняшникових рослин, вільних від інвазії вовчаку в радіусі 50 см навколо кожної рослини. Стійкі рослини були видалені з землі для підтвердження відсутності будь-яких паростків вовчаку, які могли прикріпитися до кореневої системи під поверхнею ґрунту.

Чутливі індивідууми мали багато виниклих паростків вовчаку. Чутливі рослини показали різну ступінь

інтенсивності нападу.

Приклад 5:

Полювий Добір та Селекція Гібридних Рослин з поєднанням стійкості за Системою 1 та Системою 2

Гібридні комбінації Системи 1 та Системи 2 були створені для збільшення стійкості проти будь-яких виниклих в майбутньому сортів вовчаку. Схрещення (01UL2365, представлене ATCC номером PTA-3791) було здійснено між U0170LF (Система 2, жіноча) та U00S9LM (Система 1, чоловіча). Гібриди були відібрані на полях Текке кой, Малькари, Текірдагу, Туреччина, природно та масово інвазованих новими сортами вовчаку. Це були поля, на яких попередня врожайність соняшникових культур була зменшена до приблизно 80-100% внаслідок нападів нових сортів вовчаку. Добір був виконаний, використовуючи рандомізований блочний пристрій з 2 копіями на кожне гібридне схрещення. Стійкість до вовчаку визначали безпосередньо перед збором врожаю, рахуючи кількість соняшникових рослин, вільних від інвазії вовчаку в радіусі 50см навколо кожної рослини. Жодної чутливої рослини цієї гібридної комбінації не було помічено. До близько 1-3% із цих стійких рослин були прикріплені мертві паростки вовчаку під землею, підтверджуючи прояву стійкості за Системою 2. Чутливі контрольовані рослини вмирали перед стадією цвітіння завдяки суровим нападам нових сортів вовчаку.