



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **120163**

(13) **C2**

(51) МПК

A01H 1/02 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

A01H 5/10 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 10077	(72) Винахідник(и):	Вайсманн Ельмар Альфонс (DE), Якобс Йохн (BE), Вайсманн Зіґрід (DE)
(22) Дата подання заявки:	17.03.2014	(73) Власник(и):	БАЙЕР КРОПСАЙЄНС АКЦІЄНГЕЗЕЛЛЬШАФТ, Alfred-Nobel-Strasse 50, 40789 Monheim am Rhein, Germany (DE), БАЙЕР КРОПСАЙЄНС Н.В., J.E. Mommaertslaan 14, B-1831 Diegem, Belgium (BE)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.10.2019	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	13159765.0	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 3842538 A, 22.10.1974 US 6005167 A, 21.12.1999 US 2011/232247 A1, 29.09.2011 WO 2012/038350 A1, 29.03.2012 CN 1442038 A, 17.09.2003 CN 102475055 A, 30.05.2012 CN 102948361 A, 06.03.2013
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	18.03.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.12.2015, Бюл.№ 23		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.10.2019, Бюл.№ 20		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2014/055249, 17.03.2014		

(54) СПОСІБ ВІДОКРЕМЛЕННЯ ГІБРИДНОГО НАСІННЯ ЯЧМЕНЮ, ВІВСА АБО ПШЕНИЦІ ВІД СУМІШІ НАСІННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу відокремлення гібридного насіння ячменю, вівса або пшениці від суміші гібридного насіння та інбредного насіння на основі відмінностей у розмірі насіння з вільнообмолочуваним фенотипом від насіння з вкритим лушпинням фенотипом.

UA 120163 C2

Даний винахід стосується галузі сільського господарства, більш конкретно – виробництва гібридного насіння та відокремлення гібридного насіння від суміші насіння з застосуванням способів відокремлення на основі відмінностей у фенотипі насіння, включеного до вищезгаданої суміші насіння. Відокремлення гібридного насіння відбувається, наприклад, на основі

відмінностей у розмірі, стані поверхні або питомій масі гібридного насіння порівняно з іншим насінням, включеного до суміші, наприклад, інбредного насіння.

Гібридні рослини вирощують для поліпшення характеристик одержаних в результаті рослин, таких, як поліпшена врожайність або стійкість врожайності, більша однорідність, поліпшений колір, стійкість до хвороб і т. ін. Нині виробництво гібридного насіння переважає у сільському господарстві та домашньому садівництві і є одним з впливових чинників значного зростання сільськогосподарського виробництва протягом другої половини XX століття. У США ринок комерційного гібридного насіння бере початок з 1920-х років, з першої гібридної кукурудзи. Усі зерна гібридного насіння, висіяні фермером, належать до одного гібриду, тоді як зерна від висіяних гібридів не завжди мають потрібні характеристики.

Гетерозис або гібридна сила (як у відомих F1 гібридах кукурудзи) трапляється у звичайній (гексаплоїдній) пшениці, але існують труднощі з виробництвом насіння гібридних сортів у комерційному масштабі (як це здійснюється для кукурудзи), оскільки квітки пшениці є двостатевими і зазвичай самозапилюються. Комерційне гібридне насіння пшениці було одержано з застосуванням засобів хімічної гібридизації; ці хімічні засоби вибірково перешкоджають розвитку пилку або природних систем цитоплазматичної чоловічої стерильності.

Гібридні рослини створюють шляхом схрещування запилювача з материнським матеріалом іншої лінії або сорту. У більшості випадків запилювач з чоловічою плодючістю також має жіночу плодючість, в результаті чого утворюється інбредне насіння додатково до гібридного насіння, утвореного на материнському матеріалі. У більшості способів виробництва ця проблема розв'язується шляхом висівання та збирання запилювача та материнського матеріалу у фізично відокремлених смугах або рядах. Однак врожайність гібридного насіння при такому смуговому висіванні є значно нижчою порівняно з врожайністю гібридного насіння при змішаному висіванні запилювача та материнського матеріалу. При плануванні поля, коли материнський матеріал та матеріал запилювача висівають змішаними міжряддями, одержують суміш гібридного та інбредного насіння. При відомих нині технологіях відокремлення двох різних типів насіння з метою одержання гібридного насіння з чистотою, більшою за 90%, є труднощом операцією. Застосування введених біотехнологічним шляхом фенотипічних маркерів (наприклад, флуоресцентного кольору насіння), яке дозволяє відокремлювати насіння без одержання фенотипу, видимого для виробника або споживача, зазвичай є неприйнятним. Таким чином, існує потреба у нових способах відокремлення гібридного насіння від інбредного насіння на основі природних особливостей. Ця проблема розв'язується завдяки даному винаходу.

Пояснення фігур

Фігура 1: Фенотипи зерен у злакових. Верхнє зображення (пшениця та овес): вільно обмолочуване насіння з розм'якшеним, легко відокремлюваним лушпинням (зліва) та насіння, що не піддається вільному обмолочуванню, зі стійким, щільно охоплюючим лушпинням (справа). Вільно обмолочуваний фенотип визначається материнською лінією. Нижнє зображення (ячмінь): вільно обмолочуване (голе) насіння (зліва) та насіння, що не піддається вільному обмолочуванню (вкрите) (справа); передбачається, що відсутність або наявність клейкої речовини, що виділяється з насіння (як показано стрілками) визначає вільно обмолочуваний фенотип.

Фігура 2: Успадкування обмолочуваності злаків (пшениця та овес), коли материнський матеріал є гомозиготним до одного або кількох домінантних вільно обмолочуваних (FT) алелів, а запилювач є гомозиготним до одного або кількох рецесивних вкритих лушпинням (h) алелів, і вільно обмолочуваний фенотип експресується по материнській лінії. Зібране насіння з поля для розмноження насіння F1 являє собою комбінацію вільно обмолочуваного гібридного насіння з материнського матеріалу та вкритого лушпинням інбредного насіння з запилювача, які можуть розділятися шляхом сортування, як вказано двосторонніми стрілками. Зерно F2, яке є результатом висівання гібридного насіння, усе є вільно обмолочуваним.

Фігура 3: Успадкування обмолочуваності злаків (пшениця та овес), коли материнський матеріал є гомозиготним для одного або кількох рецесивних вкритих лушпинням (h) алелів, а запилювач є гомозиготним до одного або кількох домінантних вільно обмолочуваних (FT) алелів, і вільно обмолочуваний фенотип експресується по материнській лінії. Зібране насіння з поля для розмноження насіння F1 являє собою комбінацію вкритого лушпинням гібридного насіння з материнського матеріалу та вільно обмолочуваного інбредного насіння з запилювача,

які можуть розділятися шляхом сортування, як вказано двосторонніми стрілками. Зерно F2, яке є результатом висівання гібридного насіння, усе є вільно обмолочуваним.

Фігура 4: Успадкування обмолочуваності злаків (пшениця та овес), коли материнський матеріал є гомозиготним до одного або кількох домінантних вільно обмолочуваних (FT) алелів, а запилювач є гомозиготним до одного або кількох рецесивних вкритих лушпинням (h) алелів, і вільно обмолочуваний фенотип експресується у зародку або ендоспермі (основа). Зібране насіння з поля для розмноження насіння F1 являє собою комбінацію вільно обмолочуваного гібридного насіння з материнського матеріалу та вкритого лушпинням інбредного насіння з запилювача, які можуть розділятися шляхом сортування, як вказано двосторонніми стрілками. Зерно F2, яке є результатом висівання гібридного насіння, являє собою комбінацію вільно обмолочуваних та вкритих лушпинням зерен.

Фігура 5: Успадкування обмолочуваності злаків (ячмінь), коли материнський матеріал є гомозиготним до одного або кількох домінантних покритих (H) алелів, а запилювач є гомозиготним до одного або кількох рецесивних голих (ft) алелів, і вільно обмолочуваний фенотип експресується у зародку або ендоспермі. Зібране насіння з поля для розмноження насіння F1 являє собою комбінацію покритого гібридного насіння з материнського матеріалу та голого інбредного насіння з запилювача, які можуть розділятися шляхом сортування, як вказано двосторонніми стрілками. Зерно F2, яке є результатом висівання гібридного насіння, являє собою комбінацію покритого та голого насіння.

Фігура 6: Успадкування обмолочуваності злаків (ячмінь), коли материнський матеріал є гомозиготним до одного або кількох домінантних покритих (H) алелів, а запилювач є гомозиготним до одного або кількох рецесивних голих (ft) алелів, і вільно обмолочуваний фенотип експресується по материнській лінії (основа). Зібране насіння з поля для розмноження насіння F1 являє собою комбінацію покритого гібридного насіння з материнського матеріалу та голого інбредного насіння з запилювача, які можуть розділятися шляхом сортування, як вказано двосторонніми стрілками. Зерно F2, яке є результатом висівання гібридного насіння, усе є покритим.

Фігура 7: Успадкування обмолочуваності злаків (ячмінь), коли материнський матеріал є гомозиготним до одного або кількох рецесивних голих (ft) алелів, а запилювач є гомозиготним до одного або кількох домінантних покритих (H) алелів, і вільно обмолочуваний фенотип експресується по материнській лінії (основа). Зібране насіння з поля для розмноження насіння F1 являє собою комбінацію покритого гібридного насіння з материнського матеріалу та голого інбредного насіння з запилювача, які можуть розділятися шляхом сортування, як вказано двосторонніми стрілками. Зерно F2, яке є результатом висівання гібридного насіння, усе є покритим.

Детальний опис винаходу

Даний винахід стосується способу відокремлення гібридного насіння злакових від суміші, яка включає вищезгадане гібридне насіння та інбредне насіння вищезгаданих злаків, який включає (а) одержання або забезпечення суміші насіння злаків, одержаного або виробленого шляхом міжрядного висівання комбінації рослин, яка включає материнський матеріал з чоловічою стерильністю або умовною чоловічою стерильністю та запилювач з чоловічою плодючістю, причому вищезгаданий материнський матеріал та запилювач продукують принаймні два типи насіння, принаймні один з яких є вищезгаданим гібридним насінням, і вищезгадані принаймні два типи насіння мають різні фенотипи, які забезпечують можливість відокремлення вищезгаданого гібридного насіння неінвазивними способами на основі відмінностей у вищезгаданих фенотипах, причому вищезгадані різні фенотипи визначаються алелем або комбінацією алелів в одному або кількох генетичних локусах, причому вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для першого алеля або комбінації алелів у вищезгаданих одному або кількох генетичних локусах, в результаті чого утворюється перший фенотип, а вищезгаданий запилювач є гомозиготним для другого алеля або комбінації алелів у вищезгаданих одному або кількох генетичних локусах, в результаті чого утворюється другий фенотип; (b) відокремлення вищезгаданого гібридного насіння з застосуванням способу відокремлення на основі відмінностей у вищезгаданих фенотипах.

Гібридне насіння зазвичай продукується перехресно запиленими рослинами. У більш конкретному сенсі термін стосується насіння, яке є результатом специфічного і контрольованого схрещування двох інбредних ліній. Зародок вищезгаданого гібридного насіння включає одну копію гаплоїдного геному для кожної батьківської рослини. З іншого боку, інбредне насіння утворюється тоді, коли яйцеклітина всередині зав'язі рослини запліднюється пиляком з пиляків тієї самої квітки (у злакових вони називаються вторинними колосками), звідки походить зав'язь, пиляків різних квіток однієї рослини або пиляків квіток іншої рослини одного батьківського

походження.

Термін “злак” стосується представників родини однодольних Poaceae, які культивуються для одержання їстівних компонентів їх зерен. Ці зерна складаються з ендосперму, зародка та висівка. Кукурудза, пшениця та рис разом складають понад 80% світового виробництва зерна.

До інших представників родини злаків належать жито, овес, ячмінь, тритикале, сорго, дикий рис, спельта, однозернянка, двозернянка, пшениця дурум та камут.

Після утворення гібридного насіння одержують суміш гібридного та інбредного насіння, якщо запилювач не має чоловічої плодючості. Відповідно, суміш насіння, яка включає гібридне насіння, може бути одержана шляхом міжрядного висівання материнського матеріалу та запилювача. Можливі сценарії міжрядного висівання включають смугове або рядове висівання, при якому матеріал запилювача та материнський матеріал висівають переміжними рядами. Більш бажаний тип міжрядного висівання включає змішане міжрядне висівання, при якому справжню суміш матеріалу запилювача та материнського матеріалу висівають таким чином, щоб запилювач, який висівають у меншій пропорції, ніж материнський матеріал, рівномірно розподілявся серед материнського матеріалу з чоловічою стерильністю для забезпечення оптимального перехресного запилення. Таке планування є можливим лише у разі, якщо ознака чоловічої стерильності є спадковою для материнського матеріалу або може бути викликаною через конкретну властивість материнського матеріалу.

Чоловіча стерильність у зв'язку з даним винаходом стосується нездатності рослин до утворення функціональних пиляків, пилку або чоловічих гамет. Вона може бути зумовлена природно або штучно включеної генетичної схильності або людськими втручанням при вирощуванні рослини у полі.

З іншого боку, чоловіча плодючість стосується рослин, здатних утворювати нормальні функціональні пиляки, пилок або чоловічі гамети.

Запилювач є батьківською рослиною, яка забезпечує чоловічі гамети (пилки) для запліднення, а материнський матеріал є рослиною, яка забезпечує жіночі гамети для запліднення, в результаті чого рослина дає насіння.

Материнський матеріал та матеріал запилювача мають висіватися таким чином, щоб цвісти одночасно, тобто, пилок запилювача та насінні зачатки материнського матеріалу визрівають одночасно. Якщо існує різниця у часі цвітіння, час висівання має бути пристосований відповідним чином.

Материнський матеріал може мати чоловічу стерильність, а отже, може бути нездатним до самозапліднення. Таким чином, материнський матеріал з чоловічою стерильністю може продукувати насіння лише у разі запліднення пилом з рослини з чоловічою плодючістю, тобто, запилювача. І навпаки, запилювач може мати жіночу стерильність, таким чином, будучи нездатним до самозапліднення. Отже, запилювач з жіночою стерильністю може запліднювати лише іншу рослину з жіночою плодючістю, тобто, материнський матеріал. Материнський матеріал з чоловічою стерильністю може бути надійно створений у багатьох культурах. Однак запилювачі у культурах з “ідеальними” (двостатевими) квітками, тобто, квітками, які включають чоловічі та жіночі органи, зазвичай також мають жіночу плодючість, а отже, можуть самозапліднюватися. Згідно з даним винаходом, потрібне гібридне насіння росте на материнському матеріалі, тоді як небажане забруднююче інбредне насіння росте на запилювачі.

Принаймні два типи насіння у контексті даного винаходу стосуються різного батьківського походження, а отже, генетичну структуру (яка може втілюватись у розбіжностях у фенотипі) насіння в результаті (перехресного) запліднення типів генетично відмінних або різних батьківських рослин. Наприклад, якщо обидві батьківські рослини є плодючими, можуть бути одержані такі типи насіння: насіння, яке є результатом самозапліднення першої батьківської рослини, насіння, яке є результатом самозапліднення другої батьківської рослини, та насіння, яке є результатом перехресного запліднення (тобто, гібридне насіння), яке дає перша або друга батьківська рослина. У разі, якщо одна з батьківських рослин має чоловічу стерильність (тобто, материнський матеріал), а інша батьківська рослина є повністю плодючою (запилювач), може виникнути два типи насіння, тобто, насіння, яке є результатом перехресного запліднення (тобто, гібридне насіння), яке дає материнський матеріал з чоловічою стерильністю, та насіння, яке є результатом самозапліднення запилювача. У разі материнського матеріалу з чоловічою стерильністю та запилювача з жіночою стерильністю може виникати лише один тип насіння – гібридне насіння.

Гібридне насіння, у контексті даного винаходу, означає насіння, яке є результатом перехресного запліднення двох батьківських рослин, яке не є генетично ідентичними, що веде до продукування насіння, яке походить від перехресного запліднення і має відмінну генетичну

структуру порівняно з обома батьківськими рослинами.

Різні фенотипи, які забезпечують можливість відокремлення гібридного насіння неінвазивними способами на основі відмінностей у вищезгаданих фенотипах, стосуються способів, які не вимагають видалення частини насіння або будь-якого пошкодження зерен для встановлення вищезгаданих фенотипічних відмінностей, таким чином, забезпечуючи можливість нормального проростання та розвитку насіння після висівання. Ці способи включають відокремлення на основі відносного розміру насіння шляхом просіювання, відокремлення на основі питомої маси шляхом гравітаційного сортування на сортувальному столі, відокремлення на основі питомої маси шляхом провіювання, відокремлення на основі відмінностей кольору з застосуванням неінвазивних технологій візуалізації. Такі способи описуються, наприклад, у публікаціях Dessai et al. (1997, *Seeds handbook: biology, production, processing, and storage*. Marcel Dekker, Inc., New York.), Harmond et al. (1968, *Mechanical seed cleaning and handling*. USDA Agricultural Handbook No. 354. Washington, D.C.), Jorgensen et al. (2004, *Seed collection, cleaning, and storage*, Chap. 24. In: Monsen et al. *Restoring Western Ranges and Wildlands*. USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-136. Ft. Collins, Colorado), Vaughan et al (1968, *Seed processing and handling*. Seed Technology Laboratory, Mississippi State Univ., State College, Mississippi, див. також mcia.msstate.edu/pdf/seed-processing-and-handling.pdf) Emberson et al. (Optical sorting (2011): *Grain, Feed and Milling technology*, Nov-Dec 2011, p. 22 - 24), Delwiche et al. (2005, *Applied Engineering in Agriculture*, Vol. 21(4): 681 – 688), Dowell et al. (2002, *Use of optical sorting to detect karnal bunt-infected wheat kernels*. ASAE Paper No. 023007. St. Joseph, Mich.: ASAE. Способи згідно з винаходом можуть включати більше, ніж один етап відокремлення, наприклад, два етапи просіювання з різними параметрами виключення (див. також Приклад 3).

У контексті даного винаходу термін “алель(i)” означає будь-яку одну або кілька альтернативних форм гена у конкретному локусі. У диплоїдній клітині організму алелі даного гена розташовуються у конкретному місці або локусі на хромосомі. Один алель є присутнім на кожній хромосомі пари гомологічних хромосом або на гомеологічних хромосомах.

У контексті даного винаходу термін “локус” означає конкретне місце або місця або сайт на хромосомі, де розташовується, наприклад, ген або генетичний маркер.

У контексті даного винаходу термін “гомологічні хромосоми” означає хромосоми, які містять інформацію для однакових біологічних особливостей і містять однакові гени в однакових локусах, але, можливо, різні алелі цих генів. Гомологічними хромосомами є хромосоми, які спарюються під час мейозу. “Негомологічні хромосоми”, які представляють усі біологічні особливості організму, утворюють набір, і певна кількість наборів у клітині називається плоїдністю. Диплоїдні організми містять два набори негомологічних хромосом, причому кожна гомологічна хромосома успадковується від іншої батьківської рослини. У тетраплоїдних видах існує два набори диплоїдних геномів, і, таким чином, хромосоми двох геномів називаються “гомеологічними хромосомами” (і подібним чином локуси або гени двох геномів називаються гомеологічними локусами або генами). Подібним чином гексаплоїдні види мають три набори диплоїдних геномів і т. д. Диплоїдні, тетраплоїдні або гексаплоїдні види рослин можуть включати велику кількість різних алелів у конкретному локусі. Рівень плоїдності окультурених видів пшениці охоплюється діапазоном, який включає диплоїдні (*Triticum monosocum*, $2n = 14$, AA), тетраплоїдні (*T. turgidum*, $2n = 28$, AABB) та гексаплоїдні (*T. aestivum*, $2n = 42$, AABBDD).

У контексті даного винаходу термін “гетерозиготний” означає генетичний стан, який існує тоді, коли два різні алелі знаходяться у конкретному локусі, але розташовуються окремо на відповідних парах гомологічних хромосом у клітині. Іншими словами, “гетерозиготний” означає генетичний стан, який існує тоді, коли два різні алелі знаходяться у конкретному локусі двох представників пари гомологічних хромосом у клітині. Натомість, у контексті даного винаходу термін “гомозиготний” означає генетичний стан, який існує тоді, коли два ідентичні алелі знаходяться у конкретному локусі, але розташовуються окремо на відповідних парах гомологічних хромосом у клітині. Іншими словами, термін “гомозиготний” означає генетичний стан, який існує тоді, коли два ідентичні алелі знаходяться у конкретному локусі на обох представниках пари гомологічних хромосом у клітині.

Згідно з даним винаходом, переміжні алелі одного або кількох генів можуть визначати фенотип насіння інбредних батьківських рослин, і, таким чином, один алель або набір алелів визначає один прояв фенотипу насіння, а інший алель або набір алелів визначає інший прояв фенотипу насіння, і один алель або набір алелів є домінантним або частково домінантним, а інший алель або набір алелів є рецесивним або частково рецесивним. Відповідно, можливі комбінації алелів, які визначають конкретний фенотип насіння, включають один домінантний алель та один рецесивний алель, а також два домінантні алелі, два рецесивні алелі, три

домінантні алелі, три рецесивні алелі, два домінантні та один рецесивний алель, один домінантний та два рецесивні алелі та всі можливі повтори для чотирьох, п'яти, шести або більшої кількості генів, які беруть участь у конкретному фенотипі згідно з даним винаходом. Те ж саме стосується частково домінантних та частково рецесивних алелів.

5 В іншому варіанті втілення даний винахід стосується способу продукування гібридного насіння злакових, який включає (а) міжрядне висівання комбінації рослин, яка включає материнський матеріал з чоловічою стерильністю або умовною чоловічою стерильністю та запилювач з чоловічою плодючістю, причому вищезгаданий материнський матеріал та запилювач продукують принаймні два типи насіння, принаймні один з яких є вищезгаданим гібридним насінням, вищезгадані принаймні два типи насіння мають різні фенотипи, які забезпечують можливість відокремлення вищезгаданого гібридного насіння неінвазивними способами на основі відмінностей у вищезгаданих фенотипах, причому вищезгадані різні фенотипи визначаються алелем або комбінацією алелів в одному або кількох генетичних локусах, причому вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для першого алеля або комбінації алелів у вищезгаданих одному або кількох генетичних локусах, в результаті чого утворюється перший фенотип, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для другого алеля або комбінації алелів у вищезгаданих одному або кількох генетичних локусах, в результаті чого утворюється другий фенотип.

В оптимальному варіанті втілення вищезгаданий спосіб одержання гібридного насіння злакових також включає відокремлення гібридного насіння з застосуванням неінвазивного способу відокремлення.

В оптимальному варіанті втілення вищезгадане висівання включає рядове або смугове або змішане міжрядне висівання.

В іншому оптимальному варіанті втілення вищезгадане висівання включає висівання насіння або висаджування молодих рослин вищезгаданого материнського матеріалу та вищезгаданого запилювача у ґрунт.

У ще одному оптимальному варіанті втілення вищезгаданий спосіб одержання гібридного насіння злакових також включає збирання утвореного насіння перед відокремленням.

Збирання може здійснюватися, крім інших засобів, за допомогою збиральних машин, які традиційно застосовуються у даній галузі. У разі рядового або смугового вирощування збиральні машини в оптимальному варіанті конструюють таким чином, щоб ряди або смуги запилювачів могли бути зібрані окремо, що забезпечує можливість попереднього сортування вирощеного насіння.

В оптимальному варіанті втілення вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для одного алеля або комбінації алелів в одному або кількох генетичних локусах, причому принаймні один з вищезгаданих алелів у вищезгаданому материнському матеріалі є домінантним або частково домінантним, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для одного алеля або комбінації алелів в одному або кількох генетичних локусах, причому принаймні один з вищезгаданих алелів у вищезгаданому запилювачі є рецесивним або частково рецесивним.

40 Термін "часткове домінування" стосується ситуації, в якій гетерозигота демонструє фенотип, який є проміжним між фенотипами обох гомозиготних батьківських рослин (одна з яких є гомозиготною (частково) домінантною, а інша є гомозиготною рецесивною). Цей проміжний фенотип є демонстрацією часткового або неповного домінування. У разі часткового домінування зазвичай спостерігається кілька фенотипів серед потомства. Те ж саме стосується частково рецесивних алелів. Ці вжиті авторами терміни передбачають, що всі алелі, які відповідають за експресію ознак вкритого лушпинням або вільно обмолочуваного насіння, які докладніше пояснюються далі, навіть якщо вони є частково домінантними або частково рецесивними, в результаті забезпечують експресію потрібного фенотипу, тобто, вкритого лушпинням або вільно обмолочуваного насіння.

50 Описана вище комбінація генетичних структур батьківських рослин в утворює два типи насіння, причому вищезгадані два типи насіння можуть бути розділені на основі фенотипу, як описано вище. Якщо материнський матеріал є гомозиготним до одного або кількох домінантних алелів, одержане в результаті гібридне насіння також має материнський (домінантний) фенотип; або через фенотип насіння прямо визначається генотипом рослини, яка утворює насіння (у даному разі материнського матеріалу), як докладніше пояснюється далі, або через генотип самого насіння, що визначає фенотип насіння. Інбредне насіння, яке є результатом самозапліднення гомозиготних рецесивних запилювачів, має (рецесивний) батьківський фенотип, або через те, що фенотип насіння прямо визначається генотипом рослини, яка утворює насіння (у даному разі запилювача), або через генотип самого насіння, що визначає фенотип насіння. Ця різниця у генотипі рослини, яка утворює насіння, що визначає фенотип

насіння, на відміну від генотипу самого насіння, що визначає фенотип насіння, називається материнською експресією на відміну від ендоспермальної / зародкової експресії.

У варіанті, якому віддають більшу перевагу, вищезгадана комбінація рослин характеризується тим, що вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому материнському матеріалі проявляється у насінні з вільно обмолочуваним фенотипом, причому вищезгаданий один або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому запилювачі проявляється у насінні з вкритим лушпинням фенотипом.

Насіння покритонасінних рослин складається з трьох генетично відмінних складових: (1) зародка, утвореного з зиготи, (2) ендосперму, який зазвичай є триплоїдним, (3) сім'яної оболонки з тканини, яка походить від материнської тканини насінного зачатка. Сім'яна оболонка також називається половиною або лушпинням. Чотири дикі види пшениці, разом з окультуреними сортами однозернянкою, двозернянкою та спельтою, мають лушпиння. Ця більш примітивна з точки зору еволюції структура, яка також є характерною для ячменю, складається з жорстких або стійких плівок, які щільно охоплюють зерна, та, у окультуреної пшениці, остюка, який ламається при обмолоті. В результаті після обмолоту пшеничний колос розпадається на вторинні колоски (також відомі як "спельтоїдний фенотип"). Для одержання зерен вкритого лушпинням насіння вимагається подальша обробка, така, як перемелювання або подрібнення, для видалення лушпиння або полови. Вкрите лушпинням насіння пшениці часто зберігають як вторинні колоски, оскільки жорсткі плівки забезпечують добрий захист від шкідників, які паразитують на зерні під час зберігання. Натомість у вільно обмолочуваних або голих) форм, таких, як пшениця дурум та звичайна пшениця, плівки є ламкими, а остюк жорстким. При обмолоті висівки руйнуються, вивільнюючи зерна.

Відповідно, в одному варіанті втілення материнський матеріал є гомозиготним для домінантного або частково домінантного алеля або комбінації таких алелів, які забезпечують вільно обмолочуваний фенотип, тоді як запилювач є гомозиготним для рецесивного алеля або комбінації таких алелів, які забезпечують вкритий лушпинням фенотип. В результаті гібридне насіння також буде вільно обмолочуваним, тоді як самозапилене (інбредне) насіння не є вільно обмолочуваним (вкрите лушпинням).

У гексаплоїдній пшениці ген стійкості плівки Tg разом з головним локусом окультурення Q регулюють обмолочуваність. Ген Q є геном, який розташовується на довгому плечі хромосоми пшениці 5A (Q-локус), що значною мірою відповідає за окультурення пшениці, оскільки він забезпечує характер вільного обмолочування шляхом пригнічення спельтоїдного фенотипу. Крім того, кілька позитивних плейотропних ефектів є пов'язаними з Q, наприклад, пом'якшення плівок, зменшення довжини колосся, збільшення кількості вторинних колосків на колос та жорсткість остюка, причому всі ці особливості є сприятливими для збирання (Salamini et al., 2002, Nature Reviews Genetics 3: 429 - 441). Ген Q було клоновано й молекулярно охарактеризовано як APETALA2 (AP2)- подібний фактор транскрипції. З двох алелів Q-алель виявився більшою мірою транскрибованим, ніж q, і може бути диференційований через A/G SNP у позиції 2123 Q-гена, що веде до різниці в одну амінокислоту між Q- та q-білками. Відповідно, Q-білок характеризується ізолейцином у позиції 329, тоді як q має валін у цій позиції, причому остання амінокислота, очевидно, обмежує утворення гомодимеру. Вплив Q здебільшого залежить від його дози. На основі експериментів з дозуванням Q- та q-алелів у різних умовах було встановлено, що q є гіпоморфним до Q, і 2,5 дози q дорівнюють 1 дозі Q. У рослинах, трансформованих Q-алелем, було виявлено, що рівні Q-транскрипту є обернено пропорційними спельтоїдному фенотипові (Simons et al. 2006, Genetics 172: 547 – 555). Нещодавно було розроблено прикладну програму для швидкого й надійного піросеквенування для диференціації алелів 5Aq та 5AQ та визначення кількості копій гена 5AQ в одному аналізі (Foerster et al., 2012, Euphytica 186: 207 - 218).

Іншими визначними чинниками вільно обмолочуваного фенотипу є ген стійкої плівки (Tg) та ген м'якої плівки (Sog), які картується у хромосомах 2DS та 2AS, відповідно, хоча залучені гени досі не є розпізнаними. Ген Tg є головним геном обмолочуваності у гексаплоїдній пшениці, Tg-алель якого є частково домінантним, тоді як характеристика вільної обмолочуваності tg має рецесивний характер. Sog є головним геном обмолочуваності у диплоїдній пшениці, причому мутантний алель (sog) є рецесивним алелем, який зумовлює вільно обмолочуваний фенотип (Sood et al., 2009, Theor Appl Genet 199: 341 - 351). Хоча у sog-мутантних рослинах плівки, які, які оточують зерно, є м'якими, колосся є дуже компактним, що являє собою негативний плейотропний ефект (Salamini et al., 2002, Nature Reviews Genetics 3: 429 - 441).

Simonetti et al (1999, Genet Res Crop Evol 46: 267 – 271) виявили у тетраплоїдній пшениці чотири QTL, які впливають на ознаку обмолочуваності і є пов'язаними з хромосомами 2BS, 5AL,

5AS та 6AS. 2BS та 5AL QTL відповідають гомеологічним генам Tg та Q гексаплоїдної пшениці, відповідно, причому Tg2, який є гіпотетичним ортологом Tg, розташовується на хромосомі 2BS (далі вказується як Tg^{2B}, Q^{5A} та Tg^{2B}). Таким чином, той факт, що QTL, які впливають на обмолочуваність пшениці, було розпізнано на хромосомі 6A та 6D (Simonetti et al., вище;
 5 Jantasuriyarat et al. 2004, Theor Appl Genet 108:261–273), вказує на те, що локуси, відмінні від локусів на хромосомах групи-2 та хромосомі 5A (Q-ген), також можуть брати участь у регулюванні ознаки обмолочуваності у пшениці (Sood et al., 2009, вище).

Наприклад, вільно обмолочувана пшениця дурум, таким чином, може мати генотип $tg\text{tg}^{2B}QQ^{5A}$, тоді як вільно обмолочувана м'яка пшениця може мати генотип $tg\text{tg}^{2B}tg\text{tg}^{2D}QQ^{5A}$.

10 Відповідно, вкрита лушпинням пшениця дурум може мати генотип $tg\text{tg}^{2B}qq^{5A}$, тоді як вкрита лушпинням м'яка пшениця може мати генотип $tg\text{tg}^{2B}tg\text{t}^{2D}qq^{5A}$.

У вівса (*Avena sativa*) невикритість зерен є генетично складною ознакою; відомо, що алелі у чотирьох різних локусах (позначені як N-1, N-2, N-3 та N-4) діють епістатично для керування її експресією. N-1 є головним геном-перемикачем, який зумовлює невикритість, і алелі інших трьох локусів взаємодіють з N-1 та один з одним для зміни ступеня експресії невикритості. Залежно від алелів, присутніх у кожному з чотирьох локусів, генотипи вівса демонструють різний ступінь невикритості, від повністю голих (або майже голих) до частково голих, частково покритих і аж до повністю покритих фенотипів. Повністю голий фенотип експресується тоді, коли домінантні алелі є присутніми у локусах N-1 та N-2, і домінантний (N-3) або рецесивний (n-3) алель є присутнім у третьому локусі. Генотипи з гомозиготними рецесивними (n-1/n-1) алелями у N-1 локусі завжди мають покритий фенотип незалежно від алелів, присутніх в інших локусах. Генотипи N-1/N-1 можуть мати голий або мозаїчний фенотипи, залежно від алелів, присутніх в інших локусах. Мозаїчний фенотип продукує суміш голих та покритих зерен у різних пропорціях, залежно від алелів, присутніх у локусах N-2 та N-3. Локус N-4 змінює ефект трьох інших локусів на зворотний. У гомозиготному рецесивному (n-4/n-4) стані він є гіпостатичним до будь-якого домінантного алеля в інших трьох локусах. Якщо локус N-4 є гомозиготним домінантним (N-4/N-4), і локус N-1 перебуває у гетерозиготному стані, створюється покритий фенотип. Було виявлено, що маркер ізоферменту естерази є тісно пов'язаним з одним з генів (за припущенням, N-1), який зумовлює невикритість у вівса (Kibite 2002, An Isozyme Marker linked to the N-1 Gene Governing Nakedness in Oat, in: Oat newsletter Vol. 48).

Наприклад, згідно з наявними на даний час відомостями, вільно обмолочуваний овес, таким чином, може мати генотип N-1/N-1 разом з N-2/N-2 та N-3/N-3 або разом з N-2/N-2 та N-3/n-3 і n-4/n-4, тоді як вкрита лушпинням овес може мати генотип n-1/n-1 та N-4/N-4 або N-1/n-1 і N-4/N-4, причому статус N-2 або N-3 не має значення.

35 У більшості злаків, включаючи пшеницю та овес, фенотип насіння стосовно лушпиння визначається материнською лінією, оскільки сім'яна оболонка фактично є материнською тканиною. Це означає, що генотип батьківської рослини, яка продукує насіння, визначає, чи буде насіння, що продукується рослиною (тобто, насіння F1) вкритим лушпинням, чи вільно обмолочуваним. Таким чином, генотип материнського матеріалу F1 визначає фенотип насіння, що продукується рослиною, тобто, насіння F2, і т. ін. У зв'язку з даним винаходом, фенотип обмолочуваності гібридного насіння, що продукується материнським матеріалом, визначається генотипом материнського матеріалу, тоді як насіння, що продукується запилювачем в результаті такого самозапліднення, має фенотип, визначений генотипом запилювача. Цей принцип генотипу рослини, яка продукує насіння, що прямо визначає фенотип насіння, називається материнською експресією фенотипу насіння.

45 У варіанті, якому віддають більшу перевагу, вищезгадана комбінація рослин характеризується тим, що вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому материнському матеріалі проявляється у насінні з вкритим лушпинням фенотипом, причому вищезгадані один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому запилювачі проявляється у насінні з вільно обмолочуваним фенотипом.

Ячмінь є винятком з вищезазначеного принципу материнської експресії фенотипу обмолочуваності насіння. На відміну від інших злаків, таких, як пшениця та овес, ячмінь зазвичай має зернівки з прилипаючим лушпинням у зрілому стані, відомі як покритонасінний (вкритий лушпинням) ячмінь. Однак кілька сортів ячменю є вільно обмолочуваними і також називаються голим (позбавленим лушпиння) ячменем. У покритонасінному ячмені липка клейка речовина з'являється через 10 днів після цвітіння на поверхні зернівки, і ця речовина продукується зернівкою (тобто, зародком/ендоспермом), а не лушпинням (материнською тканиною). Покрита/гола зернівка у ячмені контролюється єдиним локусом (nud, для nudum), розташованим на плечі хромосоми 7HL; алель покритої зернівки (Nud) є домінантним відносно

голої (nud). Ген Nud було розпізнано як ген фактора транскрипції, що належить до родини факторів реакції на етилен (ERF). Делецію 17 т. н., яка охоплює ERF-ген, було виявлено серед 100 досліджених голих сортів, тоді як два викликані рентгенівським опроміненням nud-алелі, які містять несинонімічні амінокислотні заміщення, додатково підтверджували, що ERF-ген відповідає за покритий/голий фенотип насіння ячменю. За аналогією з виведеними функціями спорідненого гена WIN1/SHN1 Arabidopsis, вважається, що Nud-ген ячменю регулює склад ліпідів, відкладених на епідермісі перикарпію, таким чином, контролюючи прилипання лушпиння, тоді як у голонасінного ячменю брак ліпідного шару може блокувати прилипання, таким чином, забезпечуючи вільно обмолочувані зернівки (Taketa et al., 2008, PNAS 11: 4062 - 4067).

Відповідно, у ячменю голий / вкритий лушпинням фенотип насіння визначається Nud-генотипом самого насіння (тобто, визначається зародком / ендоспермом), а не генотипом материнського матеріалу (визначається не материнською лінією). Це називається ендоспермальною / зародковою експресією фенотипу насіння. Внаслідок цього вкритий лушпинням ячмінь має генотип Nud/Nud або Nud/nud, тоді як голонасінний ячмінь має генотип nud/nud.

В оптимальному варіанті втілення вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для одного алеля або комбінації алелів в одному або кількох генетичних локусах, причому принаймні один з вищезгаданих алелів є рецесивним або частково рецесивним, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для одного алеля або комбінації алелів в одному або кількох генетичних локусах, причому принаймні один з вищезгаданих алелів є домінантним або частково домінантним. У цьому варіанті втілення фенотип насіння повинен мати материнську експресію.

В іншому оптимальному варіанті втілення вищезгадана комбінація рослин характеризується тим, що вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому материнському матеріалі проявляється у насінні з фенотипом вкритого лушпиння, і вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому запилювачі проявляється у насінні з вільно обмолочуваним фенотипом.

Загальний огляд генетичних детермінант та успадкування вкритого лушпинням порівняно з вільно обмолочуваним фенотипом у різних злаків представлено нижче у Таблиці 1 і схематично описується на Фігурах 1 - 7.

Таблиця 1

Будова батьківського зерна та F1 та успадкування (спрощено)

Вид злаків	Фенотип материнського матеріалу	Фенотип запилювача	Цільова фракція Фенотип зібраного насіння F1 (гібридного)	Фенотип насіння F2	Успадкування та експресія вільно обмолочуваного типу
Ячмінь	Вкрите лушпинням	Вільно обмолочуване	Вкрите лушпинням	Вкрите лушпинням	Рецесивний; ендосперм зародок
Овес	Вільно обмолочуване	Вкрите лушпинням	Вільно обмолочуване	Вільно обмолочуване	Домінантний (частково); материнський
Пшениця	Вільно обмолочуване	Вкрите лушпинням+ некрихк.	Вільно обмолочуване	Вільно обмолочуване	Домінантний для Q-фактора/ рецесивний для всіх інших (tg, sog); материнський

Вищезгаданий спосіб неінвазивного відокремлення може ґрунтуватися на відмінностях у розмірі, стані поверхні або питомій масі вищезгаданих принаймні двох типів насіння, як описано вище.

Для варіантів втілення, у яких різниця у фенотипах виражається через вкритий лушпинням та вільно обмолочуваний фенотип, відокремлення може здійснюватися на основі різних розмірів зерен з лушпинням або без нього. Оскільки самі зерна зазвичай мають однаковий або

порівнянний розмір, наявність лушпиння, щільно прикріпленого до зерен одного фенотипу робить об'єм цього типу насіння більшим за об'єм лише вільно обмолочуваних зерен. Альтернативний спосіб відокремлення може ґрунтуватися на питомій масі насіння. Вкрите лушпинням насіння, через його більший об'єм, який частково заповнюється лише повітрям, має меншу питому масу порівняно з вільно обмолочуваним насінням.

Даний винахід також стосується способу відокремлення гібридного насіння від суміші гібридного насіння та інбредного насіння, який включає одержання або забезпечення вищезгаданої суміші, причому зародки вищезгаданого гібридного насіння мають генотип, який включає одну копію гаплоїдного геному материнського матеріалу та одну копію гаплоїдного геному запилювача, причому зародки вищезгаданого інбредного насіння мають генотип, який включає дві копії гаплоїдного геному запилювача, вищезгаданий материнський матеріал має чоловічу стерильність або умовну чоловічу стерильність, і вищезгаданий запилювач має чоловічу плодючість, який характеризується тим, що (а) вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для насіння з вільно обмолочуваним фенотипом, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для насіння з вкритим лушпинням фенотипом, або (b) вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для насіння з вкритим лушпинням фенотипом, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для насіння з вільно обмолочуваним фенотипом; спосіб включає застосування для вищезгаданої суміші насіння засобу для відокремлення за розміром, станом поверхні або питомою масою зерен.

В оптимальному варіанті втілення співвідношення запилювача з материнським матеріалом становить від 1:100 до 25:100.

Залежно від типу міжрядного висівання, можуть вимагатися різні співвідношення запилювача з материнським матеріалом. У разі рядового або смугового висівання співвідношення запилювача з материнським матеріалом може становити від 10:100 до 25:100, наприклад 15:100 або 20:100. Для змішаного міжрядного висівання вимагається менша кількість запилювача для забезпечення запліднення материнського матеріалу. Зазвичай співвідношення становлять від 1:100 до 15:100, наприклад, 2:100, 3:100, 5:100, 8:100, 10:100 або 12:100.

Вищезгаданий злак може бути вибраний з-поміж пшениці, пшениці дурум, вівса, ячменю та тритикале.

У варіанті втілення, якому віддають більшу перевагу, вищезгаданим злаком є пшениця, і вищезгаданий материнський матеріал є вибраним з-поміж *Triticum aestivum* L. виду *Vulgare Host*, *Triticum aestivum* L. виду *Compactum*, *Triticum aestivum* L. виду *Sphaerococcum*, *Triticum aestivum* L. виду *Petropavlovskiy* та *Triticum aestivum* L. виду *Tibetianum*.

В іншому варіанті втілення, якому віддають більшу перевагу, вищезгаданим злаком є пшениця, і вищезгаданий запилювач є вибраним з-поміж *Triticum aestivum* L. виду *Spelta*, *Triticum aestivum* L. виду *Macha*, *Triticum aestivum* L. виду *Vavilovii*, *Triticum aestivum* L. виду *Yunnanense* та напівдика форма *Triticum aestivum* L. виду *Tibetianum*.

У варіанті, якому віддають більшу перевагу, злаком є пшениця, і материнський матеріал та запилювач комбінують з-поміж вищеперелічених сортів.

В оптимальному варіанті втілення вищезгаданим злаком є пшениця дурум, і вищезгаданий материнський матеріал є вибраним з-поміж *T. turgidum* L. виду *Durum Desf.* та *T. turgidum* L. виду *Parvicoccum*. В іншому оптимальному варіанті втілення вищезгаданим злаком є пшениця дурум, і вищезгаданий запилювач є вибраним з-поміж *T. turgidum* L. виду *Dicoccum* (двозернянка) та *T. turgidum* L. виду *Dicoccoides* (дика двозернянка). У варіанті, якому віддають більшу перевагу, злаком є пшениця дурум, і материнський матеріал та запилювач комбінують з-поміж вищеперелічених сортів.

В іншому оптимальному варіанті втілення гени, які визначають вищезгаданий вкритий лушпинням фенотип, успадковуються рецесивно.

У ще одному оптимальному варіанті втілення вищезгадана чоловіча стерильність ґрунтується на цитоплазматичній чоловічій стерильності, ядерній чоловічій стерильності або ознаці, включеній у вищезгадану рослину шляхом генної інженерії або мутації, або є викликаною з застосуванням гаметоциду.

Під час виробництва гібридного насіння пшениці застосовують різні способи для запобігання самозапиленню жіночої лінії: застосування специфічних до чоловічих зразків гаметоцидів на материнському матеріалі, використання генетичної цитоплазматичної або кодованої ядром чоловічої стерильності або використання ознаки, включеної у рослину шляхом генної інженерії або мутації (для ознайомлення див. також публікацію Perez-Prat and van Lookeren Campagne, 2002, *Trends Plant Science* 7(5), 199 - 203, включену до даної заявки у повному обсязі).

Лінії з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (CMS) мають одну або кілька мутацій у їхньому мітохондріальному геномі (під назвою "стерильна цитоплазма"), результатом чого є

чоловіча стерильність, і чоловіча стерильність успадковується як домінантна ознака, що передається по материнській лінії. Для використання цитоплазматичної чоловічої стерильності у виробництві гібридного насіння материнський матеріал повинен містити стерильну цитоплазму, а запилювач повинен містити (ядерні) гени-відновлювачі для відновлення

5 плодючості гібридних рослин, які вирощують з гібридного насіння, зібраного з материнського матеріалу; і CMS-мутація не повинна бути пов'язаною з погіршенням врожайності.

Біотехнології забезпечили нові можливості для одержання рослин з чоловічою стерильністю, тобто, шляхом введення генів, результатом якого є ознаки, які забезпечують (умовну) чоловічу стерильність. Наприклад, ген або набір генів може бути введений шляхом

10 генної інженерії, причому вищезгадані гени можуть змінювати рівень метаболітів, необхідних для вироблення життєздатного пилку, таких, як амінокислоти (документ WO94/29465), цукри (Goetz et al., 2001, PNAS 98, 6522 - 6527), флавоноли (Derksen et al., 1999, Planta 207, 575 - 581), жасмонова кислота (документ WO97/10703, McConn and Browse, Plant Cell 8, 403 - 416; Sanders et al., Plant Cell 12, 1041 - 1061), біотин (документ WO99/04023) або ауксини (Spena et al., 1992, Theor. Appl. Genet. 84, 520 - 527). Індукована плодючість може досягатися для деяких з

15 цих систем шляхом застосування відсутнього метаболіту (див., наприклад, документ WO97/10703, McConn and Browse, Plant Cell 8, 403 - 416; Sanders et al., Plant Cell 12, 1041 - 1061, документи WO99/04023, WO93/18142, EP0513884).

Інший підхід до загальної чоловічої стерильності здійснюють шляхом комбінованої дії двох (транс)генів, поєднаних в одній рослині шляхом схрещування двох різних батьківських ліній, кожна з яких експресує один з генів (див., наприклад, документи US 5,426,041 або WO98/32325). Прикладом цього підходу є відновлення активного токсину з двох неактивних фрагментів токсину, кожен з яких кодується окремим трансгеном. Комбінована експресія обох трансгенів у чоловічих репродуктивних тканинах в результаті може забезпечувати чоловічу стерильність. Ця

20 стратегія вимагає системи контролю запилення для схрещування двох плодючих прабатьківських ліній для утворення жіночої батьківської лінії з чоловічою стерильністю для виробництва гібридного насіння.

Системи, які ґрунтуються на вибіркового видаленні тканин, необхідних для продукування функціонального пилку шляхом тканинносPECIFIC експресії гена, який кодує білок, здатний переривати функцію клітин, можуть ґрунтуватися як на природних ознаках, так і на ознаках, одержаних шляхом генної інженерії (див., наприклад, Mariani et al., 1990, Nature 347, 737 - 741; Koltunow et al., 1990, Plant Cell 2, 1201 - 1224; документи US 6,072,102 та US5,880,333). Деякі з них забезпечують можливість хімічного контролю над стерильністю та плодючістю. Наприклад, індукована стерильність може досягатися шляхом експресії гена, який кодує білок, який

35 каталізує перетворення прогербіциду на гербіцид лише у чоловічих репродуктивних тканинах (див., наприклад, O'Keefe et al., 1994, Plant Physiol. 105, 473 - 482; Kriete et al., 1996, Plant J. 9, 809 - 818; Dotson et al., 1996, Plant J. 10, 383 - 392, та документ US 6,177,616), або шляхом інженерії гена чоловічої стерильності таким чином, щоб його експресія могла бути викликана шляхом застосування хімічної речовини. Подібним чином для викликання плодючості може

40 застосовуватися хімічна регуляція експресії гена, який може доповнювати чоловічу стерильність (гена-відновлювача плодючості) або гена-репресора чоловічої стерильності (див., наприклад, документ US 6,072,102; Ward et al., 1993, Plant Mol Biol 22, 361 - 366, документи WO99/42598; US 6,172,279 та WO93/18171).

І нарешті, також описано можливість застосування природних або індукованих мутацій, які викликають чоловічу стерильність. У цьому разі застосовують алель дикого типу як ген-відновлювач плодючості, і його експресію регулюють шляхом застосування хімічних речовин.

Одним з найпростіших шляхів розведення рослин з чоловічою стерильністю є з'єднання гена, який забезпечує домінантну чоловічу стерильність з геном толерантності до гербіцидів. Гетерозиготні рослини з чоловічою стерильністю схрещують з лінією дикого типу в однакових (ізогенних) генетичних умовах. Потомство цього кросу з чоловічою стерильністю вибирають шляхом застосування гербіциду (див., наприклад, документ WO89/10396). Цю стратегію успішно застосовують для комерційного розведення гібридів каноли (*Brassica napus*) у Канаді.

Даний винахід також стосується гібридного насіння злаків, одержаного з застосуванням вищеописаних способів згідно з винаходом.

Крім того, даний винахід стосується гібридного насіння злаків, причому зародки вищезгаданого гібридного насіння мають генотип, який включає одну копію гаплоїдного геному материнського матеріалу та одну копію гаплоїдного геному запилювача, причому необов'язково вищезгаданий материнський матеріал має чоловічу стерильність або умовну чоловічу стерильність, причому вищезгаданий запилювач має чоловічу плодючість, який

60 характеризується тим, що (а) вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для насіння

з вільно обмолочуваним фенотипом, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для насіння з вкритим лушпинням фенотипом; або b) вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для насіння з вкритим лушпинням фенотипом, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для насіння з вільно обмолочуваним фенотипом.

- 5 Даний винахід також стосується застосування (a) материнського матеріалу з чоловічою стерильністю або умовною чоловічою стерильністю, який продукує насіння злаків з вільно обмолочуваним фенотипом, та запилювача, гомозиготного для насіння вищезгаданого злаку з вкритим лушпинням фенотипом, або (b) материнського матеріалу з чоловічою стерильністю або умовною чоловічою стерильністю злаку, який продукує насіння з вкритим лушпинням фенотипом, та запилювача, гомозиготного для насіння з вільно обмолочуваним фенотипом, для
- 10 продукування гібридного насіння вищезгаданого злаку.

Даний винахід також стосується гібридного насіння, одержаного будь-яким з описаних авторами способів.

Даний винахід пояснюється на прикладах.

- 15 Приклад 1: Відокремлення штучних сумішей насіння

- Комерційні вкриті лушпинням та вільно обмолочувані сорти трьох видів злаків (таблиця 2) вирощували у двох місцях (D-78224 Болінген (BO), D-06466 Гатерслебен (GA)) і збирали. Два місця було вибрано для врахування впливу навколишнього середовища на розвиток росли на розміри зерен. Зібране насіння очищали від бруду та іншого небажаного матеріалу шляхом провіювання. Визначали масу тисячі зерен (TKW) різних зразків насіння (таблиця 3). Суміші насіння утворювали таким чином, щоб мати 85% насіння материнського матеріалу та 15% насіння запилювача (таблиця 3). Часткові вибірки по 100 г сумішей піддавали простому просіюванню, застосовуючи лабораторну просіювальну машину "Pfeuffer Sortimat", оснащену різними ситами по 2,8, 2,7, 2,6, 2,5 та 2,2 мм завширшки, відповідно, та 20 мм завдовжки.
- 20 Просіяні фракції зважували й сортували вручну з метою визначення кількості вкритого лушпинням та вільно обмолочуваного насіння, відповідно. Результати вказують на ситі, яке забезпечувало оптимальне очищення цільової фракції після одного етапу просіювання.
- 25

Таблиця 2

Сорти зразків

Пункт	Номер зразка	Види	Материнський матеріал Приклад сорту	Запилювач Приклад сорту
1	1	Ячмінь	Henrike (вкриті лушпинням)	Pastello (вільно обмолочуване)
2	2	Ячмінь	Westminster (вкриті лушпинням)	Pastello (вільно обмолочуване)
3	10	Овес	Samuel (вільно обмолочуване)	Scorpion (вкриті лушпинням)
4	21	Пшениця	Tabasco (вільно обмолочуване)	Badenstern (вкриті лушпинням)
5	22	Пшениця	Genius (вільно обмолочуване)	Badenkrone (вкриті лушпинням)

Таблиця 3

Процедура змішування (суміш у % за кількістю зерен)

				TKW (г)		Суміш % за кількістю зерен		Маса суміші (г)	
Пункт	Вид	Партнери суміші	Розташування	вкриті лушп.	вільно обмол.	вкриті лушп.	вільно обмол.	вкриті лушп.	вільно обмол.
1	Ячмінь	Henrike-Pastello	BO	55,5	40,5	85,0	15,0	472,0	61,0
1	Ячмінь	Henrike-Pastello	GA	51,0	49,0	85,0	15,0	130,1	22,1
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	BO	53,5	40,0	85,0	15,0	455,0	60,0
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	GA	49,3	48,0	85,0	15,0	125,7	21,6
3	Овес	Scorpion-Samuel	BO	36,0	28,6	15,0	85,0	27,0	121,6

Таблиця 3 (продовження)

				TKW (г)		Суміш % за кількістю зерен		Маса суміші (г)	
Пункт	Вид	Партнери суміші	Розташу- вання	вкрите лушп.	вільно обмол.	вкрите лушп.	вільно обмол.	вкрите лушп.	вільно обмол.
3	Овес	Scorpion-Samuel	GA	39,7	26,6	15,0	85,0	29,8	113,1
4	Пшениця	Badenstern-Tabasco	GA	168,0	47,0	15,0	85,0	126,0	199,8
5	Пшениця	Badenkrone-Genius	GA	160,6	47,6	15,0	85,0	120,5	202,3

Таблиця 4 показує цільові фракції після просіювання зразка 100 г. У цільовій фракції підраховували кількість вкритих лушпинням та вільно обмолочуваних зерен. Існувала можливість збагачення цільової фракції для всіх видів та умов до рівня, вищого за необхідний поріг у 90%. У ячмені чистота цільової фракції коливалася від 90% до 95%. Чистота для вівса коливалася від 94% до 96%. Найкращі результати розділення вкритих лушпинням та вільно обмолочуваних зерен виявлялися для пшениці. Чистота цільової фракції у пшениці в обох парах Badenstern-Tabasco та Badenkrone-Genius становила більше за 99%.

Таблиця 4

Чистота цільової фракції при розділенні сумішей вкритих лушпинням та вільно обмолочуваних зерен після одного етапу просіювання. Просіювання 100 г суміші насіння. Верхня фракція = цільова фракція для ячменю: збирали зерна, які не пройшли крізь сито. Нижня фракція = цільова фракція для пшениці та вівса: збирали зерна, які пройшли крізь сито.

П.	Вид	Партнери суміші	Розташ.	Сито та фракція	Маса (г)	Кількість зерен, вкритих лушпинням	Кількість вільно обмолочув. зерен	% чистоти цільової фракції після просіювання (кільк. зерен)
1	Ячмінь	Henrike-Pastello	BO	2,7 мм Верхня фракція	89,2	1465	90	94,2%
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	BO	2,7 мм Верхня фракція	90,5	1568	133	92,2%
3	Овес	Scorpion-Samuel	BO	2,6 мм Нижня фракція	79,2	162	2663	94,3%
1	Ячмінь	Henrike-Pastello	GA	2,6 мм Верхня фракція	83,9	1482	111	93,0%
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	GA	2,7 мм Верхня фракція	69,3	1213	61	95,2%
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	GA	2,6 мм Верхня фракція	81,9	1408	155	90,1%
3	Овес	Scorpion-Samuel	GA	2,6 мм Нижня фракція	79,7	116	2913	96,2%
4	Пшениця	Badenstern-Tabasco	GA	3,0 мм Нижня фракція	61,4	2	1305	99,8%

Таблиця 4 (продовження)

П.	Вид	Партнери суміші	Розташ.	Сито та фракція	Маса (г)	Кількість зерен, вкритих лушпинням	Кількість вільно обмолочув. зерен	% чистоти цільової фракції після просіювання (кільк. зерен)
5	Пшениця	Badenkrone-Genius	GA	3,0 мм Нижня фракція	62,7	5	1313	99,6%

Таблиця 5 показує чистоту цільової фракції до та після просіювання змішаних зразків.

Таблиця 5

Ефективність просіювання зразка суміші вкритих лушпинням та вільно обмолочуваних зерен різних видів

					% чистоти цільової фракції (кількість зерен)	
П.	Вид	Партнери суміші	Розташ.	Сито та фракція	До просіювання	Після просіювання
1	Ячмінь	Henrike-Pastello	BO	2,7 мм Верхня фракція	85%	94,2%
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	BO	2,7 мм Верхня фракція	85%	92,2%
3	Овес	Scorpion-Samuel	BO	2,6 мм Нижня фракція	85%	94,3%
1	Ячмінь	Henrike-Pastello	GA	2,6 мм Верхня фракція	85%	93,0%
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	GA	2,7 мм Верхня фракція	85%	95,2%
2	Ячмінь	Westminster-Pastello	GA	2,6 мм Верхня фракція	85%	90,1%
3	Овес	Scorpion-Samuel	GA	2,6 мм Нижня фракція	85%	96,2%
4	Пшениця	Badenstern-Tabasco	GA	3,0 мм Нижня фракція	85%	99,8%
5	Пшениця	Badenkrone-Genius	GA	3,0 мм Нижня фракція	85%	99,6%

5

Вкрите лушпинням та вільно обмолочуване насіння відрізняються за кольором. Різниця у кольорі зерен дозволяє особам, які здійснюють обробку насіння, видаляти додаткові зерна запилювача за допомогою сортувальних машин.

Таким чином, шляхом комбінування простих технологій просіювання зі стандартними технологіями сортування за кольором можна збагатити фракцію насіння F1, зібраного зі змішаної плантації, до більш, ніж 99%.

Приклад 2: Відокремлення зібраних сумішей насіння зі смугових плантацій

Комерційні сорти вкритої лушпинням та вільно обмолочуваної пшениці (Таблиця 6) вирощували у місці D-78224, Болінген. Планування поля показано у таблиці 7. Для ефективного застосування гаметоциду необхідним є рядове висівання. По боках рядів материнського матеріалу розташовувалися ряди запилювача. Оскільки це була маломасштабна демонстрація, засівали ряди по 1,0 м завдовжки, застосовуючи сівалку, якою користуються селекціонери рослин. Таким чином одна ділянка складалася з трьох рядів.

15

Таблиця 6

Батьківські рослини

Материнський матеріал пшениця (Triticum aestivum) вільно обмолочувана	Запилювач пшениця спельта (Triticum Spelta) вкрита лушпинням
Egoist	Badenstern
Meister	
Tobak	

Таблиця 7

Планування поля

Номер ряду	1	2	3
Проміжок (м)	0,2	0,4	0,2
Довжина ряду (м)	1	1	1
Обробка гаметоцидом	ні	так	ні
Вид	Triticum Spelta	Triticum aestivum	Triticum Spelta
Батьківська рослина	Запилювач	Материнський матеріал	Запилювач
Комбінація 1	Badenstern	Egoist	Badenstern
Комбінація 2	Badenstern	Meister	Badenstern
Комбінація 3	Badenstern	Tobak	Badenstern

У відповідний час включали чоловічу стерильність материнського матеріалу (середній ряд) через обробку гаметоцидом (наприклад, Genesis) згідно з інструкцією для гаметоциду. Успішне включення чоловічої стерильності материнського матеріалу перевіряли шляхом поміщення у пакети окремих колосків у ряді з материнським матеріалом. Поміщені у пакети окремі колоски не демонстрували зав'язування насіння.

Усі три ряди збирали разом. Зібране насіння очищали від бруду та іншого небажаного матеріалу шляхом провіювання.

Часткові вибірки по 80 г сумішей з ділянки піддавали простому просіюванню, застосовуючи лабораторну просіювальну машину "Pfeuffer Sortimat", оснащену різними ситами по 3,0, 2,8, 2,7 та 2,5 мм завширшки, відповідно, та 20 мм завдовжки. Просіяні фракції зважували й сортували вручну з метою визначення кількості вкритого лушпинням та вільно обмолочуваного насіння, відповідно.

Завдяки будові вкритого лушпинням порівняно з вільно обмолочуваним насінням пшениці, відокремлення було успішним вже при застосуванні сита 3,0 мм після одного етапу просіювання, і досягалася чистота понад 99% для насіння, зібраного з материнського матеріалу.

Таблиця 8

Просіювання зібраних сумішей насіння F1

Комбінац.	Матер. матеріал	Запилювач	Врожай суміші материнського матеріалу та запилювача (г)	Маса запилювача після просіювання (сито 3,0 мм) (г)	Маса материнського матеріалу після просіювання (сито 3,0 мм) (г)	Чистота материнського матеріалу після просіювання (% кількість зерен)
1	Egoist	Badenstern	164	123	41	99,1
2	Meister	Badenstern	141	114	27	99,8
3	Tobak	Badenstern	180	136	44	99,4

Таким чином, при застосуванні простих технологій просіювання існує можливість збагачення фракції насіння пшениці F1, зібраного у суміші з рядової плантації, до більш, ніж 99%.

Приклад 3: Одержання гібридного насіння пшениці шляхом використання вкритих лушпинням запилювачів, причому материнський матеріал демонструє цитоплазматичну чоловічу стерильність (CMS) і являє собою вільно обмолочувану гексаплоїдну зимову пшеницю.

А-лінію з пилюковою стерильністю "CMS-WW005" (*Triticum aestivum*) використовували як материнський матеріал. Ця лінія демонструє цитоплазматичну чоловічу стерильність (CMS). Ця лінія є вільно обмолочуваною гексаплоїдною зимовою пшеницею. Вирощування гібридів здійснювали на змішаних ділянках у теплиці у Гатерслебені. Материнський матеріал запилювали шляхом вільного запилення запилювачами сорту Badenstern або Badenkronen (*Triticum Spelta*). Badenstern або Badenkronen є повністю плодючими запилювачами з зернами, які не є вільно обмолочуваними (вкриті лушпинням). Інше гібридне насіння одержували на змішаних ділянках у контрсезонному розсаднику у Потчефструмі / Південна Африка. Співвідношення змішування становило 50% материнського матеріалу та 50% запилювача для забезпечення достатньої кількості пилюки. Розмір ділянки в усіх місцях становив 1 м * 1,2 м, з чотирма рядами у Гатерслебені та трьома рядами у Потчефструмі.

Таблиця 1

Батьківські рослини

Материнський матеріал пшениця (<i>Triticum aestivum</i>) вільно обмолочувана	Запилювач пшениця спельта (<i>Triticum Spelta</i>) вкрита лушпинням	Вирощувані у Гатерслебені (теплиця)	Вирощувані у Потчефструмі
CMS-WW005	Badenstern	Так зразок 1	Так зразок 2
CMS-WW005	Badenkronen	ні	Так, але без продуктування насіння F1 зразок 4
-----	Badenstern	Так зразок 3	ні

У відповідний час чоловічу стерильність материнського матеріалу перевіряли шляхом поміщення у пакети окремих колосків материнських рослин. Поміщені у пакети окремі колоски не демонстрували зав'язування насіння.

В обох місцях зерно на ділянках збирали й молотили. Зібране насіння очищали від бруду та іншого небажаного матеріалу шляхом провіювання. Насіння з контрсезонного розсадника надсилали до Гатерслебена для подальшого дослідження. Зразок 4, тобто, врожай з розсадника CMS-WW005 * Badenkronen у Потчефструмі, не містив насіння F1, а лише інбредне насіння з запилювача, оскільки відповідність пари була недостатньою (завелика різниця у часі цвітіння материнського матеріалу та матеріалу запилювача), і материнські рослини не запилювалися. Зразок 3 містив лише інбредне насіння з запилювача Badenstern і був зібраний у Гатерслебені з метою порівняння.

Часткові вибірки по 80 г зразків піддавали простому просіюванню, застосовуючи лабораторну просіювальну машину "Pfeuffer Sortimat", оснащену різними ситами по 3,0, 2,8, 2,7 та 2,5 мм завширшки, відповідно, та 20 мм завдовжки. Просіяні фракції зважували й сортували вручну з метою визначення кількості вкритого лушпинням та вільно обмолочуваного насіння, відповідно.

Завдяки будові вкритого лушпинням порівняно з вільно обмолочуваним насінням, відокремлення було дуже успішним при застосуванні сита 3,0 мм після одного етапу просіювання, і одержували фракцію з понад 90% вільно обмолочуваних зерен (Таблиця 2). Ця фракція все ще містила розламані оболонки вкритого лушпинням насіння, які легко піддавалися видаленню за допомогою зерноочисної машини (аспіратора) на другому етапі (Таблиця 2). В результаті цього другого етапу одержували 100% насіння вільно обмолочуваного фенотипу. Більш уважний візуальний огляд вільно обмолочуваного насіння виявляв, що деякі з зерен мали тонший розмір, таким чином, нагадуючи не вкриті лушпинням зерна *T. Spelta* (25 та 6 зерен у зразку 1 та зразку 2, відповідно, дані не показано). Це привело до висновку, що надмірно

жорсткий процес обмолочування частково руйнував деяке лушпиння запилювача і спричинював вивільнення деяких зерен спелти. Цей висновок було підтверджено шляхом оцінки просіювання насіння, зібраного з чистого запилювача Badenstern або Badenkrone, як показано у зразку 3 та зразку 4 (Таблиця 3). Серед 1877 вкритих лушпинням зерен T. Spelta (запилювача) було виявлено 30 вільно обмолочуваних зерен (1,6%). Таким чином, сортування суміші з застосуванням сит, аспілятора та фотосепаратора в результаті забезпечує ступінь очищення 97-98%. Цей показник значно перевищує рекомендовану гібридність принаймні 90% (OECD SEED SCHEMES 2014: OECD Schemes for the Varietal Certification or the Control of Seed Moving in International Trade, ANNEX VIII, pages 99 - 101, OECD 2014, http://www.oecd.org/tad/code/1_complete%20document.pdf).

Таблиця 2

Сортування сумішей зібраного насіння F1.
Результати першого етапу просіювання, при якому фракція 2 містила вільно обмолочуваний та вкритий лушпинням типи (*), результати фракції FT другого етапу сортування.

Зразок	Вихід суміші материнського матеріалу та запилювача (г)	Маса фракції 1 Елементи, більші за 3,0 мм у діаметрі (вкриті лушпинням насіння) (г)	Маса фракції 2 Елементи, менші за 3,0 мм у діаметрі (здебільшого вільно обмолоч. насіння) (г)	Чистота фракції 2* після 1-го етапу %	Маса фракції FT після 2-го етапу сортування: елементи, менші за 3,0 мм у діаметрі (лише вільно обмолоч. насіння) (г)	Чистота фракції FT після 2-го етапу %
Зразок 1	245,6	178,6	67	90 %	46	97,8%
Зразок 2	124,1	108,7	15,4	90 %	10,2	98,5%

N.b.: у Потчефструмі TKW становила лише 26 г, тоді як у Гатерслебені TKW становила 40,3 г.

Таблиця 3

Сортування насіння запилювача за допомогою сита, віялки та фотосепаратора

Зразок	Вихід запилювача (г)	Кількість вкритого лушпинням насіння	Кількість вільно обмолочуваних елементів	Відсоток хибно позитивних вільно обмолочуваних, %
Зразок 3	201	1877	30	1,6%
Зразок 4	49,5	515	25	4,9%

Таким чином, з застосуванням простих технологій існує можливість збагачення фракції насіння F1 пшениці, зібраного у суміші, до більш, ніж 97%.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб відокремлення гібридного насіння ячменю, вівса або пшениці від суміші, яка включає вищезгадане гібридне насіння та інбредне насіння вищезгаданих ячменю, вівса або пшениці, який включає:

(а) забезпечення суміші насіння ячменю, вівса або пшениці, одержаного шляхом міжрядного висівання комбінації рослин, яка включає материнський матеріал з чоловічою стерильністю або умовною чоловічою стерильністю та запилювач з чоловічою плодючістю, причому вищезгадані материнський матеріал та запилювач продукують принаймні два типи насіння, принаймні один з яких є вищезгаданим гібридним насінням, і вищезгадані принаймні два типи насіння мають різні фенотипи, які забезпечують можливість відокремлення вищезгаданого гібридного насіння неінвазивними способами на основі відмінностей у вищезгаданих фенотипах, причому вищезгадані різні фенотипи визначаються алелем або комбінацією алелів в одному або кількох генетичних локусах, де вищезгадані алель або комбінація алелів в одному або кількох

генетичних локусах вибрані із алелів гена Q, Tg або Sog в пшениці, гена Nud в ячмені або гена N-1, N-2, N-3 або N-4 у вівсі, причому вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для першого алеля або комбінації алелів у вищезгаданих одному або кількох генетичних локусах, в результаті чого утворюється перший фенотип, а вищезгаданий запилювач є гомозиготним для другого алеля або комбінації алелів у вищезгаданих одному або кількох генетичних локусах, в результаті чого утворюється другий фенотип; де вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для одного алеля або комбінації алелів в одному або кількох генетичних локусах, причому принаймні один з вищезгаданих алелів у вищезгаданому материнському матеріалі є домінантним або частково домінантним, а вищезгаданий запилювач є гомозиготним для одного алеля або комбінації алелів у вищезгаданих одному або кількох генетичних локусах, причому принаймні один з вищезгаданих алелів у вищезгаданому запилювачі є рецесивним або частково рецесивним; і де вищезгадана комбінація рослин характеризується тим, що:

(i) вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому материнському матеріалі проявляється у насінні з вільнообмолочуваним фенотипом, і вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому запилювачі проявляється у насінні з вкритим лушпинням фенотипом; або

(ii) вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому материнському матеріалі проявляється у насінні з вкритим лушпинням фенотипом, і вищезгаданий один алель або комбінація алелів в одному або кількох генетичних локусах у вищезгаданому запилювачі проявляється у насінні з вільнообмолочуваним фенотипом;

(b) відокремлення вищезгаданого гібридного насіння із застосуванням способу відокремлення на основі відмінностей у розмірі зерен.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вищезгадане висівання включає рядове або смугове висівання, або змішане міжрядне висівання.

3. Спосіб відокремлення гібридного насіння ячменю, пшениці або вівса від суміші вищезгаданого гібридного насіння та інбредного насіння, який включає забезпечення вищезгаданої суміші, причому зародки вищезгаданого гібридного насіння мають генотип, який включає одну копію гаплоїдного геному материнського матеріалу та одну копію гаплоїдного геному запилювача, причому зародки вищезгаданого інбредного насіння мають генотип, який включає дві копії гаплоїдного геному запилювача, вищезгаданий материнський матеріал має чоловічу стерильність або умовну чоловічу стерильність, і вищезгаданий запилювач має чоловічу плодючість, який характеризується тим, що:

(a) вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для насіння з вільнообмолочуваним фенотипом, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для насіння з вкритим лушпинням фенотипом, або

(b) вищезгаданий материнський матеріал є гомозиготним для насіння з вкритим лушпинням фенотипом, і вищезгаданий запилювач є гомозиготним для насіння з вільнообмолочуваним фенотипом;

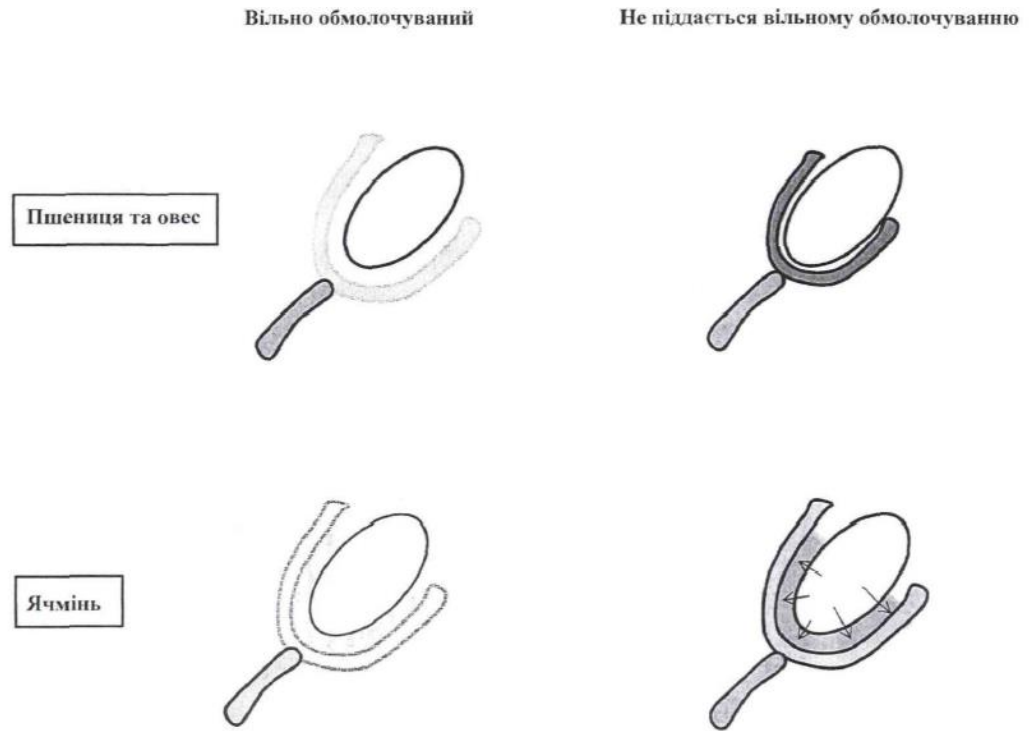
причому спосіб включає застосування для вищезгаданої суміші насіння засобу для відокремлення за розміром зерен, де вищезгаданий вільнообмолочуваний фенотип або вкритий лушпинням фенотип характеризується присутністю одного алеля або комбінації алелів в одному або кількох генетичних локусах, що вибрані із алелів гена Q, Tg або Sog в пшениці, гена Nud в ячмені або гена N-1, N-2, N-3 або N-4 у вівсі.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що вищезгаданим злаком є пшениця, і вищезгаданий материнський матеріал є вибраним із підвиду *vulgare host* виду *Triticum aestivum* L., підвиду *compactum* виду *Triticum aestivum* L., підвиду *sphaerococcum* виду *Triticum aestivum* L., підвиду *petropavlovskyi* виду *Triticum aestivum* L. та підвиду *tibetianum* виду *Triticum aestivum* L.

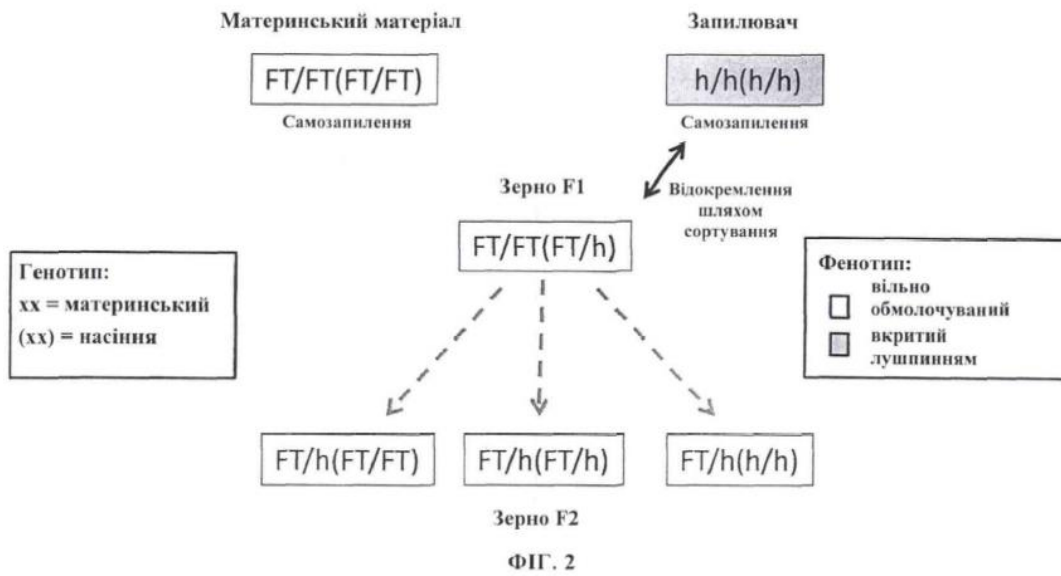
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що вищезгаданим злаком є пшениця, і вищезгаданий запилювач є вибраним із підвиду *spelta* виду *Triticum aestivum* L., підвиду *macha* виду *Triticum aestivum* L., підвиду *vavilovii* виду *Triticum aestivum* L., підвиду *yunnanense* виду *Triticum aestivum* L., та напівдикої форми виду *Triticum aestivum* L., підвиду *tibetianum*.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що вищезгаданим злаком є пшениця дурум і вищезгаданий материнський матеріал є вибраним із підвиду *durum* Desf. виду *T. turgidum* L. та підвиду *parvicoccum* виду *T. turgidum* L., а вищезгаданий запилювач є вибраним із підвиду *dicoccum* (двозернянка) виду *T. turgidum* L. та підвиду *dicoccoides* виду *T. turgidum* L.

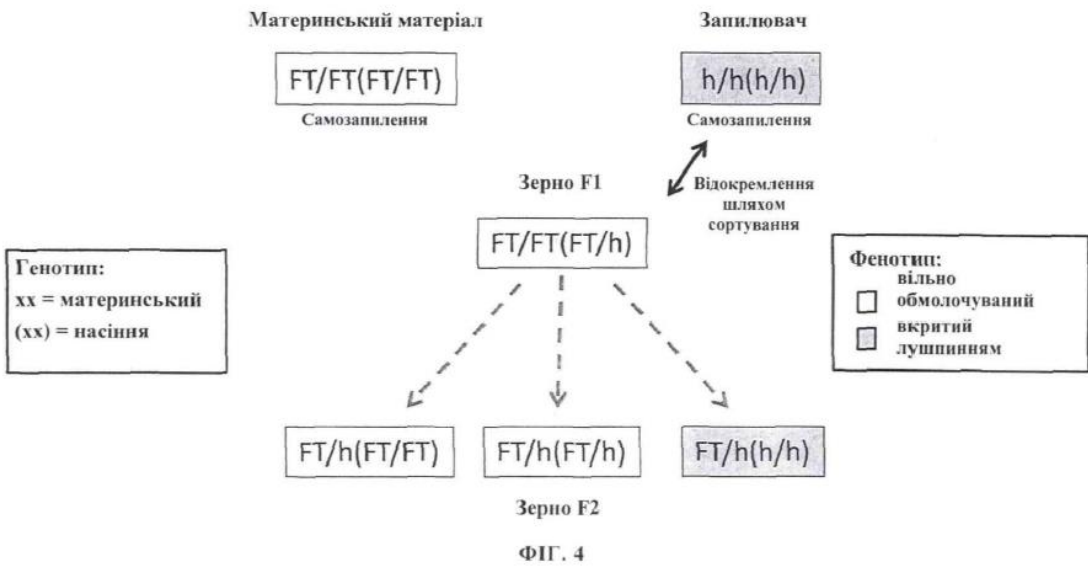
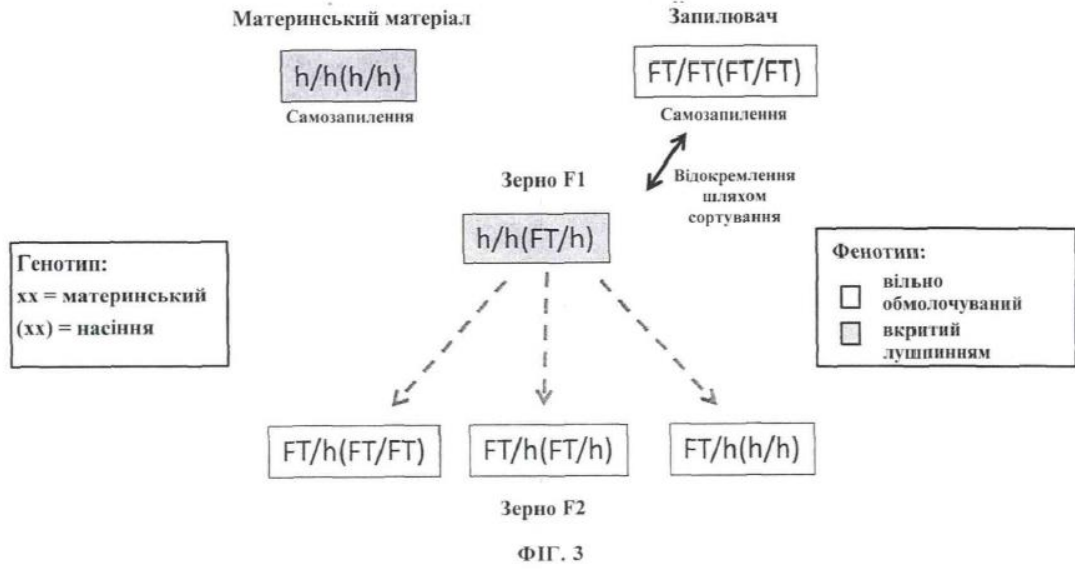
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що гени, які визначають вищезгаданий вкритий лушпинням фенотип, успадковуються рецесивно.

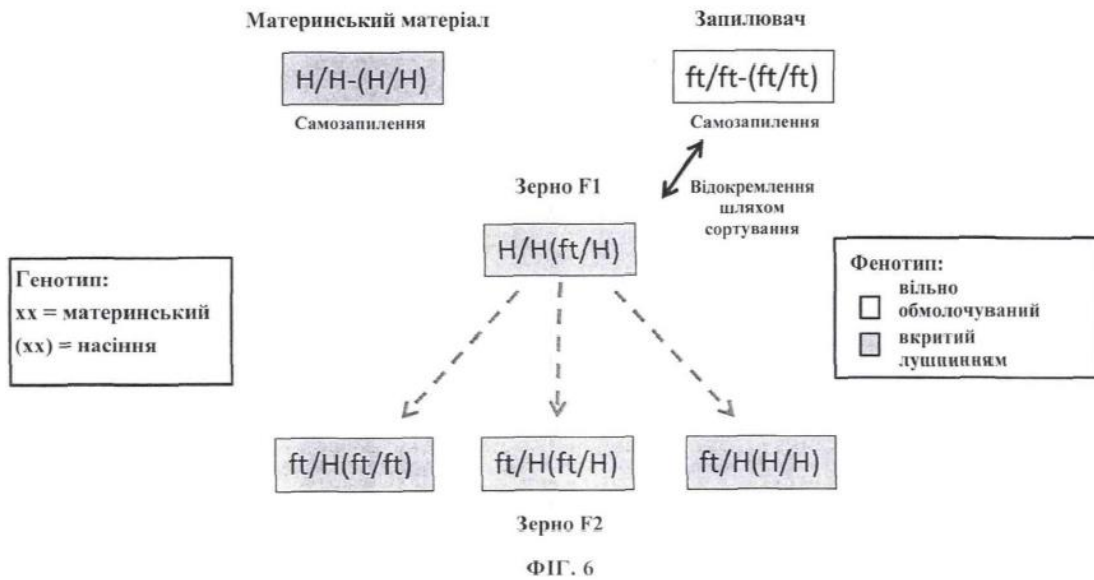
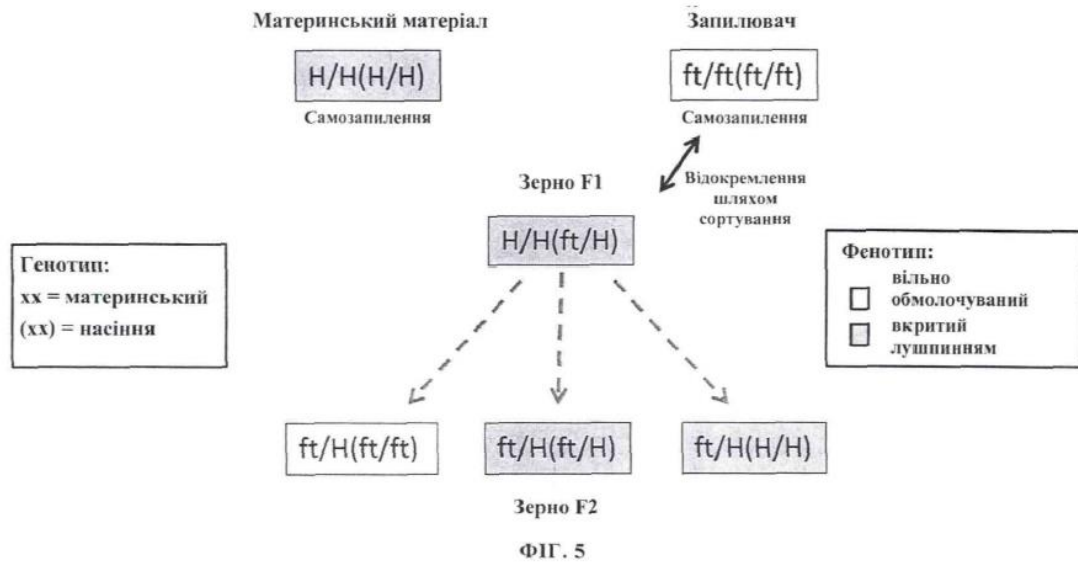


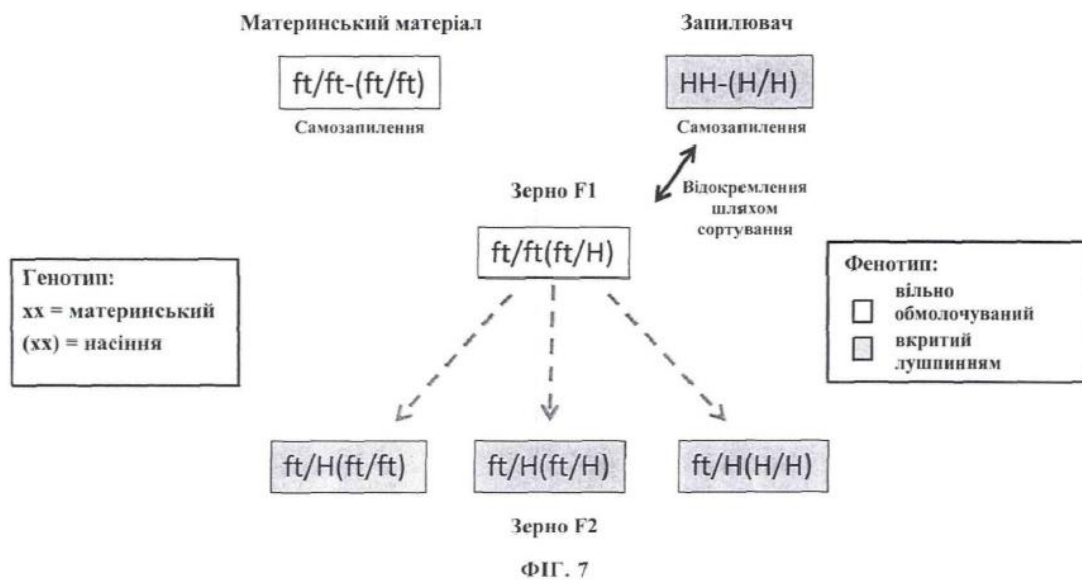
ФІГ. 1



ФІГ. 2







Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601