



УКРАЇНА

(19) **UA**(11) **126273**(13) **C2**

(51) МПК

A01H 1/02 (2006.01)**A01H 6/46** (2018.01)**A01H 6/54** (2018.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2018 00569	(72) Винахідник(и):	Крон Тодд (US)
(22) Дата подання заявки:	24.06.2016	(73) Володілець (володільці):	АКСЕЛЕРЕЙТЕД ЕЙДЖІ ТЕКНОЛОДЖІЗ, ЕЛЕЛСІ,
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	15.09.2022		2302 S.E. Creekview Drive, Suite 6, Ankeny, IA 50021, United States of America (US)
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	62/184,596, 62/269,514, 62/269,531, 62/269,496	(74) Представник:	Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	25.06.2015, 18.12.2015, 18.12.2015, 18.12.2015	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	SU 1061770 A1, 23.12.1983 WO 2013070846 A1, 16.05.2013 US 4087937 A, 09.05.1978 CA 966734 A, 29.04.1975
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US, US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.06.2018, Бюл.№ 11		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	14.09.2022, Бюл.№ 37		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2016/039339, 24.06.2016		

(54) ВИРОБНИЦТВО НАСІННЯ**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу вибору призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи, які сприйнятливі до отримання пилку, як готових до цільового перехресного запилення пилком призначених чоловічих рослин і, таким чином, придатні для виробництва необхідного гібридного насіння, де призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи, які включають жіночі компоненти, піддають впливу небажаного пилку.

UA 126273 C2

ВИРОБНИЦТВО НАСІННЯ

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Ця заявка заявляє пріоритет для Попередньої заявки США за реєстраційним номером 62/184,596, поданої 25 червня 2015 р., під назвою "ВИРОБНИЦТВО НАСІННЯ" та Попередньої заявки США за реєстраційним номером 62/269,496, поданої 18 грудня 2015 р., під назвою "ВИРОБНИЦТВО НАСІННЯ" та Попередньої заявки США за реєстраційним номером 62/269,531, поданої 18 грудня 2015 р., під назвою "ВИРОБНИЦТВО ЗЕРНА" та Попередньої заявки США за реєстраційним номером 62/269,514, поданої 18 грудня 2015 р., під назвою "ВИРОБНИЦТВО ЗЕРНА". Зміст попередніх заявок США під реєстраційними номерами 62/184,596; 62/269,496; 62/269,531; та 62/269,514, таким чином, включається у повному обсязі шляхом посилання.

ГАЛУЗЬ ВІНАХОДУ

Цей винахід в цілому стосується нового, виробленого на замовлення насіння та/або технології виробництва гібридного насіння (далі зазначається як "гібридне насіння"). Конкретніше цей винахід стосується технології виробництва гібридного насіння, яка не залежить від активного скидання пилку, чоловічої стерильності та/або фізичної ізоляції.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід має застосування у галузі виробництва насіння гібридних культур та практичної селекції рослин, включаючи, крім інших, кукурудзу, сою, пшеницю, рис, соняшник, канолу, сорго, бавовну, ячмінь, просо африканське, люцерну та інші рослини. Залежно від розташування репродуктивного органа та часу запліднення у рослин, багато видів покладаються на самозапилення з метою вироблення фертильного насіння. Без застосування певних форм механічного, фізичного або генетичного втручання для забезпечення чоловічої стерильності рослин багато рослин просто відтворюють генетику своїх батьківських рослин. Гібридні рослини є результатом запліднення, яке трапляється при схрещуванні джерела чоловічого пилку одного генетичного оточення з жіночими репродуктивними органами рослини з іншим генетичним оточенням. Гібридність серед культурних рослин зазвичай дає перевагу у врожайності при комерційному виробництві, тому, якщо це можливо, їй віддають перевагу перед відкритими або самозапилювальними способами виробництва комерційних культур. Як показано на Фігурі 1, врожайність культур починала помітно зростати з широким запровадженням гібридів у 1940 роки, і врожайність культур з часом продовжувала зростати аж до теперішнього часу. На даний час, кукурудза, рис, сорго, соняшник та канولا є основними культурами, які демонструють переваги гібридного насіння. Масштаби виробництва гібридного насіння інших культур, таких, як соя та пшениця, є дуже обмеженими через кількість ресурсів, які вимагаються для подолання перешкод, які виникають через біологічні особливості структури репродуктивних органів на відсутність ефективних способів забезпечення чоловічої стерильності. Великомасштабні процеси з виробництва гібридного насіння з сортів рослин, які зазвичай самозапилюються, є відсутніми або неефективними, але мали б велику цінність, якби були практично втілені. Широко відомо, що висівання та вирощування гібридного насіння забезпечує значно вищий потенціал насінної продуктивності порівняно з висіванням та вирощуванням самозапиленого або сортового насіння.

Фермери зазвичай мають бажання використовувати насіння на своїх полях невдовзі після ідентифікації нового сорту гібридного насіння. Відповідно, вимагається виробництво насіння. Нині більшість насіння представлено простими гібридами, а не подвійними гібридами, які широко застосовували на початку ХХ сторіччя. Однак можуть застосовуватися будь-які з них. Перехід до простих гібридів було здійснено через підвищену врожайність такого насіння. Потрібна величезна кількість землі для одержання всього насіння, якого фермери потребують щосезону. Для ефективного виробництва потрібного гібриду запилення повинно відбуватися за відповідною схемою, що вимагає чіткого контролю над джерелами пилку. Для цього часто вимагається запобігання самозапиленню зазначеної жіночої рослини. Як правило, це здійснюють шляхом викликання чоловічої стерильності. Наприклад, у кукурудзи жіночі батьківські рослини зазвичай позбавляють волотей. Щоправда, видалення волотей має свої недоліки. По-перше, воно є дорогим. По-друге, рослина пошкоджується, в результаті чого знижується врожай. Для усунення недоліків видалення волотей було запропоновано інші форми чоловічої стерильності. Прикладами можуть бути цитоплазматична чоловіча стерильність, генна чоловіча стерильність та хімічно індукована чоловіча стерильність. Усі вони мають недоліки.

Відповідно, для культур, стосовно яких виробництво гібридів є звичною практикою, поточні способи виробництва гібридного насіння відрізняються за видами, але зазвичай включають такі компоненти: (1) висаджування жіночих та чоловічих батьківських рослин на виробничій ділянці з близьким розташуванням одна до одної; (2) розташування виробничої ділянки в ізолюваному місці для зменшення впливу інших сторонніх або небажаних рослин одного виду та (3) надання

певної форми чоловічої стерильності жіночим рослинам для того, щоб жіночі батьківські рослини набули чоловічої стерильності, що дозволяє уникати можливого самозапилення, яке зрештою забруднює гібридне насіння. Основний спосіб виробництва гібридного насіння кукурудзи з застосуванням цих трьох компонентів не змінився з часів першого комерційного застосування гібридної кукурудзи наприкінці 1920 років (Russell, W.A. (1974) *Proceedings of the Annual Corn and Sorghum Industrial Research Conference* 29: 81-101). У виробництві гібридного насіння термін "забруднення" стосується насіння, яке не містить потрібного або передбаченого генетичного схрещування між жіночими батьківськими та чоловічими батьківськими рослинами. Забруднення може бути результатом самозапилення з боку жіночої рослини або ж може бути результатом запилення жіночої рослини пилом від непередбаченої чоловічої батьківської рослини. Це може бути результатом переміщення пилку в повітрі або через комах, диких тварин, людей, транспортні засоби або інші можливі переносники пилку, які потрапляють на поле для вирощування або перебувають у достатній близькості до жіночих рослин, щоб випадково перенести пилку.

Існують перешкоди для успішного здійснення ізоляції виробничих ділянок, уникнення випадків небажаного запилення та надання чоловічої стерильності. Забезпечення ділянки землі, яка є відокремленою достатньо великою відстанню від інших рослин одного виду, є важким і іноді недосяжним. Таким чином, доволі часто трапляються ситуації, коли поле є незахищеним від небажаного пилку, через що забруднюється певний відсоток насіння, вирощуваного на полі. Способи чоловічої стерильності включають генетичну стерильність, фізичне або механічне видалення чоловічої частини репродуктивної ділянки рослин, які передбачено використовувати як жіноче джерело, або хімічний гаметоцид, який знищує чоловічі гамети. Фізичні та механічні способи є дуже дорогими, а хімічні гаметоциди є дорогими і/або не дуже ефективними. Генетичну чоловічу стерильність у формі цитоплазматичної чоловічої стерильності широко застосовують для деяких культур, таких, як канولا та соняшник, але її застосування є обмеженим для інших культур, таких, як кукурудза та рис, через те, що не вся зародкова плазма є сумісною (Beckett, J.B. (1971) *Crop Sci.* 11: 724-727; Duvick, D.N. (1965) *Advances in Genetics* 13: 1-56). Способи ядерної генетичної чоловічої стерильності здебільшого ще розробляються у галузі виробництва насіння, і лише кілька форм мають комерційне застосування, але вони застосовуються на незначній частці площ для гібридного виробництва. Хоча генетичним способом чоловічої стерильності віддають перевагу перед фізичними / механічними та хімічними засобами, їх застосування все ж вимагає значних ресурсів, вони ускладнюють створення сукупності ознак та надходження продуктів на ринок у найкоротші терміни і іноді повинні проходити через складні глобальні регуляторні системи (для тих, які вимагають ГМО). За своєю природою всі способи надання чоловічої стерильності рослинам мають спільний знаменник, який полягає в тому, що вони потребують великих витрат та/або ресурсів, а також обмеження продуктів або строків продукування для належного виконання.

Кілька економічно важливих культур у даний час не можуть вирощуватись як гібриди (включаючи, крім інших, сою та пшеницю), оскільки не існує ефективного способу надання чоловічої стерильності, і/або види настільки активно самозапилюються, і пилку переміщується на такі короткі відстані, що навіть при чоловічій стерильності малоімовірним є успішне перехресне запилення, що в результаті призводить до зниження виходу перехресно запиленого гібридного насіння і робить виробництво гібридів економічно нездійсненним. Крім сої, пшениця є ще однією цінною культурою, успішність виробництва гібридного насіння якої на даний час є обмеженою. В цілому в насінництві активно дотримуються способів, які дозволяють здійснювати або поліпшувати виробництво гібридних культур переважної більшості культурних видів завдяки значному підвищенню врожайності та ефективності селекції, які забезпечуються системами гібридних культур.

Стосовно культур, для яких уже застосовують виробництво гібридів (наприклад, кукурудзи, соняшника), цей винахід повністю або частково усуває потребу або знижує залежність від усіх трьох витратних та залежних від ресурсів компонентів, які вже згадувалися: висаджування чоловічих рослин поблизу від жіночих, ізоляції та чоловічої стерильності. Один широко застосовуваний спосіб створення гібридних рослин кукурудзи полягає у висаджуванні чоловічих та жіночих батьківських рослин у безпосередній близькості одне до одного, причому кожна батьківська рослина має відповідну генетичну будову для створення оптимального гібридного насіння. Як обговорюватиметься детальніше далі, кожна рослина здатна вносити як чоловічі, так і жіночі гамети для продукування насіння. Відповідно, одна батьківська лінія має позначатись як така, що має відповідні властивості для застосування як чоловічого джерела, тоді як інші рослини мають позначатись як жіночі. Чоловічі рослини зазвичай вимагають належної здатності до скидання пилку, тоді як жіночі рослини повинні мати достатню відкритість

жіночих репродуктивних тканин, а також добру насінну продуктивність та інші бажані генетичні властивості. Згідно з широко практикованими способами, період скидання пилку з чоловічих рослин повинен припадати на період, у який жіноча рослина є найбільш фертильною. Чоловічі рослини зазвичай займають приблизно 30 % поля, причому цей показник збільшується до більшого відсотка у випадках, коли чоловічі рослини неактивно скидають пилок, тоді як жіночі рослини займають приблизно 70 % поля. Чоловічі рослини є присутніми лише для вироблення пилку для призначених жіночих рослин. Таким чином, земля, призначена для чоловічих рослин, є непродуктивною з точки зору показників виробництва насіння або продуктів харчування. Чоловічі рослини також споживають цінні ресурси, деякі з яких включають наявні мінерали та вологу. Крім того, рослини, які позначаються як чоловічі, повинні бути стерилізовані стосовно їхніх чоловічих характеристик з метою запобігання самозапиленню або запиленню іншими призначеними жіночими рослинами на полі.

Як стане зрозуміло спеціалістові у даній області, описане авторами практичне втілення винаходу забезпечує різні переваги, залежно від характеру культури. Наприклад, деякі культури мають високий ступінь самозапилення через те, що пилок вивільнюється у межах квітки навіть до розкриття квітки. Такі культури у природі демонструють дуже високі показники самозапиленого насіння. Практичне втілення винаходу може знизити відсоток самозапилення, але через самозапилення, що трапляється до розкриття квітки, показник успішних перехресних запиленів призначеним чоловічим пилом буде нижчим за показник у рослинах, які не мають самозапилення, яке відбувається у межах закритої квітки. Деякі культури не вимагають ізоляції на велику відстань для запобігання ауткросингу через характер культури та характеристики її пилку. У таких випадках практичне втілення даного винаходу не може впливати на будь-які вимоги щодо ізоляції, але все одно збільшить показник успішних перехресних запиленів призначеним чоловічим пилом, а також зменшить самозапилення. Відповідно, залежно від вирощуваної культури, практичне втілення винаходу може повністю або частково усунути потребу або зменшити залежність від будь-якого одного, будь-яких двох або усіх трьох витратних та залежних від ресурсів компонентів, які вже згадувалися: висаджування чоловічих рослин поблизу від жіночих, ізоляції та чоловічої стерильності.

Крім того, часто буває важко знайти достатню ізоляцію від сторонніх рослин одного виду, які можуть спричинити небажане перехресне запилення порівняно з цільовим перехресним запиленням. Забезпечення такої ізоляції також може бути дорогим. Наприклад, при виробництві гібридного насіння кукурудзи звичною практикою є оточення кукурудзи іншими культурами, такими, як соя, для досягнення достатньої ізоляції. Як показано на Фігурі 2, типове поле 100 для виробництва гібридного насіння кукурудзи зазвичай оточують приблизно 201-метровим (660-футовим) посівом сої 102 з усіх сторін з метою досягнення ізоляції. Посів сої позначено злегка затіненим зовнішнім квадратом на Фігурі 2. Внутрішнє поле 104 для виробництва гібридного насіння має межу з 4-8 рядів чоловічих батьківських рослин 106 з усіх сторін, як показано чорним квадратом на Фігурі 2. Найближчу до середини частина поля для виробництва гібридного насіння засівають рядами чоловічих батьківських рослин переміжно з жіночими батьківськими рослинами. На Фігурі 2 її показано загальною схемою з 2 рядами чоловічих рослин між 4 рядами жіночих рослин. Ця схема не є обмежувальною - застосовують багато схем, наприклад, з чоловічими рядами, розташованими між жіночими рядами зі звичайним інтервалом. Рослинники застосовують багато схем висівання, залежно від характеристик чоловічих та жіночих батьківських рослин та інших чинників, які можуть бути присутніми в даному місці. На Фігурі 2 показано поле, яке включає приблизно 35 % чоловічих батьківських рослин і 65 % жіночих батьківських рослин. На базі поля приблизно 610 метрів (2000 футів) завдовжки з шириною 800 рядів схема з Фігури 2 в результаті має площу приблизно 37 гектарів (92 акрів) поля для виробництва насіння, оточеного 65 гектарами (161 акрами) поля для вирощування сої, яке діє як ізоляція. Це вимагає значної площі землі для відносно малої ділянки під виробництво насіння. В інших прикладах полів для виробництва гібридного насіння можуть застосовуватися різні комбінації чоловічих та жіночих батьківських рослин, і вибір застосовуваної схеми часто залежить від характеристик батьківських рослин.

Практичне втілення цієї процедури у виробничому або комерційному масштабі є дорогим і часто недостатнім для забезпечення потрібної генетичної чистоти. Генетична чистота є мірою чистоти насіння. Якщо йдеться про гібридне насіння, генетична чистота є мірою насіння, яке має спрямоване генетичне схрещування між чоловічими та жіночими батьківськими рослинами і зазвичай виражається у відсотках. Насіння, одержане в результаті самозапилення (селфи) або запилення не передбаченим для цього пилом (ауткроси) вважається забруднювачем і на є гібридним насінням. Гібридне насіння кукурудзи зазвичай має 95 % генетичну чистоту (тобто, 95 % гібридного насіння), щоб продаватися як сертифіковане гібридне насіння. Сертифікація

насіння у США являє собою охоплюючу чотири покоління програму, відповідальність за яку покладається на кожен окремий штат, і в кожному штаті існує агентство, призначене для сертифікації насіння на основі закону про насіння, який діє в цьому конкретному штаті. Чотири покоління представляють селекційне насіння, насінний фонд, зареєстроване насіння та

5 сертифіковане насіння. Сертифіковане насіння одержують з насінного фонду або зареєстрованого насіння і воно є кінцевим продуктом охоплюючої чотири покоління програми сертифікації насіння. Хоча в кожному штаті діє власний закон про насіння, вимоги щодо 95 % генетичної чистоти є спільними для всіх штатів. Навіть за дотримання рекомендованої ізоляційної відстані небажаний пилок зазвичай забруднює поле через перенесення пилку з

10 інших розташованих поблизу полів вітром, комахами, та через інші природні чинники.

Серед способів викликання чоловічої стерильності у жіночих батьківських рослинах кукурудзи видалення волотей застосовують у більшості способів виробництва насіння у світі, і воно є досить дорогим через необхідність у ручній праці та/або дорогому обладнанні для видалення султанів з жіночих рослин. З часу широкого запровадження гібридів кукурудзи у

15 1930-х роках (Crow, J.F. (1998) *Genetics* 148: 923-928) виробництво насіння здебільшого відбувається у дуже подібний спосіб з застосуванням засівання ділянки з виробництва насіння з ізоляцією чоловічих рослин від жіночих та видалення волотей на жіночих рядах. Описаний авторами винахід має економічне значення, яке полягає в тому, що він може знизити собівартість проданих товарів (COGS) для процесу виробництва насіння. По-перше, винахід

20 дозволяє заощадити гроші, пов'язані з витратами на видалення волотей. Винахід може дозволяти видалення волотей в середньому на 50 % інтенсивності, яку на даний час застосовують. Якщо за поточну вартість видалення волотей взяти \$350/A (Draft Environmental Assessment [online], 2010. Pioneer Hi-Bred International, Inc. Seed Production Technology (SPT) Process DP-32138-1 Corn [знайдено 2016-06-19]. Знайдено у мережі Інтернет: <URL:

25 https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/08_33801p_fea.pdf>) та приблизно один мільйон акрів виробництва гібридного насіння лише у США (Weber et al., 2009. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193: 79-92), даний винахід мав би виражену у зниженні витрат на видалення волотей щорічну цінність для насінництва у \$175 мільйонів (\$350/акр x 50 % стандарт x 1 мільйон акрів). Крім того, додаткова цінність може бути досягнута шляхом зменшення відстані ізоляції та

30 зниження кількості чоловічих рослин, які вирощуються на полі для виробництва насіння. Генетичні способи чоловічої стерильності є дешевшими за видалення волотей, але все ж потребують суттєвих витрат у насінництві для розробки жіночих ліній з правильними генами/цитоплазмою з метою отримання дозволу від урядового регуляторного органу на використання генів, якщо вони вважаються ГМО, та впровадження продуктів з невеликою затримкою через графік процесу розробки. З цих причин генетичну чоловічу стерильність використовують у меншості від загальної кількості гібридних одиниць кукурудзи, які

35 виробляються у США. Подібним чином викликання хімічної чоловічої стерильності застосовують у кількох культурах, і воно вважається дорогим, відносно неефективним і не має широкого застосування.

Відповідно, у галузі існує потреба у винаході, який би зменшував вплив вищезгаданих недоліків або повністю їх усував. Такий винахід має знизити або повністю усунути потребу у вирощуванні чоловічих батьківських рослин у безпосередній близькості від жіночих батьківських рослин або зменшити кількість чоловічих батьківських рослин, яка вимагається. Крім того, винахід має усунути або суттєво зменшити потребу в засіванні поля для виробництва насіння

45 ізолювано від інших сторонніх рослин одного виду через більш контрольовані засоби процедур запилення. Подібним чином винахід має забезпечувати можливість скорочення відстаней ізоляції. Крім того, винахід має знизити або усунути вимогу застосування певної форми чоловічої стерильності у призначених жіночих батьківських рослинах з метою уникнення самозапилення, таким чином, значною мірою зменшуючи або повністю усуваючи трудомісткий

50 процес видалення волотей або застосування інших способів забезпечення чоловічої стерильності.

Крім того, для культур, які не можуть вирощуватись як гібриди або важко піддаються гібридизації через проблеми морфологічної структури або поточну практику селекції, даний винахід може забезпечувати можливість виробництва гібридного насіння, причому виробництва

55 у комерційних масштабах, з витратами, які роблять виробництво гібридів економічно обґрунтованим вибором для насінництва. Зусилля з гібридизації пшениці тривають понад 80 років з незначними успіхами у виробництві насіння з точки зору економічності, незважаючи на потенціал для збільшення врожайності від гетерозису пшениці, що становить понад 20 % (Pickett, A.A. (1993) *Adv. Plant Breed.*, Suppl. J. *Plant Breed.* 15: 1-259). Система, яка забезпечує

60 економічне виробництво гібридного насіння, така, як в описаному авторами винаході, мала б

величезну цінність. З врахуванням скромного підвищення врожайності у 10 % для гібридної пшениці порівняно з сортовою пшеницею і з врахуванням того, що одна третина площ під пшеницю має бути відведена під гібриди, річна цінність має становити \$4,3 мільярда у

5 основі глобального виробництва пшениці за 3014 р., яке становило 729MM метричних тонн (Продовольча й сільськогосподарська організація при ООН (FAOSTAT)), та товарної ціни на пшеницю \$180,32 за метричну тонну (ціна пшениці на 13 червня 2016 р. [онлайн, знайдено 2016-06-13] Знайдено в мережі Інтернет: < URL: <https://www.ams.usda.gov/market-news/livestock-grain-market-news-publications>>) (Розрахунок: \$180,32/MT x 729MM MT x 10 % підвищення

10 врожайності x 33 % запровадження гібриду). Ця сумарна величина є заниженою, оскільки вимоги у галузі насінництва є такими, щоб потенційний глобальний приріст вартості лише через продаж насіння при приблизно 33 % запровадженні гібридної пшениці становив приблизно \$3 мільярдів щороку (Syngenta Investor Day 2015 Presentation [online], стор. 20, [знайдено 2016-06-19]. Знайдено в мережі Інтернет: < URL: <http://www4.syngenta.com/~media/Files/S/Syngenta/events-and-presentations/plenary-presentation-rndday2015-trish-malarkey.pdf>>). Однак цифри у всесвітньому масштабі є значно більшими.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

Фігура 1: ця фігура показує збільшення середньої врожайності у бушелях на акр сортів кукурудзи у США з 1866 по 2011 рр. Джерело: розширений веб-сайт Університету штату Міссурі.

20 Фігура 2: ця фігура представляє вид згори типового кукурудзяного поля для виробництва гібридного насіння. Зовнішній затінений світлим квадрат являє собою ізоляційну межу, як правило, засіяну соєю. Внутрішній чорний квадрат представляє чоловічі батьківські рослини, і внутрішнє поле являє собою переміжне розташування рядів чоловічих та жіночих батьківських рослин.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

25 Забезпечується спосіб виробництва насіння, згідно з яким генетична чистота одержаного в результаті насіння поліпшується шляхом зниження забруднення, який включає вирощування призначеної жіночої батьківської рослини, яка включає як жіночі, так і чоловічі компоненти; навмисне запилення, одноразово або кількаразово, вищезгаданої призначеної жіночої

30 батьківської рослини пилком призначеної чоловічої рослини, коли вищезгадані чоловічі компоненти вищезгаданої призначеної жіночої батьківської рослини не вивільнюють життєздатний пилок, і коли інші біологічно сумісні джерела пилку також не вивільнюють життєздатний пилок; вирощування призначеної жіночої рослини до зрілості; та збирання насіння, виробленого вищезгаданою призначеною жіночою рослиною. Крім того, спосіб включає

35 зменшення або усунення потреби в одній або кількох з таких умов: чоловіча стерильність вищезгаданої призначеної жіночої рослини; фізична та/або часова ізоляція вищезгаданої призначеної жіночої рослини від будь-яких біологічно сумісних джерел пилку; та вирощування чоловічих рослин-запилювачів поблизу від вищезгаданої призначеної жіночої рослини.

40 Ще один варіант втілення винаходу включає застосування свіжого або консервованого призначеного пилку чоловічих рослин. Пилок може бути зібраним з одного або декількох полів, кліматичної камери, теплиці, оранжереї, тіньового будинку, аркової теплиці, установки для вертикального вирощування або гідропонної установки. Консервований пилок може зберігатися будь-якими засобами, які дозволяють зберігати його життєздатність, включаючи, крім інших, різні форми охолодження або заморожування, включаючи, крім інших, охолодження,

45 кріоконсервацію, висушування заморожуванням або зберігання у рідкому азоті. Крім того, пилок, свіжий або консервований, може бути зібраний з джерела зі змінним циркадним ритмом, джерела з нормальним циркадним цвітінням, але в якому розвиток вищезгаданих чоловічих компонентів вищезгаданих призначених жіночих батьківських рослин є затриманим, або джерела з нормальним циркадним цвітінням, у якому чоловічі компоненти призначених жіночих

50 батьківських рослин можуть скидати пилок без затримки. Пилок, свіжий або консервований, може бути зібраний з одного або кількох генетичних джерел і може бути скомбінований з пилком з інших генетичних джерел перед застосуванням.

У деяких варіантах втілення пилки чоловічих рослин більш, ніж одноразово наносять на ту саму призначену жіночу рослину. Варіанти втілення винаходу включають нанесення пилку призначених чоловічих рослин тоді, коли призначена жіноча батьківська рослина вперше стає

55 сприйнятливою до вищезгаданого пилку. Інший варіант втілення включає застосування обробки для затримки дозрівання чоловічих компонентів жіночої батьківської рослини.

Спосіб може бути застосований до широкого кола рослин, включаючи, крім інших, кукурудзу, сою, пшеницю, рис, соняшник, канолу, сорго, бавовну, ячмінь, просо африканське та люцерну.

60 Забезпечується спосіб виробництва насіння будь-якого виду рослин, причому спосіб

включає умисне нанесення призначеного чоловічого пилку на призначену жіночу рослину, причому призначена батьківська жіноча рослина перебуває у стані, коли жіночі компоненти є готовими до приймання пилку, але чоловічі компоненти не вивільнюють пилок. Крім того, призначена жіноча батьківська рослина не обов'язково має включати чоловічу стерильність і не

обов'язково має бути ізольована від джерел небажаного біологічно сумісного пилку. Нанесення призначеного чоловічого пилку здійснюють автоматизованими засобами, механічними засобами, ручними засобами, пневматичними засобами, з застосуванням позитивного тиску, негативного тиску, напіваавтоматичними засобами або з застосуванням їх комбінацій. Крім того, призначене джерело чоловічого пилку може бути взяте з попередньо законсервованого або щойно зібраного пилку з чоловічого вихідного матеріалу.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Далі представлено детальний опис втілення технології та способів, які забезпечують поліпшене виробництво гібридного насіння. Такі технологія та способи можуть застосовуватися для створення гібридного насіння з будь-яких рослин. Для полегшення обговорення та розуміння представлений нижче детальний опис часто стосується винаходу для застосування на кукурудзі. Слід зазначити, що технологія та способи можуть застосовуватися з будь-якими рослинами, що розмножуються насінням, і кукурудза або інші конкретно зазначені рослини обговорюються лише з ілюстративною метою, і обсяг винаходу ними не обмежується. Подібним чином технологія також може бути застосована для зниження забруднення та підвищення генетичної чистоти у виробництві батьківських рослин та/або виробництві насіння в цілому. Забруднення може бути знижене на будь-який відсоток, включаючи 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % або будь-який інший відсоток. В оптимальних варіантах втілення забруднення може бути знижене принаймні на 30 %, наприклад, на 30 % або більше, 40 % або більше, або 50 % або більше.

Насіння, включаючи гібридне насіння, виробляють для багатьох різних цілей. По-перше, насіння виробляють для різних дослідницьких цілей для оцінки значення нових генетичних комбінацій. Компанії з виробництва насіння витрачають мільярди доларів на дослідження з метою розробки поліпшеної генетики рослин. Ще однією метою виробництва гібридного насіння є комерційний продаж такого насіння виробникам сільськогосподарської продукції, наприклад, фермерам. Крім того, насіння виробляють для створення батьківського насіння, яке застосовують для вирощування батьківських рослин на полі для виробництва гібридного насіння. Цей винахід може застосовуватися для виробництва будь-якого гібридного або негібридного насіння, яке виробляють з будь-якою метою. Незалежно від кінцевого застосування насіння виробництво гібридного насіння залежить від відповідного чоловічого пилку, який запліднює відповідну жіночу рослину. Поліпшений спосіб виробництва гібридного насіння включає збирання, зберігання та доставлення пилку з чоловічих батьківських рослин до жіночих батьківських рослин. Деякі способи збирання пилку є відомими спеціалістам у даній галузі. Наприклад, у Патенті США 4,922,651 розкривається пристрій для здійснення або вдосконалення запилення рослин.

Крім того, деякі способи доставлення пилку, такі, як описаний у Патенті США 4,922,651, є відомими спеціалістам у даній галузі. Крім того, відомими є різні способи зберігання пилку. Наприклад, у Патенті США 5,596,838, який стосується способу та засобу підготування пилку до криогенного зберігання, зазначається, що пилок може зберігатися протягом періодів у кілька місяців і залишатися життєздатним. Хоча деякі способи доставлення пилку є відомими, ці способи не вказують, не пропонують і не мотивують користувача навмисно доставляти пилок таким чином, щоб усувалася потреба в ізоляції та/або чоловічій стерильності, яка завжди вимагається згідно з існуючим рівнем техніки для підтримки застосування у великомасштабних польових дослідженнях або виробництві комерційного гібридного насіння. Результатом здійснення даного винаходу є запилення, яке відбувається за межами активного періоду, в який рослини може бути піддана самозапиленню і/або зазнати небажаного запилення, а отже, не вимагає застосування чоловічої стерильності або ізоляції, хоча і те, й інше може бути застосоване без відхилення від обсягу винаходу. Крім того, у деяких рослин, таких, як пшениця, чоловічий пилок не переміщується на достатню відстань для ефективного виробництва гібридів (Loureiro, I. et al. (2007) *Euphytica* 156: 25-37; Dong, S. et al. (2016) *PLoS ONE* 11(3): e0151373. doi:10.1371/journal.pone.0151373). Даний винахід розв'язує цю існуючу в галузі проблему через покладання на умисне запилення, при якому пилок ефективно доставляється до жіночої батьківської рослини.

Як обговорювалося вище, даний винахід може застосовуватися до загальної практики висівання жіночого батьківського насіння, яке проростатиме й ставатиме насінними рослинами, які приносять гібридне насіння яке зрештою продаватиметься фермерам або іншим

клієнтам, або для виробництва насіння, призначеного для застосування у дослідницьких програмах. Однак замість висівання насіння чоловічої батьківської рослини у безпосередній близькості від жіночих рослин, як це практикується нині, даний винахід забезпечує вдосконалену альтернативу через застосування умисного нанесення чоловічого пилку на жіночі рослини у конкретний час. Застосування терміну "умисне" стосовно нанесення пилку означає конкретне нанесення пилку у спосіб, який не включає природне запилення через вітер, активність комах або інші природні умови. Умисно нанесеним пилком є пилко, який було нанесено на рослину в результаті умисних дій з боку людини, її рішення або втручання, і може бути нанесений вручну або іншими засобами. Одним з прикладів умисного нанесення пилку є "приписане" нанесення пилку, яке є застосуванням пилку для забезпечення конкретної потреби або умови у полі. Хоча оптимальним вважається конкретний час, як детально обговорюватиметься нижче, один аспект винаходу стосується переваги запилення у полі у будь-який час доби. В усіх аспектах винаходу пилко може бути одержаний з одного або кількох генетичних джерел.

Придбання чоловічого пилку [іноді зазначається, як "пилко^M"], який вимагається для одержання гібридного насіння, є можливим через банк пилку. Банк пилку є джерелом пилку, що зберігається, який було зібрано з одного або кількох джерел пилку і який зберігається таким чином, щоб пилко зберігав свою життєздатність. Рослини, які застосовують як джерело пилку для такого банку пилку, можуть бути вирощеними й зібраними у будь-яких умовах, включаючи, крім інших, поле, кліматичну камеру, теплицю, оранжерею, аркову теплицю, установку для вертикального вирощування або гідропонну установку. Пилко з банку пилку може надходити з джерел різними шляхами. Наприклад, в одному варіанті втілення свіжий пилко може бути зібраний з чоловічих рослин, вирощених у контрольованому середовищі, в якому циркадний ритм на 2-8 годин випереджає природний ріст жіночих рослин у полі. Цей спосіб детальніше описується нижче. В іншому варіанті втілення пилко, який зберігається у банку, може бути консервованим пилком, який було зібрано за кілька днів, тижнів, місяців або років до його кінцевого вилучення з банку з метою запилення. Консервований пилко може зберігатися будь-якими засобами, які дозволяють зберігати його життєздатність, включаючи, крім інших, різні форми охолодження або заморожування включаючи, крім інших, охолодження, кріоконсервацію, висушування заморожуванням або зберігання у рідкому азоті.

В одному або кількох варіантах втілення пилко може бути зібраний з пилякового блока. Пиляковий блок забезпечує оптимальні умови росту для репродуктивних тканин чоловічої рослини будь-якого виду або сорту. Тканини (наприклад, султани кукурудзи) зрізають з рослин, які ростуть у стандартних умовах на свіжому повітрі, наприклад, у полі, або з тих, які ростуть у регульованих умовах, наприклад, у теплиці або кліматичній камері. Тканини в оптимальному варіанті відрізають перед тим, як рослина починає скидати пилко, і поміщують у пиляковий блок. Потім тканину культивують у живильному середовищі, що забезпечує можливість подальшого росту. Принаймні один із чинників, до яких належать спеціальне освітлення, температура та/або вологість, циклічно застосовують у пиляковому блоці, що забезпечує можливість безперервного росту тканини. Ріст може модулюватися для прискорення або уповільнення швидкості росту, а отже, модулювання тривалості доступності пилку. Це дозволяє забезпечувати можливість отримання пилку для запилення за потребою, яке можна здійснювати у будь-який час дня або ночі. Це може стати у пригоді для забезпечення можливості запилення у кількох корисних і цінних процесах, пов'язаних з виробництвом насіння та зерна. Це також забезпечує концентровані джерела пилку для консервації. Будь-який пилко, зібраний з пилякового блока й законсервований, може використовуватись у такий самий спосіб, як і щойно зібраний пилко, але через тривалий час після загибелі свіжого пилку, який не було піддано консервації. (R.I. Greyson (1994) Maize inflorescence culture. p. 712-714. In: M. Freeling, V. Walbot (eds), The Maize Handbook; Springer-Verlag, New York; J.B. Schoper, R.J. Lamber, B.L. Vasilas, and M.E. Westgate (1987) Plant factors controlling seed set in maize. The influence of silk, pollen, and ear-leaf water status and tassel heat treatment at pollination, Plant Physiol. 83: 121-125).

Доставлення пилку^M, яке може здійснюватися механічними засобами, з застосуванням позитивного тиску, негативного тиску, пневматичними засобами або іншим чином, відбувається відразу після того, як жіночі рослини набувають сприйнятливості до пилку, що завжди відбувається до того, як пилко призначених жіночих батьківських рослин [який іноді зазначається, як пилко^F] набуває життєздатності у будь-який зазначений день, таким чином, забезпечуючи часове вікно, протягом якого може відбутись успішне перехресне запилення всіх сприйнятливих жіночих рослин. Іншими словами, жіночий компонент рослини є відкритим для приймання пилку від чоловічого до того, як чоловічий компонент тієї самої рослини фактично стає готовим до продукування пилку. У кукурудзи жіночі рослини є сприйнятливими до пилку до

формування приймочок і протягом багатьох днів після появи з-під листових обгортки. Крім того, у кукурудзи існує дві можливості: пилко може скидатися перед появою приймочок (протандрія), або поява приймочок може відбутися до скидання пилку (протогінія). У будь-якому разі, щойно приймочки набувають сприйнятливості, вони можуть приймати пилко до скидання пилку у певний день. Цей винахід може бути застосований до обох ситуацій. Крім того, у деяких прикладах приймочки є сприйнятливими до пилку протягом усього дня приблизно сім днів поспіль. Відповідно, пилко може бути умисно нанесений будь-яку кількість разів, включаючи, крім інших, раз на день, двічі на день або у безперервному режимі. Без застосування чоловічої стерильності пилко^F зазвичай починає скидатися у середні ранкові години і продовжує скидатися до пізнього ранку або раннього полудня, після чого весь пилко^F знаходить життєздатний жіночий орган і утворює зародки, забезпечуючи успішне самозапилення, або гине протягом 60 хвилин або менше, якщо не потрапляє на життєздатний жіночий орган (Luna V. et al. (2001) Crop Sci. 41(5): 1551-1557). Таким чином, жіноча рослина кукурудзи має щоденне часове вікно, протягом якого чоловічий пилко може доставлятися, і протягом якого пилко^F не скидається. Це вікно повторюється протягом кількох днів. Оскільки даний винахід дозволяє перехресно запилювати майже всі з життєздатних жіночих рослин протягом часового вікна, під час якого пилко^F не скидається або є нежиттєздатним, чоловіча стерильність не вимагається для уникнення самозапиленого насіння.

Відповідно, один аспект винаходу стосується регулювання часу доставлення пилку до жіночих батьківських рослин. В усіх культур існує щоденний цикл під час вікна для запилення (часу, протягом якого жіноча рослина є сприйнятною до пилку, і протягом якого може відбутися успішне запилення), коли жіночі рослини визрівають і ростуть відносно безперервно, тоді як чоловічі рослини мають чіткий цикл, коли пилко стає життєздатним і скидається або вивільнюється з пиляків, з раннього ранку і до пізнього ранку або раннього полудня. У деяких випадках пилко^F може стати життєздатним до набуття жіночими рослинами фертильності, але завжди є перший ранок, після якого життєздатні жіночі рослини стають фертильними до того, як життєздатний пилко^F починає скидатися у цей день. Таким чином, пилко^F, який міг бути скинутий попереднього дня, вже давно загинув і став нежиттєздатним ще до того, як жіночі рослини набули життєздатності наступного ранку. Таким чином, години від раннього ранку до середини ранку є ідеальними для нанесення пилку^M для вдалого перехресного запилення всіх життєздатних жіночих рослин безпосередньо перед тим, як пилко^F починає скидатися, хоча можливе й нанесення пилку за кілька днів до того, як пилко^F починає скидатися, або кілька разів на день або у безперервному режимі для збільшення ймовірності успішного створення чистого гібридного насіння. В одному прикладі пилко може доставлятися о 6:00 ранку. Однак доставлення пилку може відбуватися у будь-який час дня, що забезпечує велику перевагу перед традиційними способами. Таким чином, коли пилко^F починає скидатися, всі життєздатні жіночі рослини вже будуть запилені вибраним джерелом пилку, і пилко^F гине через короткий час, не знайшовши життєздатних жіночих рослин, що дозволяє уникати самозапилення жіночих рослин, які потребували певної форми чоловічої стерильності у попередніх гібридних системах. Різні види пилку мають різну тривалість життя, на що також можуть впливати умови середовища (Dafni, A. & D. Firmage (2000) Plant Systemics and Evolution 222 (1): 113-132). Висока вологість і знижена температура можуть подовжувати довговічність пилку. Наприклад, для рису (*Oryza sativa*) було виявлено, що тривалість життя пилку складає лише 4 хвилини (Koga et al. (1971) Cytologia 36: 104-110), або менше, ніж через 20 хвилин 50 % пилку гине (Khatum, S. and T.J. Flowers (1995) J. Exp. Bot. 46: 151-154). Натомість було продемонстровано, що пилко вирощуваного на полі редису (*Raphanus sativas*) має 5-денну тривалість життя (Siddiqui, B.A. (1983) Acta Bot. Ind. 11: 150-154).

Таким чином, згідно з цим винаходом, вигідно використовується той факт, що відразу після виникнення сприйнятливості жіночих рослин до пилку жіночі компоненти рослин зазвичай є сприйнятливими до пилку до скидання пилку у певний день, навіть у випадках, коли пилко взагалі скидається до того, як жіноча рослина стає сприйнятною до пилку. У більшості, якщо не у всіх рослин це відбувається у добовому ритмі, наприклад, як у кукурудзи, у якої жіночі компоненти є сприйнятливими до пилку, а чоловічі компоненти не є готовими, принаймні доки не висохне щоденна роса, що у деяких прикладах може відбуватися о 10:00 або навіть о 13:00 у хмарний або дощовий день. Крім того, у деякі дні з поганою погодою або дощем чоловічі компоненти можуть страждати від сильної затримки розвитку або можуть фактично не скинути пилку. У багатьох культур, таких, як соя, жіночі компоненти можуть на день випереджати за розвитком чоловічі компоненти. Часто жіноча рослина випереджає чоловічу в цілому і на щоденній основі. Відповідно, запилення, насамперед, вранці часто веде до запилення потрібним пилком. Крім того, можливість запилення саме в той час, коли жіноча рослина

вперше стає сприйнятливою незалежно від часу доби є величезним прогресом відносно поточної практики.

Через доставлення пилку в належний час і протягом відповідного періоду вікна фертильності рослини може бути досягнута достатня чистота без застосування будь-якої форми чоловічої стерильності у жіночих рослинах. Вперше забезпечується можливість комерційного виробництва гібридного насіння у будь-якій культурі без застосування певної форми чоловічої стерильності. Таким чином, у цьому полягає аспект новизни даного винаходу. Крім того, оскільки кілька культур, таких, як соя, не мають форми чоловічої стерильності, яка є економічно обґрунтованою, цей винахід забезпечує можливість виробництва гібридного насіння у видах, у яких це було або неможливим (наприклад, сої), або було пов'язане з труднощами (наприклад, пшениці). Так само цей винахід вперше забезпечує можливість ефективного виробництва гібридного насіння без застосування ізоляції, фізичної або часової, від небажаних біологічно сумісних джерел (пилку^U). Таким чином, коли пилок^U починає скидатися, всі життєздатні цільові жіночі рослини вже є запилені вибраним джерелом пилку, і пилок^U гине через короткий період часу (1-4 години), залежно від виду та умов середовища (Luna V. et al. (2001) Crop Sci. 41(5): 1551-1557; Stanley, R.G. & Linskens, H.F. (1974) Pollen: Biology, Biochemistry, Management. Springer-Verlag, Heidelberg.; Shivanna, K.R. (2003) Pollen Biology and Biotechnology. Science Publishers, Inc.), не знайшовши життєздатних цільових жіночих рослин, що дозволяє уникнути перехресного забруднюючого запилення жіночих, для чого у попередніх гібридних системах вимагалася певна форма ізоляції.

Здатність до доставлення життєздатного пилку на вимогу для здійснення вчасного запилення сприйнятливих приймочок дозволяє уникати багатьох обмежень, характерних для виробництва гібридного насіння та зерна у масштабі поля. Зокрема, приписане застосування винаходу дозволяє подолати низький рівень продукування пилку, усунути недостатню репродуктивну синхронність між чоловічими та жіночими квітками і знизити великі витрати на фізичну ізоляцію при виробництві гібридного насіння.

Варіанти втілення винаходу включають низку варіантів удосконалення традиційних способів ізоляції. Як обговорювалося вище, традиційні способи ізоляції можуть включати фізичну ізоляцію. Ця низка варіантів, яка стосується фізичної ізоляції, може включати повне усунення ізоляції від пилку^U, а також зменшення відстаней ізоляції, які вимагаються для зменшення забруднюючого пилку^U. Стандартна відстань, яку застосовують у США у галузі виробництва гібридного насіння для ізоляції поля для виробництва гібридного насіння, яка містить чоловічі та жіночі батьківські лінії, від інших плантацій кукурудзи становить 201 метр (660 футів) або більше (Iowa Seed Certification Requirements Handbook, Iowa Crop Improvement Association, 2009). Хоча відстань може бути різною, залежно від штату, ця відстань зазвичай є суттєвою для запобігання перенесенню пилку вітром, а також запиленню комахами. Завдяки застосуванню технологій описаної авторами винаходу, у комбінації з необов'язковим зменшенням або усуненням ізоляційної відстані між батьківськими виробниками гібридного насіння, може забезпечуватися континуум неухильного поліпшення генетичної чистоти. Наприклад, поєднання способів запилення згідно з даним винаходом зі зменшенням або усуненням ізоляційних відстаней в результаті має забезпечити поліпшений рівень генетичної чистоти одержаного гібридного насіння. Ізоляційна відстань може бути зменшена з 201 метра до 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 або 1 метра, або ж ізоляційна відстань може бути повністю усунута, таким чином, щоб гібридна батьківська рослина могла вирощуватися безпосередньо поруч з іншою кукурудзою, яка не є передбаченою батьківською рослиною для схрещування. Оскільки ізоляційна відстань зменшується, збільшується можливість зниження чистоти, але, завдяки ефективності описаних авторами технологій запилення, досягнутий рівень чистоти все одно може відповідати необхідному стандарту для виробництва та продажу гібридного насіння. Традиційна вимога фізичної ізоляції від випадкових джерел пилку значною мірою збільшує витрати на виробництво гібридного насіння. Пряме нанесення пилку згідно з винаходом на сприйнятливі приймочки у дозах, достатніх для забезпечення високого рівня запліднення, до скидання пилку за місцем дозволяє позбутися необхідності у здійсненні ізоляції насінного поля.

Крім фізичної ізоляції, часова ізоляція є технологією, яка може застосовуватися для ізоляції жіночих рослин від забруднюючого пилку^U. Часова ізоляція відбувається тоді, коли жіночі та небажані чоловічі рослини вирощуються в різні часи, таким чином, щоб жіночі приймочки та пилок^U існували у різні часи. В одному необмежувальному прикладі жіночі та чоловічі рослини можуть вирощуватися з місячним інтервалом. Таку технологію найчастіше застосовують у тропічних та субтропічних кліматичних умовах. Варіанти втілення винаходу включають низку варіантів уникнення також часової ізоляції. Низка варіантів, які стосуються часової ізоляції,

можуть включати повне усунення ізоляції від пилку^U, а також скорочення часу ізоляції або зменшення кількості, що вимагається для зменшення забруднюючого пилку^U. Завдяки ефективності описаних авторами способів запилення, досягнутий рівень чистоти все одно може відповідати необхідному стандарту для виробництва та продажу гібридного насіння.

Близька синхронізація між цвітінням чоловічих та жіночих рослин і мінімальна густина пилку на відкриту приймочку є фундаментальними вимогами для високого рівня виробництва насіння та генетичної чистоти. Зібраний раніше й законсервований пилок або свіжий пилок наносять на сприйнятливі приймочки протягом періоду від семи до десяти днів, забезпечуючи зав'язування насіння в умовах зниженої життєздатності пилку, затримки викидання приймочок відносно скидання пилку або слабкого "суміщення" між чоловічими та жіночими інбредними рослинами. В агрономічній галузі "суміщення" (nick) є терміном, який застосовують у виробництві гібридного насіння і який стосується синхронності чоловічих та жіночих типів квіток (тобто, пік скидання пилку чоловічими квітками збігається з піком появи приймочок у жіночих), які розвиваються в ідеальний час, таким чином, що гранули пилку здійснюють успішне запилення, що в результаті забезпечує запліднення. Для виробників насіння ідеальне "суміщення" відбувається тоді, коли 50 % чоловічої популяції починає скидати пилок у той самий день, коли 50 % жіночої популяції починає викидати приймочки.

Подібний континуум поліпшення чистоти діє, якщо технології запилення згідно з даним винаходом застосовуються паралельно зі зменшенням кількості видалених волотей у полі. Стандартна практика видалення волотей вимагає, щоб не більше 1 % жіночих султанів могли скидати пилок (Iowa Seed Certification Requirements Handbook, Iowa Crop Improvement Association, 2009). Для того, щоб це виконати, групі з видалення волотей доводиться проходити через усе поле 4-5 днів поспіль і з різним ступенем інтенсивності (швидкістю, з якою машини для видалення волотей рухаються через поле під час конкретного проходження). Завдяки застосуванню технологій описаного авторами винаходу, кількість проходжень для видалення волотей та/або їх інтенсивність може бути зменшена, що забезпечує можливість скидання понад 1 % жіночих султанів зі збереженням можливості одержання прийнятної генетичної чистоти. Допустимий відсоток скидання може бути збільшений з 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % до 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 100 %. У разі 100 % видалення волотей взагалі не вимагається.

Подібний континуум поліпшення чистоти діє, якщо технології запилення згідно з даним винаходом застосовуються паралельно зі зменшенням кількості чоловічих рослин, яка має вирощуватися з метою успішного запилення поля жіночих рослин для досягнення необхідного рівня генетичної чистоти. На типовому полі для виробництва гібридного насіння кукурудзи присутність чоловічих батьківських рослин становить від 20 % до 40 % всіх рослин у полі (Basra, A.S. (1999) Heterosis and Hybrid Seed Production in Agronomic Crops, p. 48). Відсоток необхідних чоловічих батьківських рослин залежить від кількох чинників, включаючи очікувану силу та життєздатність, які має демонструвати пилок з чоловічих батьківських рослин, а також чинників, пов'язаних з конкретно земельною ділянкою та кліматом. Практичне здійснення винаходу має забезпечити можливість значного зменшення відсотка чоловічих рослин, які мають бути присутні у полі, або повного їх усунення. Наприклад, замість потреби у 40 % чоловічих батьківських рослин в умовах виробництва може використовуватися менший відсоток, наприклад, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % або навіть 0 % чоловічих батьківських рослин у полі. Приписане нанесення пилку згідно з винаходом має потенціал повного усунення чоловічого запилювача з насінного поля.

Крім того, подібний континуум поліпшення чистоти також може стосуватися культур, у яких одна або кілька рослин можуть самозапилюватися до цвітіння рослини і можуть приймати пилок з інших джерел. Одним необмежувальним прикладом таких культур може бути пшениця. Даний винахід може бути вигідним для таких культур. Наприклад, можуть застосовуватись обмежена чоловіча стерильність та/або ізоляція. Крім того, жіночі рослини можуть вирощуватися для раннього цвітіння або піддаватися механічному або фізичному впливові для викликання розкриття квіток. У деяких випадках пилок також може бути примусово поміщений у квітку. Навіть у випадках, коли певне самозапилення через такі події є неминучим, належне гібридне запилення може відбуватись у рослинах, у яких квітки розкриваються до самозапилення. У такому разі поліпшується генетична чистота.

Гранули пилку є дрібними і можуть бути дуже ніжними. Їхній здатності до успішного запилення жіночих рослин можуть перешкоджати різні несприятливі умови середовища, а також можуть існувати спадкові властивості, які передаються рослиною, що продукує пилок. Характеристики пилку (тобто, швидкість проростання, енергія росту зародкових трубочок) можуть бути зазначені, як сила пилку, тоді як здатність пилку до успішного вироблення

життєздатного насіння може бути зазначена, як життєздатність пилку (Shivanna, KR et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81 (1): 38-42). Сила та життєздатність пилку значно відрізняються у різних видів та сортів рослин. У деяких випадках винахід може бути бажано здійснювати з використанням пилку, який зазвичай має слабку силу та/або життєздатність. За таких обставин, хоча практичне втілення винаходу за очікуваннями має підвищувати врожайність і поліпшувати чистоту, відсоткове поліпшення кожної з цих характеристик може бути низьким порівняно з застосуванням пилку з більшою силою або життєздатністю. Відповідно, існує континуум поліпшення як за чистотою, так і за врожайністю, яке може досягатися шляхом практичного здійснення даного винаходу, яке може залежати від широкого кола чинників, включаючи силу та життєздатність пилку. У разі, якщо поліпшення чистоти є незначними, можуть бути вжиті додаткові заходи з підвищення рівня чистоти, як описано в цьому документі нижче.

Як стане зрозуміло спеціалістові у даній області, вибір чоловічого пилку, який має застосовуватися при практичному втіленні винаходу, є суттєвими чинником можливої переваги, яка визнається через практичне здійснення винаходу. Сила та життєздатність пилку є чинниками, які слід враховувати, разом з різними ознаками та характеристиками, які передаються через пилок. Існують обставини, за яких застосування пилку з меншою силою або життєздатністю все одно є добрим вибором завдяки властивостям, які передаються до одержаного в результаті насіння. За таких обставин, якщо відомо, що пилок має меншу силу або життєздатність, в результаті слід очікувати помірного зменшення забруднення, так само, як і меншого можливого підвищення врожайності. Такі рішення можуть прийматися сільгоспвиробником на основі конкретних характеристик культури, потрібного насіння, та умов, які переважають на очікуваний час запилення з огляду на навколишнє середовище та інші біотичні та/або абіотичні навантаження, які впливають на врожай. Відповідно, можливість вибору пилку під час запилення є ще одним значним чинником можливої переваги, яка визнається через практичне здійснення винаходу. Нижче у Таблиці 1 зазначаються вибрані потенційні переваги застосування винаходу.

Таблиця 1

Приклади переваг вибору пилку

Виробнича проблема	Застосування винаходу	Очікувана перевага
Слабке продукування пилку чоловічою інбредною рослиною, не придатною для виробництва гібридного насіння у масштабі поля	Застосування свіжого або консервованого пилку, який наносять на сприйнятливі приймочки на вимогу, таким чином, збільшуючи запилення	Більший потенціал застосування елітних чоловічих інбредних рослин у розробці гібридів
Низький рівень виробництва насіння на полях для виробництва батьківського насіння	Застосування свіжого або консервованого пилку, який наносять на сприйнятливі приймочки на вимогу, таким чином, збільшуючи запилення	Збільшення виробництва насіння елітними чоловічими та жіночими інбредними рослинами
Слабка репродуктивна синхронність між чоловічими та жіночими інбредними рослинами у виробництві гібридного насіння, що призводить до зниження продуктивності насіння та вищого за очікуваний рівня генетичного забруднення	Застосування свіжого або консервованого пилку, який наносять на сприйнятливі приймочки на вимогу, таким чином, збільшуючи запилення	Підвищення продуктивності насіння на акр, зниження самозапилення жіночих інбредних рослин, зниження ауткросингу від адвентивних джерел

Приклади переваг вибору пилку

Виробнича проблема	Застосування винаходу	Очікувана перевага
Високовитратне виробництво гібридного насіння через необхідність фізичної ізоляції від адвентивних джерел пилку	Застосування свіжого або консервованого пилку, який наносять на сприйнятливі приймочки на вимогу, таким чином, збільшуючи запилення	Пряме нанесення пилку на сприйнятливі приймочки у дозах, достатніх для забезпечення до 100 % запліднення, до скидання пилку за місцем усуває потребу у здійсненні ізоляції насінного поля
Інбредний ефект монокультурного поля, при якому запилення відбувається з боку рослини з ідентичним набором генів, наприклад, шляхом самозапилення або сиблінгового запилення	Застосування свіжого або консервованого пилку, який наносять на сприйнятливі приймочки на вимогу, таким чином, збільшуючи запилення	Підвищення продуктивності насіння на акр, зниження самозапилення жіночих інбредних рослин, зниження ауткросингу від адвентивних джерел

Наведений нижче необмежувальний приклад представляє можливий сценарій, за яким може бути практично втілений винахід, і висвітлює переваги. Винахід може бути практично втілений для гібриду, який складається з чоловічої рослини, яка слабо скидає пилок і вимагає 35 % або більше присутності чоловічих рослин на полі для виробництва гібридного насіння при застосуванні традиційних способів, і все одно в результаті дає гранично прийнятне забруднення (~5 %). Винахід дозволяє знизити присутність чоловічих рослин удвічі до 17 % і при цьому також зменшує забруднення до прийнятного рівня (2-3 %) і знижує собівартість проданих товарів. В альтернативному варіанті, якщо чоловіча рослина має вищий за середній рівень скидання пилку, і пилок було взято й збережено у попередніх батьківських розмноженнях, винахід дозволяє усувати чоловічі рослини й знижувати інтенсивність (та вартість) видалення волотей на 50 %, що в результаті забезпечує зниження собівартості проданих товарів при утриманні забруднення на рівні, який дорівнює показникам традиційної практики (2-3 %), але з рівнем забруднення, значно нижчим за такі самі параметри (50 % інтенсивності видалення волотей і без присутності чоловічих рослин) без практичного втілення винаходу.

Пилок^M може доставлятися у будь-які з численних способів, включаючи, крім інших, ручне доставлення, ручне доставлення з невеликим ручним механічним пристроєм для напівавтоматичного розсіювання, за допомогою переміщуваної по полю машини, яка містить пристрій для розсіювання пилку, або шляхом повністю автоматичного розсіювання за допомогою самохідного і/або керованого людиною пристрою, такого, як дрон, який має закріплений на ньому пристрій для розсіювання пилку, причому розсіювання пилку здійснюють автоматичними засобами, включаючи, крім інших, механічні засоби, з застосуванням позитивного тиску, негативного тиску, або пневматичні засоби. Застосування дрона мало б особливу новизну та практичність згідно з цим способом. Малі дрони, які не потребують регулювання, для застосування згідно зі способом, і які можуть спрямовуватися за координатами GPS для зосередження розсіювання пилку безпосередньо над жіночими рослинами. За оцінками авторів винаходу, при застосуванні будь-якого з цих способів приблизно 140 грамів (5 унцій) пилку^M, який вдало доставляється протягом 3-4 днів поспіль, є достатніми для перехресного запилення одного гектара (2,47 акра) жіночих батьківських рослин кукурудзи з достатньою чистотою для відповідності чинним законам США про насіння, як було описано авторами вище, згідно з якими вимагається не більше 5 % забруднення (самозапиленого та ауткросингового комбінованого насіння) для сертифікації та комерційного продажу насіння. Ці оцінки ґрунтуються на літературних джерелах, у яких зазначається кількість гранул пилку кукурудзи на мг і приблизно визначається кількість від 3 до 5 гранул пилку на приймочку або менше для успішного запилення (3-4 гранули пилку на приймочку є загальноновизнаною кількістю серед спеціалістів у галузі запилення як кількість, необхідна для забезпечення успішного запилення (M.E. Westgate, J. Lizaso, W., Batchelor (2003) Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize, Crop Science 43: 934-942; M. Uribealarea, J. Carcova, M.E. Otegui, M. Westgate (2002) Pollen production, pollination dynamics,

and kernel set in maize, *Crop Science* 42: 1910-1918).). Див., наприклад, Porter (1981) *Environ. Health Perspectives* 37: 53-59; Miller (1982) In *Maize for Biological Research*. W.F. Sheridan (ed.), pp. 279-293). Час доставлення пилку, необхідна кількість пилку та кількість днів доставлення пилку регулюють згідно з необхідністю за різних обставин, таких, як коливання кількості пилку, який виробляють різні жіночі батьківські рослини, та погодні умови (тобто, частота або кількість дощових опадів, швидкість та напрямок вітру і т. ін.). Наприклад, спосіб може бути пристосований і відрегульований для будь-якого конкретного набору батьківських рослин, залежно від здатності чоловічих та жіночих рослин до продукування пилку. Крім того, очікується, що ефективність цих способів доставлення зменшить кількість пилку, необхідну для гібридного запилення. Згідно з оцінками авторів винаходу, ці ефективніші способи дозволяють використовувати в середньому 1/1000 або менше від кількості пилку, який нині продукується для виробництва гібридного насіння. Проведене авторами винаходу дослідження зазначає, що ідеальний качан кукурудзи вимагає приблизно 3000 гранул пилку на приймочку, які зазвичай скидаються у полі з султанів кукурудзи. Дослідження з ручним запиленням та дослідження у відкритому полі зазначають, що приблизно від 3 до 4 гранул пилку на приймочку забезпечують качан (M.E. Westgate, J. Lizaso, W., Batchelor (2003) Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize, *Crop Science* 43: 934-942; M. Uribe-larrea, J. Carcova, M.E. Otegui, M. Westgate (2002) Pollen production, pollination dynamics, and kernel set in maize, *Crop Science* 42: 1910-1918). Це в результаті дає співвідношення приблизно 1/1000 від кількості пилку, яка нині вимагається для виробництва гібридного насіння.

Таким чином, практичне втілення цього винаходу водночас усуває потребу у присутності чоловічих батьківських рослин поблизу від до жіночих батьківських рослин, а також необхідність у наявності будь-якої форми чоловічої стерильності серед жіночих батьківських рослин. Крім того, спеціаліст у даній галузі у разі необхідності зможе відхилитися від перелічених вище прикладів. Наприклад, у деяких ситуаціях бажаним може бути запилення вночі. В інших бажаним може бути запилення протягом цілого дня. Очікується, що будь-яке вивільнення пилку, яке розраховують за часом таким чином, щоб воно відбувалося раніше за природне скидання пилку жіночих батьківських рослин, має бути ефективним.

Цей винахід може бути здійснений у будь-якій культурній рослині для поліпшення або забезпечення можливості виробництва гібридного насіння. Він може функціонувати у будь-якому середовищі, включаючи, крім інших, ідеальні або цільові середовища росту, позасезонні середовища або контрольовані середовища (наприклад, різні типи оранжерей та теплиць, кліматичні камери, установки для вертикального вирощування, гідропонні установки, аеропонні установки і т. ін.). Пилок^M може бути нанесений відразу після того, як жіночі рослини набувають життєздатності, і незалежно від життєздатності пилку^F або іншого небажаного пилку, поки життєздатні на даним момент жіночі рослини перехресно запилюються протягом періоду, коли пилок^F або інший пилок з небажаних джерел активно не скидається. Цей винахід також може застосовуватися для вдосконалення поточної практики виробництва насіння навіть за наявності всіх традиційних компонентів, що поліпшує рівень чистоти гібридного насіння у важких виробничих ситуаціях, навіть якщо застосовують чоловічу стерильність та/або ізоляцію та/або чоловічі рослини. Цей винахід може застосовуватися на батьківських розмножувальних полях – полях, на яких інбредне насіння конкретного генотипу висівають і вирощують для самозапилення. Партія насіння, одержаного в результаті цього самозапилення в результаті дає значно більшу кількість інбредного насіння, яке має застосовуватись як батьківське джерело для одержання гібридів згодом. Застосування винаходу на батьківських розмножувальних полях стерильних жіночих батьківських рослин звільняє від необхідності в ізоляції або наявності закріплювачів стерильності (подібних до цитоплазматичних чоловічих стерильних ліній, але таких, що мають життєздатний пилок і продукують нормальне насіння). Подібним чином винахід може застосовуватися на нормальних батьківських виробничих полях для поліпшення чистоти одержаного в результаті насіння. Цей винахід також може бути застосований у дослідних умовах для усунення потреби у щоденному обгортанні паростків з метою уникнення перехресного забруднення або для уникнення видалення волотей на ізольованих перехресних ділянках (для одержання експериментального гібридного насіння у малій кількості).

У випадках, коли вимагається дуже високий рівень чистоти, або у випадках, коли не очікується бажаний рівень чистоти, можуть бути вжиті подальші заходи з очищення партій гібридного насіння до будь-якого бажаного рівня від самозапиленого або перехресно запиленого насіння, яке перебуває у суміші насіння, зібраного з будь-якої гібридної виробничої ділянки, включаючи традиційні гібридні системи у будь-якій культурі. Подібним чином, оскільки описаний авторами винахід може здійснюватися на різних рівнях кваліфікації, можуть застосовуватися подальші етапи для очищення партій насіння до будь-якого бажаного рівня

чистоти. Наприклад, застосування генетичного маркера у чоловічій батьківській лінії рослин, який передається з пилком^М і експресується в одержаному в результаті насінні як окремий і відмітний фенотип, дозволяє здійснювати подальше очищення партії насіння шляхом сортування. Приклади такого способу описуються у Міжнародній публікації WO 2014/147005.

Крім того, технології такого характеру зазвичай застосовують у галузі вирощування білонасінної кукурудзи, згідно з якою білу та жовту кукурудзу легко відсортовують за допомогою автоматичних сортувальних машин для насіння. Генетичний маркер може надавати фенотип, який можна відрізнити за кольором насіння, інтенсивністю кольору насіння або візерунком, формою насіння, розміром насіння, густиною насіння або іншими характеристиками насіння. Компанія з виробництва насіння може використовувати власний специфічний маркер, відмінний від тих, що використовуються іншими компаніями, наприклад, відмітні ознаки місцевого насіння або генетично модифіковані кольорові маркери, які можуть не розрізнятися неозброєним оком. У такому разі насіння може візуально або механічно сортуватися на основі маркерного фенотипу. Див., наприклад, Raboy et al. (2000) *Plant Physiol.* 124: 355-368; Evans, M.M.S. & Kermicle, J.L. (2001) *Genetics* 159: 303-315; Jenkins, M.T. (1925) *J. Heredity* 16: 307-310; та Chase, S. (1949) *Genetics* 34: 328-332). Для деяких культур у країнах, що розвиваються, у яких робоча сила є дуже дешевою, це може здійснюватися вручну, тоді як в інших ситуаціях економічніше було б застосовувати або напівавтоматичні сортувальні пристрої для насіння, такі, як Satake Seed Sorter, або оптичну скануючу систему, здатну сканувати та сортувати насіння.

Наприклад, у кукурудзи природна властивість пурпурова зародкова брунька (PP) (Chase (1949) *Genetics* 34: 328-332) може використовуватись як чоловічий фенотипічний маркер, який передається до всіх чоловічих інбредних рослин і успадковується через пилком^М, з застосуванням автоматичного пристрою для сортування насіння як способом сортуванням. Винахід може здійснюватись, як описано вище, але з чоловічою рослиною, що включає маркер, який може використовуватись для вимірювання досягнутого в результаті рівня гібридної чистоти. Після збирання швидкий аналіз частини вибірки насіння може визначити, чи має PP-насіння достатньо високу чистоту для уникнення сортування насіння з метою підвищення чистоти. Якщо вона не відповідає приписаному рівневі, насіння пропускають через автоматичний пристрій для сортування насіння, наприклад, для відокремлення PP-насіння, що представляє гібридне насіння, від безбарвного зародкового насіння, яке представляє самозапилене та перехресно запилене забруднююче насіння. Це може здійснюватися згідно з нормальними процесами кондиціонування на заводі з виробництва насіння. Крім того, негібридне безбарвне зародкового насіння може продаватись як зерно або утилізуватися.

Прикладами маркерів, які можуть застосовуватись у кукурудзі, є, крім інших, білий/жовтий ендосперм, жовтий/оранжевий ендосперм, непрозорий/нормальний ендосперм, нормальна/пурпурова зародкова брунька, безбарвний/пурпуровий алейрон, мутанти крохмалевого ендосперму або будь-яка комбінація цих маркерів та інших маркерів кукурудзи. У сої до маркерів, які можуть застосовуватись, належать, крім інших, зелені та жовті сім'ядолі. До не специфічних до сорту трансгенних маркерів належать, крім інших, гени кольорових маркерів (такі, як DsRed2) або будь-який трансген, який змінює будь-який нормальний фенотип насіння, наприклад, трансгени, які підвищують антоціанін або інші пігменти у частині насіння, або трансгени, які змінюють колір сім'ядолі. Інші приклади таких маркерів можна знайти у Міжнародній публікації WO 2014/147005.

Додаткове застосування етапу сортування з застосуванням маркера є найбільш доцільним і економічним, коли досягаються результати гібридної чистоти, які є значно кращими за ті, які досягалися б традиційними способами без чоловічої стерильності і/або з меншою за стандартну ізоляцією, але не досягають рівнів чистоти, достатніх для комерційного продажу. Наприклад, за оцінками на основі представлених авторами винаходу даних, забруднення (здебільшого від самозапилення жіночих рослин) у партії гібридного насіння для виробництва кукурудзи без звичного застосування чоловічої стерильності або ізоляції має бути більшим за 70 %, тоді як рівень забруднення для партії насіння, вирощеного з застосуванням технологій згідно з даним винаходом, також без чоловічої стерильності або ізоляції, має зменшити забруднення вдвічі або більше, до 35 % забруднення або меншого ступеня. Хоча забруднення 35 % не є настільки низьким, як це вимагалось б для деяких культур, таких, як кукурудза, для нинішніх негібридних культур, таких, як соя, це було б достатнім для початку виробництва культури як гібриду. Наприклад, згідно з одним існуючим способом, який стосується сої, приблизно 70 % чистоти досягали у ручних схрещуваннях для розробки селекційного схрещування. Для кукурудзи також існують польові свідчення зниження забруднення випадковим пилком при вищому рівні врожаю (Astini, J.P. et al. (2009) *Agronomy J.* 101: 373-380). Як правило, негібридне насіння, яке відсортовують під час будь-якого етапу сортування, продають як зерно. Завдяки застосуванню

описаного авторами винаходу, існує можливість сортування негібридного насіння по двох категоріях: одна для зерна (ауткросингові та інші не самозапилені забруднювачі) і друга частина (самозапилені), яка може продаватись як самозапилений сорт, який забезпечує продукт процесу сортування з доданою вартістю.

5 Як стане зрозуміло спеціалістові у даній області, додаткова перевага, яка забезпечується в результаті практичного втілення цього винаходу, полягає у підвищеній насінній продуктивності. Заплановане й умисне нанесення пилку на фертильну жіночу батьківську рослину в результаті забезпечує підвищене запилення порівняно з природним запиленням. Залежно від пилку^M, вибраного для застосування у практичному втіленні винаходу, ступінь запилення може бути значно збільшений, і в результаті врожай також буде значно вищим за той, що був би досягнутий за інших умов. У середньому автори винаходу очікують підвищення врожайності принаймні на 15 % в результаті практичного втілення винаходу. Залежно від стану жіночих батьківських рослин, вибору використовуваного пилку, умов середовища та інших чинників, очікується підвищення врожайності, значно більше за 10 %, включаючи підвищення врожайності, більше за 100 % за деяких обставин, порівняно з очікуваним врожаєм без практичного втілення способу згідно з винаходом.

Представлені нижче приклади детальніше пояснюють даний винахід і лише ілюстративно показують, яким чином описаний авторами винахід може бути втілений для кукурудзи. Основний спосіб може бути застосований для будь-якої культури з модифікаціями з врахуванням конкретної культури у відповідних випадках. Приклади з 1 по 4 спостерігали на полях центральної Айови протягом літа 2015 р.

Приклад 1

Описаний авторами винахід практично втілювали, використовуючи гібрид цукрової кукурудзи, який був гомозиготним за рецесивним геном, який викликає фенотип зморшкуватого зерна у зрілому стані (зморшкуватий або цукровий локус (Jennings, P.H. and C.L. McCombs, (1969) *Phytochemistry* 8 (8):1357-1363) і гомозиготним рецесивним для жовтих локусів, що в результаті дає білий ендосперм (Buckner, B. et al. (1990) *The Plant Cell*, Vol 2, 867-876). Цей гібрид цукрової кукурудзи використовували як жіночу рослину і культивували у двох 36,5-метрових (120-футових) рядах без ізоляції від нормальних вирощуваних для товарного зерна рослин кукурудзи (зерна з жовтим ендоспермом) і не піддавали чоловічій стерилізації (тобто, не видаляли султани). Чоловічі рослини, які мали характеристики білого і не зморшкуватого ендосперму, були присутні у десяти 4,5-метрових (15-футових) культивованих рядах, у середньому за 6 метрів (20 футів) від жіночих рядів цукрової кукурудзи. Винахід практично втілювали шляхом примусового збирання пилку з султанів чоловічих рослин з білим ендоспермом (пилок^M) у найбільш ранній частині період природного скидання пилку приблизно о 8:30. Пилок збирали шляхом обгортання султанів пакетами та струшування його у пакети. Пилок^M потім відразу спрямовували на приймочки жіночих рослин цукрової кукурудзи вручну з застосуванням способів, добре відомих спеціалістам у даній галузі, шляхом легкого постукування по пакетах з пилом для вивільнення гранул пилку на приймочки. При застосуванні цього способу зморшкуваті зерна представляють самозапилені забруднюючі зерна, жовті зерна представляють ауткросингові забруднювачі, і білі зерна представляють передбачений гібрид F1. Загалом було одержано 30 821 зерен з застосуванням цього способу. Кілька жіночих рослин цукрової кукурудзи не піддавалися спрямуванню пилку^M на них, і їм дозволяли вільно запилюватися. Загалом було одержано 28 896 зерен з цих вільно запилених качанів, і їх використовували як контроль.

У Таблиці 2 показано зниження забруднювачів в цілому як через самозапилення, так і через перехресне запилення, що становило 18 %. Це було менше зниження забруднення, ніж очікувалося, але воно все одно представляє суттєве поліпшення рівня чистоти. Після обмірковування, аналізу та уважнішого дослідження цього прикладу стало очевидним, що є кілька чинників, які обмежують досягнення системою нижчого рівня забруднення. Цукрову кукурудзу, яку використовували в цьому прикладі, було взято для зручності, оскільки вона забезпечує простий маркер, який дозволяє виявити забруднювачі, але має дуже великі султани, з 5-10-разовим або більшим перевищенням кількості пилку порівняно з середніми жіночими батьківськими рослинами гібриду. Ефект цієї великої кількості пилку можна легко спостерігати за високим відсотком самозапилень у вільно запилених качанах, взятих як контроль, який становив 93 % у цьому прикладі і 96 % у представленому нижче прикладі 2. Для жіночих рослин кукурудзи з нормальними зернами ця кількість очікується у межах 50-80 % при подібній практиці культивування. У представленому нижче прикладі 4 з використанням жіночої рослини з білими зернами відсоток самозапилень становив лише 78 %. Ще одним чинником, який впливає на результат цього прикладу, є те, що ми не намагалися повністю втілити винахід шляхом

- запилення задовго до того, як жіночі рослини почали скидати пилок. Ми просто намагалися застосувати винахід через здійснення спрямованого запилення на самому початку природного скидання пилку для витіснення забруднювачів. Цей підхід мав на меті лише продемонструвати потенціал винаходу з застосуванням лише часткового втілення. І нарешті, ще одним чинником, який обмежував зниження забруднювачів, було те, що пилок з білої кукурудзи належав до інбредних рослин і був менш конкурентоздатним порівняно з гібридним пилом (тобто, пилом цукрової кукурудзи). З врахуванням цих чинників зменшення забруднювачів на 18 % є обґрунтованим поліпшенням рівня чистоти.

Таблиця 2

Зниження забруднення від самозапилення та ауткросингових забруднень жіночих батьківських рослин білої цукрової кукурудзи при використанні білих чоловічих рослин згідно з описаним авторами винаходом

Тип запилення	Вільно запилені		Винахід на вимогу	
	Контроль*	% від загальної кількості	Білі на білій цукровій кукурудзі	% від загальної кількості
	-----# зерен-----			
Передбачений гібрид F1 (білий)	539	2 %	7242	23 %
Самозапилені забруднювачі(зморшкуваті)	26798	93 %	22730	74 %
Ауткросингові забруднювачі (жовті)	1532	5 %	849	3 %
Загалом:	28869		30821	
Зниження забруднення на вимогу	18 %			

10

- Приклад 2. В іншому робочому прикладі описаний авторами винахід практично втілювали, використовуючи гібрид цукрової кукурудзи, який був гомозиготним за рецесивним геном, який викликає фенотип зморшкуватого зерна у зрілому стані (зморшкуватий або цукровий локус) і гомозиготним рецесивним для жовтих локусів, що в результаті дає білий ендосперм. Цей гібрид цукрової кукурудзи використовували як жіночу рослину і культивували у двох 69-метрових (225-футових) рядах без ізоляції від нормальних вирощуваних для товарного зерна рослин кукурудзи (жовтий ендосперм) і не піддавали чоловічій стерилізації (тобто, не видаляли султани). Навколишні нормальні вирощувані для товарного зерна рослини кукурудзи використовували як чоловічі рослини, вони мали нормальні характеристики ендосперму (не зморшкуватий) і були присутні в усіх сусідніх рядах з жіночими рослинами. Крім того, султани жіночих рядів обприскували водою приблизно о 8:15 ранку для затримки скидання пилку з цих жіночих рядів до приблизно 8:45. Після обприскування водою жіночих султанів винахід відразу практично втілювали шляхом примусового забирання пилку^M з султанів чоловічих рослин з жовтим ендоспермом шляхом обгортання султанів пакетами та струшування його у пакети. Пилок^M потім відразу спрямовували на приймочки жіночих рослин цукрової кукурудзи вручну з застосуванням способів, добре відомих спеціалістам у даній галузі, шляхом легкого постукування по пакетах з пилом для вивільнення гранул пилку на приймочки. Цей етап здійснювали до того, як ці жіночі рослини скидали будь-який пилок. При застосуванні цього способу зморшкуваті зерна представляють самозапилені забруднюючі зерна, а жовті зерна представляють передбачений гібрид F1. Ауткросингове забруднення не вимірювали. Загалом одержували 34473 зерен із застосуванням цього способу. Кілька жіночих рослин цукрової кукурудзи не піддавалися спрямуванню пилку^M на них, і їм дозволяли вільно запилюватися. Загалом було одержано 4914 зерен з цих вільно запилених качанів, і їх використовували як контроль.

- У Таблиці 3 показано зниження забруднювачів в цілому як через самозапилення, так і через перехресне запилення, що становило 31 %. Це зменшення забруднення є суттєвим, особливо якщо враховувати важкий прототип, який цей приклад представляє, тобто, розміри султанів та скидання пилку з призначених жіночих рослин є величезними (у 5-10 разів або більше перевищують показники нормальної жіночої гібридної батьківської рослини). Ці результати відображають втілення описаного авторами винаходу, але для ще більшого поліпшення

результатів вимагаються ще більші зусилля. Якщо застосовувати джерело консервованого пилку, запилення мало б відбуватись у більш ранній ранковий час, таким чином, щоб призначений пилкок мав більше часу для розвитку у приймочках та запліднення яйцеклітин жіночих рослин.

5

Таблиця 3

Зниження забруднення від самозапилення жіночих батьківських рослин білої цукрової кукурудзи при використанні жовтих чоловічих рослин в описаному авторами винаході

Тип запилення	Вільно запилені		Винахід на вимогу	
	Контроль*	% від загальної кількості	Жовті на білій цукровій кукурудзі	% від загальної кількості
	-----# зерен-----			
Передбачений гібрид F1 (жовтий)	192	4 %	12837	37 %
Самозапилені забруднювачі (зморшкуваті)	4722	96 %	21636	63 %
Ауткросингові забруднювачі (без діагностики)	0	0 %	0	0 %
Загалом:	4914		34473	
Зниження забруднення на вимогу	31 %			

Приклад 3. У цьому прикладі винахід моделювали, застосовуючи гомозиготні воскові жіночі батьківські та суміш чоловічих батьківських рослин, які містили функціональний алель або алель дикого типу у восковому локусі (Nelson, O.E. (1968) Genetics 60: 507-524). Восковий алель є рецесивним, і коли він перебуває у гомозиготному стані, що представляє самозапилені забруднювачі, він надає зернам характерного непрозорого фенотипу, що можна легко розпізнати неозброєним оком. Жіночі рослини культивували у трьох 4,6-метрових (15-футових) рядах без ізоляції, і їм не надавали чоловічої стерильності (тобто, не видаляли султани). Чоловічі рослини були присутні поблизу суміжно з усіма сторонами жіночих рядів. Винахід практично втілювали шляхом обгортання султанів чоловічих рослин пакетами та примусового утримання пилку^M з чоловічих рослин у найбільш ранній частині період природного скидання пилку приблизно о 8:30 ранку, таким чином, збираючи його у пакети. Пилкок^M відразу після цього спрямовували на воскові жіночі приймочки вручну з застосуванням способів, добре відомих спеціалістам у даній галузі, шляхом легкого постукування по пакетах з пилком для вивільнення гранул пилку на приймочки. У цьому прикладі розвинулося 14 качанів з загальною кількістю 3217 зерен. У Таблиці 4 показано результати цього прикладу. Хоча контроль не було прямо включено до цього експерименту, за апіорними очікуваннями на основі відомостей з літератури, має бути щонайменше 50 % забруднення від самозапилення жіночих рослин без застосування винаходу (див., наприклад, Paterniani E. & Stort, A.C. (1974) Euphytica 23: 129-134; Ma, B.L. et al. (2004) Crop Sci. 44: 1273-1282). При використанні контролю з представленого нижче Прикладу 4 можна очікувати рівня забруднення приблизно 78 % без застосування винаходу. У цьому прикладі забруднення через самозапилення було знижено до 2 %. Цей показник представляє 97 % зниження рівня забруднення від самозапилення. У цьому прикладі мало б бути одержане гібридне насіння, що відповідає стандартному 95 % рівневі чистоти.

30

Таблиця 4

Зниження забруднення від самозапилення воскових жіночих батьківських рослин при використанні чоловічих рослин дикого типу згідно з описаним авторами винаходом

Тип запилення	Вільно запилені		Винахід на вимогу	
	Контроль*	% від загальної кількості	дикий тип на воскових	% від загальної кількості
	-----# зерен-----			
Передбачений гібрид F1 (склоподібний)	1337	22 %	3217	98 %
Самозапилені забруднювачі (воскові)	4724	78 %	66	2 %
Ауткросингові забруднювачі (без діагностики)	ND	ND	ND	ND
Загалом:	6061		3283	
Зниження забруднення на вимогу	97 %			

*Використовуваний жовтий/білий контроль для воскового контролю. Контрольні самозапилені воскові рослини у тих самих рядах були на 100 % восковими

Приклад 4. Описаний авторами винахід далі моделювали з використанням гомозиготних жіночих батьківських рослин з білим ендоспермом (тобто, гомозиготних рецесивних у жовтих локусах (y/y)) та суміш чоловічих батьківських рослин, які мали жовтий ендосперм. Жіночі рослини культивували на полі в Айові влітку 2015 р. в одному 4,6-метровому (15-футовому) ряді без ізоляції, і рослинам не надавали чоловічої стерильності (тобто, не видаляли султани). Чоловічі рослини були присутні поблизу суміжно з усіма сторонами жіночих рядів. Винахід практично втілювали шляхом обгортання чоловічих султанів та примусового утримання пилку^M з чоловічих рослин у найбільш ранній частині період природного скидання пилку приблизно о 8:30 ранку. Пилок^M відразу після цього спрямовували на воскові жіночі приймочки вручну з застосуванням способів, добре відомих спеціалістам у даній галузі, шляхом легкого постукування по пакетах з пилком для вивільнення гранул пилку на приймочки. у цьому прикладі розвинулося 5 качанів із загальною кількістю 888 зерен. Було кілька рослин у цьому ряду та в інших сусідніх рядах з жіночими рослинами з білим ендоспермом, яким давали вільно запилитися, і які використовували як контрольні, з загальною кількістю 6061 зерен. У Таблиці 5 показано 79 % зниження забруднення у цьому прикладі. Цей приклад представляє випадок, у якому може використовуватися кольоровий маркер ендосперму, для поліпшення чистоти шляхом відсортування зерен з білим ендоспермом (тобто, самозапилені) для доведення чистоти до стандартного 95 % рівня.

Таблиця 5

Зниження забруднення від самозапилення жіночих батьківських рослин з білим ендоспермом при використанні чоловічих рослин з жовтим ендоспермом згідно з описаним авторами винаходом

Тип запилення	Вільно запилені		Винахід на вимогу	
	Контроль*	% від загальної кількості	Жовті на білих	% від загальної кількості
	-----# зерен-----			
Передбачений гібрид F1 (жовтий)	1337	22 %	744	84 %
Самозапилені забруднювачі (білий)	4724	78 %	144	16 %
Ауткросингові забруднювачі (без діагностики)	ND	ND	ND	ND
Загальна кількість зерен	6061		888	
Зниження забруднення на вимогу	79 %			

Приклад 5. Виробничу ділянку з гібридним насінням кукурудзи обробляють у точній відповідності з існуючою нині практикою, за винятком того, що ізоляційну відстань зменшують на 50 % або більше, видалення волотей з жіночих батьківських рослин практикують на

зниженому рівні, таким чином, 10 % жіночих рослин мали султани, що скидають пилок (на відміну від стандарту – 1 % султанів, що скидають пилок), і відсоток чоловічих рослин зменшують на 50 % або більше. Пилок чоловічих батьківських рослин збирають і консервують і одержують з пункту зберігання і наносять на жіночі батьківські приймочки о 6-й годині ранку.

Очікується, що в результаті забруднення має бути зменшене на 50 % або більше порівняно з такою самою виробничою практикою без втілення винаходу. Параметри цього прикладу можуть бути відповідним чином застосовані на ділянках для виробництва гібридного насіння, на яких використовують чоловічі рослини, які скидають від середньої до дещо більшої за середню кількість пилку, та жіночі рослини, які скидають середню кількість пилку.

Приклад 6. Виробничу ділянку з гібридним насінням кукурудзи обробляють у точній відповідності з існуючою нині практикою, включаючи стандартну ізоляційну відстань та стандартну практику видалення волотей (забезпечуючи 1 % або менше жіночих рослин із султанами, що скидають пилок) і з включенням стандартного відсотка чоловічих рослин на основі кількості пилку, яку скидають чоловічі рослини. Наприклад, чоловіча рослина визначається як "слабка" чоловіча рослина, яка скидає менше за 2 мільйони гранул пилку на султан. У цьому разі за деякими стандартами компаній з виробництва насіння ця чоловіча рослина вважається некондиційною й відбраковується, незалежно від того, наскільки врожайними можуть бути одержані від неї гібриди. Інші компанії з виробництва насіння можуть вдатися до ризику з цією чоловічою рослиною й вирощувати її у високому співвідношенні відносно жіночих рослин на ділянці з виробництва гібридного насіння.

У цьому прикладі чоловічу рослину вирощують у співвідношенні 2:4 (2 ряди чоловічих рослин на кожні 4 жіночі ряди) з межею у 10 рядів чоловічих рослин навколо всієї виробничої ділянки. Винахід практично втілюють, використовуючи пилок чоловічої батьківської рослини, який було зібрано й законсервовано і одержано з пункту зберігання і точно нанесено на жіночі батьківські приймочки о 6-й годині ранку.

Очікується, що в результаті забруднення має бути знижене до рівня, який відповідає стандартам для сертифікації та продажу гібридного насіння. За нормальних виробничих умов виробничі поля, як описано у цьому прикладі, можуть у середньому мати 5 % забруднення через слабкі чоловічі рослини, які використовуються. Діапазон, до якого належить це середнє значення, охоплює 1-8 % забруднення, залежно від умов середовища на конкретному полі (наприклад, вітру та близькості сусіднього кукурудзяного поля). Це передбачає, що половина виробничих полів при цьому сценарії має давати некондиційне (<95 % чистоти) гібридне насіння, яке потенційно має відбраковуватися. Для полів, на яких було втілено цей винахід, застосування зниження забруднення на 50 % передбачає, що середнє забруднення тепер має становити 2,5 %, з потенційним діапазоном від 0 % до 5 %. У цьому разі при нормальному розподілі можна очікувати, що 90-100 % виробничих полів для продукування насіння у цьому прикладі відповідатимуть стандартів 95 %.

Приклад 7. Поле для виробництва батьківського насіння кукурудзи є ізольованим полем (201 метр (660 футів) або більше), яке містить лише одну батьківську рослину даного гібриду. Батьківській рослині дозволяють вільно запилитися або суттєвою мірою самозапилилися для збільшення насіння, таким чином, батьківського насіння було достатньо для використання батьківської рослини у виробництві гібридного насіння. Вимагається кілька поколінь розмножень батьківського насіння для виробництва достатньої кількості батьківського насіння, щоб зрештою використовувати батьківську рослину на ділянці для виробництва гібридного насіння.

У цьому прикладі виробництва батьківського насіння не передбачено ізоляції від іншої потенційно забруднюючої кукурудзи. Винахід практично втілюють, використовуючи пилок батьківських рослин, який було зібрано й законсервовано і одержано з пункту зберігання і нанесено на приймочки батьківських рослин о 6-й годині ранку. Очікується, що в результаті забруднення має бути знижене на 50 % або більше порівняно з такою самою виробничою практикою без втілення винаходу. Параметри цього прикладу можуть застосовуватися, коли ізоляційну відстань неможливо досягти, і батьківська рослина все одно має бути розмножена для виробництва гібридного насіння для важливого продукту. Цей сценарій може траплятися у місцях вирощування з нетиповими для даної пори року погодними умовами (наприклад, на Гавайях), коли компанія з виробництва насіння намагається розмножити батьківську рослину для майбутнього сезону вирощування.

Підсумок робочих прикладів. Приклади 1-4 пояснюють, яким чином цей винахід може працювати з різними рівнями успіху, залежно від характеристик чоловічих характеристик призначених чоловічих та жіночих рослин. В усіх чотирьох із цих прикладів, хоча й спостерігалось зниження забруднення при застосуванні моделювання винаходу або застосуванні самого винаходу, ідеальним було б використання консервованого пилку,

доступного на вимогу, для ілюстрації корисності та потенціалу цього винаходу. Це мало б дозволити нанесення пилку на приймочки у більш ідеальний час, коли можна уникнути будь-якої конкуренції з хмарою природного пилку і давало б велику стартову перевагу у розвитку в заданих приймочках, таким чином, щоб імовірність запліднення жіночих рослин іншим забруднюючим пилом значною мірою знижувалася, що знижує відсоток забруднення до ще нижчого рівня, ніж у цих прикладах.

Хоча різні типові варіанти втілення цього винаходу було описано вище з певним ступенем конкретності, спеціаліст у даній галузі зможе здійснити численні зміни в описаних варіантах втілення без відхилення від сутності або обсягу предмета винаходу, викладеного в описі та формулі винаходу. У деяких прикладах у способах, викладених авторами прямо або непрямо, різні етапи та операції описуються в одному можливому порядку, але спеціалісти у даній галузі мають визнавати, що етапи та операції можуть бути перепорядковані, замінені або видалені без обов'язкового відхилення від сутності та обсягу даного винаходу. Передбачається, що весь матеріал, який міститься у представленому вище описі або є показаним на супровідних фігурах, має розглядатися лише як ілюстративний, а не обмежувальний. Існує можливість змін у деталях та структурі без відхилення від сутності винаходу, як визначено у супровідній формулі винаходу.

Хоча даний винахід було описано з посиланням на варіанти втілення, викладені вище, різні альтернативи, модифікації, варіанти, вдосконалення та/або суттєві еквіваленти, або ті, що є відомими, або ті, що передбачаються або можуть бути передбачені у даний час, можуть стати очевидними для тих, хто має принаймні звичайну кваліфікацію у даній галузі. Перелік етапів способу у певному порядку не становить жодного обмеження для порядку етапів способу. Відповідно, варіанти втілення винаходу, викладені вище, передбачаються як ілюстративні, а не обмежувальні. Спеціалістам у даній галузі стане зрозумілою можливість змін у формі та деталях без відхилення від сутності та обсягу винаходу. Таким чином, винахід має охоплювати всі відомі або раніше розроблені альтернативи, модифікації, варіанти, вдосконалення та/або суттєві еквіваленти.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб вибору призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи, які сприйнятливі до отримання пилку, як готових до цільового перехресного запилення пилом призначених чоловічих рослин і, таким чином, придатні для виробництва необхідного гібридного насіння, де призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи, які включають жіночі компоненти, піддають впливу небажаного пилку, причому зазначений небажаний пилок є:

а) пилом від чоловічих компонентів призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи, пилок яких може викликати небажане самозапилення призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи; та/або

б) пилом від сторонніх рослин кукурудзи одного і того ж виду, що переноситься вітром, комахами та іншими природними факторами, пилок яких може викликати небажане перехресне запилення щодо цільового перехресного запилення;

причому спосіб включає вибір призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи, які сприйнятливі до отримання пилку, як готових для цільового перехресного запилення пилом призначених чоловічих рослин впродовж встановленого щоденного часового вікна, яке:

i) передує частині дня, протягом якої починає скидатися небажаний пилок, наприклад впродовж від раннього ранку до середини ранку та/або вночі;

ii) передує частині дня, після якої висихає щоденна роса; та/або

iii) саме в той час, коли жіночі компоненти призначених частин рослин вперше стають сприйнятливими до отримання пилку.

2. Спосіб вибору щоденного часового вікна, протягом якого призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи готові до цільового перехресного запилення пилом призначених чоловічих рослин і, таким чином, придатні для виробництва необхідного гібридного насіння, де призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи, які включають жіночі компоненти, піддають впливу небажаного пилку, причому зазначений небажаний пилок є:

а) пилом від чоловічих компонентів призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи, пилок яких може викликати небажане самозапилення призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи; та/або

б) пилом від сторонніх рослин кукурудзи одного і того ж виду, що переноситься вітром, комахами та іншими природними факторами, пилок яких може викликати небажане перехресне запилення щодо цільового перехресного запилення;
причому спосіб включає:

5 встановлення того, що жіночі компоненти призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи є сприйнятливими до отримання пилку; та

вибір щоденного часового вікна для призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи, при цьому щоденне часове вікно вибирають з періоду, що:

10 i) передує частині дня, протягом якої починає скидатися небажаний пилок, наприклад впродовж від раннього ранку до середини ранку та/або вночі;

ii) передує частині дня, після якої висихає щоденна роса; та/або

iii) саме в той час, коли жіночі компоненти призначених частин рослин вперше стають сприйнятливими до отримання пилку.

15 3. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пилок призначених чоловічих рослин складається з одного або декількох з наступних:

а) свіжого пилку,

б) консервованого пилку.

20 4. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пилок призначених чоловічих рослин являє собою свіжий пилок, який був зібраний з одного або декількох: поля, кліматичної камери, теплиці, оранжереї, тіньового будинку, аркової теплиці, установки для вертикального вирощування або гідропонної установки.

5. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пилок призначених чоловічих рослин являє собою консервований пилок, який був попередньо зібраний і збережений шляхом охолодження, кріоконсервації, заморожування, висушування заморожуванням або зберігання у рідкому азоті.

25 6. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пилок призначених чоловічих рослин був зібраний з одного або декількох з наступних:

i) джерела зі змінним циркадним ритмом;

ii) джерела з нормальним циркадним цвітінням, але в якому розвиток чоловічих компонентів призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи є затриманим; та

30 iii) джерела з нормальним циркадним цвітінням, у якому зазначені компоненти призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи можуть скидати пилок без затримки.

7. Спосіб за п. 1 або 2, у якому дозрівання чоловічих компонентів вибраної призначеної жіночої батьківської рослини затримують шляхом обробки.

35 8. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пилок призначених чоловічих рослин одержують з одного генетичного джерела.

9. Спосіб за п. 1 або 2, у якому пилок призначених чоловічих рослин одержують з різних генетичних джерел і комбінують перед застосуванням.

40 10. Спосіб за п. 1, що включає вибір призначених жіночих батьківських рослин кукурудзи, які сприйнятливі до отримання пилку, як готових до цільового перехресного запилення пилом призначених чоловічих рослин впродовж встановленого щоденного часового вікна, як визначено в п. 1, у множину днів впродовж множини встановлених щоденних часових вікон, або спосіб за п. 2, у якому множину встановлених щоденних часових вікон вибирають у множину днів.

45 11. Спосіб за п. 1 або 2, у якому встановлене щоденне часове вікно, як визначено у п. 1, або у якому вибране щоденне часове вікно, як визначено у п. 2, має місце після появи приймочок призначених жіночих батьківських рослин, але до того, як буде скинутий небажаний пилок.

50 12. Спосіб за п. 1 або 2, у якому встановлене щоденне часове вікно, як визначено у п. 1, або у якому вибране щоденне часове вікно, як визначено у п. 2, має місце після як появи приймочок, так і скидання пилку призначених жіночих батьківських рослин, але в той час, коли скидання небажаного пилку не відбувається активно.

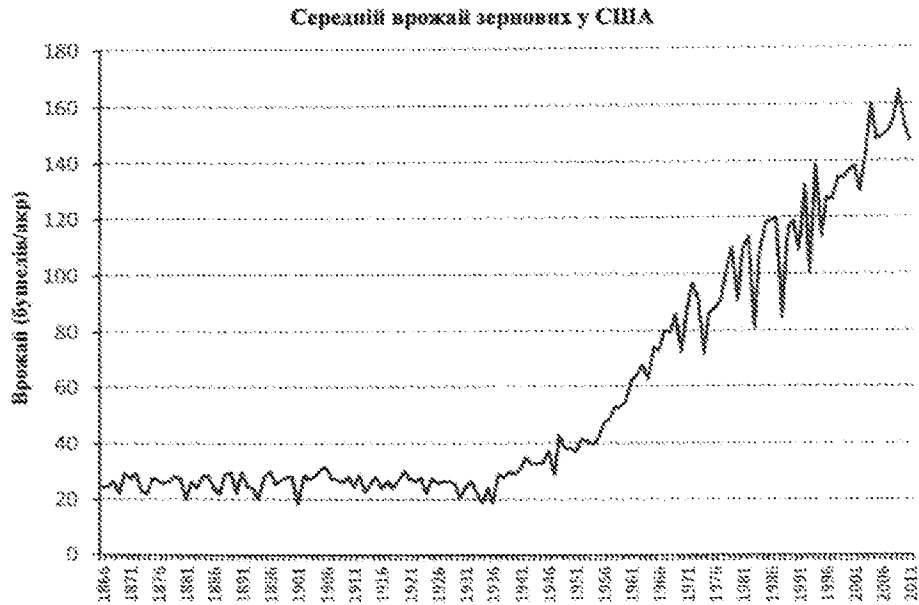
55 13. Спосіб за п. 1, у якому призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи, які сприйнятливі до отримання пилку, вибирають як готові для цільового перехресного запилення впродовж щоденного часового вікна, що починається о 6 ранку, або спосіб за п. 2, у якому вибране щоденне часове вікно являє собою час, впродовж якого призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи сприйнятливі до отримання пилку і готові для цільового перехресного запилення впродовж щоденного вікна, що починається о 6 ранку.

60 14. Спосіб за п. 1, у якому призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи, які сприйнятливі до отримання пилку, вибирають як готові для цільового перехресного запилення впродовж щоденного вікна, що являє собою час перед висиханням щоденної роси і до часу, вибраного з 13:00 або 10:00 ранку, або спосіб за п. 2, у якому вибране щоденне часове вікно являє собою

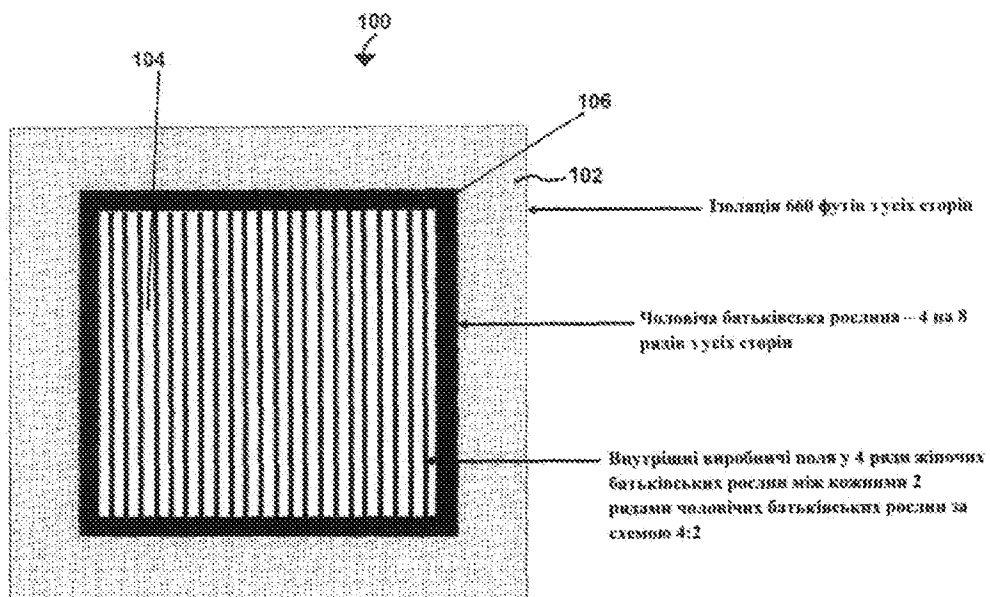
час, впродовж якого призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи сприйнятливі до отримання пилку у час перед висиханням щоденної роси і до часу, вибраного з 13:00 або 10:00 ранку.

15. Спосіб за п. 1 або 2, у якому призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи є чоловічостерильними.

5 16. Спосіб за п. 1 або 2, у якому призначені жіночі батьківські рослини кукурудзи вирощують в польових умовах або в контрольованому середовищі, яке піддається впливу небажаного пилку.



ФІГ. 1



ФІГ. 2