

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033609**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.08

(21) Номер заявки
201300385

(22) Дата подачи заявки
2011.09.16

(51) Int. Cl. *A01H 1/04* (2006.01)
B07C 5/34 (2006.01)
G01N 21/35 (2006.01)

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНБРЕДНЫХ СЕМЯН ИЗ СМЕШАННОЙ ПОПУЛЯЦИИ ИНБРЕДНЫХ И ГИБРИДНЫХ СЕМЯН И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

(31) 1015791.5

(32) 2010.09.20

(33) GB

(43) 2013.09.30

(86) PCT/EP2011/066136

(87) WO 2012/038350 2012.03.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗИНГЕНТА ЛИМИТЕД (GB);
ЗИНГЕНТА ПАРТИСИПЕЙШНС АГ
(CH)

(72) Изобретатель:
Бенсли-Бромилу Джон Чарлз
Батгликс (CH), Брунс Роберт
Фритцпатрик (US), Мартин Барри
Эндрью, Нойффер Карстен (CH)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белюсов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В. (RU)

(56) PEREZ-PRAT E. ET AL.: "Hybrid seed production and the challenge of propagating male-sterile plants", TRENDS IN PLANT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 7, no. 5, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 199-203, XP002414650, ISSN: 1360-1385, DOI:10.1016/S1360-1385(02)02252-5 the whole document
WO-A1-03004179
CA-A1-2280364
WO-A1-9201366

(57) Изобретение относится к способу выделения инбредных семян из смешанной популяции инбредных и гибридных семян, включающему следующие стадии: (а) обеспечение смешанной популяции инбредных и гибридных семян; (b) разделение указанной популяции с помощью устройства на (i) популяцию инбредных семян и (ii) популяцию гибридных семян, где указанные семена являются семенами пшеницы или ячменя, и указанное устройство отделяет указанные инбредные семена от гибридных семян на основе различия между их светоотражательной и/или поглощательной характеристиками, которое выявляют с использованием излучения ближней инфракрасной области спектра, где это различие свидетельствует о различии в генотипе инбредных и гибридных семян, и где указанное устройство включает: (а) средство отбора каждого семени в рамках смешанной популяции; (b) средство для получения спектральных данных ближней инфракрасной области спектра для каждого семени; (с) средство для идентификации каждого семени, инбредного или гибридного, на основе указанных спектральных данных; (d) средство для отделения каждого семени на основе указанных данных и (е) средство сбора отделенных таким образом семян, где указанное различие в генотипе можно определить с помощью NIR спектрометра, имеющего технические характеристики, описанные в табл. 3, и к применению разделяющего семена устройства, включающего средства (а)-(е), указанные выше, для осуществления способа.

033609 B1

033609 B1

Изобретение относится к способу выделения инбредных семян из смешанной популяции гибридных семян F_1 и инбредных семян. В особенности данный способ применим к сортировке семян злаков, в особенности семян пшеницы и семян ячменя. Также изобретение относится к применению разделяющего семена устройства для осуществления указанного способа выделения.

Злаковые сельскохозяйственные культуры культивируются в большинстве стран по всему миру и являются богатым источником белка, углеводов, минеральных веществ, витаминов, масел и жиров. Термин "злак", как правило, охватывает травянистые растения из семейств однодольных растений, известных как Poaceae или Gramineae. Особый интерес представляют злаковые сельскохозяйственные культуры пшеницы и ячменя.

Пшеница является ключевой глобальной продовольственной сельскохозяйственной культурой; она является ведущим источником растительного белка в пище и продовольственной культурой, в наибольшей степени вовлеченной в международную торговлю. Зерна пшеницы применяются в создании разнообразных продуктов питания, включая хлебобулочные изделия; бисквиты; макаронные изделия; сухой завтрак из продуктов переработки зерна; корм для животных, и могут сбраживаться для применения в пивоварении или применяться в создании биологического топлива. К тому же остальные части растения пшеницы можно применять в качестве строительных материалов, таких как кровельный материал. На удивление, глобальное производство пшеницы увеличивается менее чем на 1% в год, тогда как государственный заказ по некоторым источникам увеличивается на 1,5% в год. С увеличением населения мира остается необходимость в создании еще более эффективных способов максимизации отдачи от все более ценных и дорогих мировых земель сельскохозяйственного назначения.

Ячмень является злаковым зерном, получаемым от *Hordeum vulgare*. В сообщениях утверждается, что его выращивают более чем в 100 странах во всем мире и его зерно применяют преимущественно в качестве продукта питания. В частности, ячмень широко применяют в корме для животных, однако его также применяют в солодоращении для создания ключевого ароматизирующего ингредиента пива и виски. Ячмень также применяют в других продуктах питания и в производстве других алкогольных и безалкогольных напитков.

Преимущества высокоурожайных гибридных растений признали давно. Гибридные сорта будут часто проявлять чрезвычайно однородный фенотип по сравнению с их инбредными родителями. Гибриды получают пользу от сочетанных признаков родителей, которые приводят к усиленной сопротивляемости заболеваниям и мощности, что, в свою очередь, может обуславливать увеличенный урожай. Гибриды также дают возможность простого разведения для сочетания характерных черт или признаков, сочетание которых иными способами могло быть затруднительным, и обычно дают больший выход с единицы площади при использовании факторов роста, таких как вода и удобрение.

Гибриды F_1 производят посредством оплодотворения обладающего мужской стерильностью женского растения пыльцой от мужского растения-донора. Следовательно, одним из критических аспектов производства гибридов является гарантирование того, что в отношении женского растения предотвращают самоопыление, оставляя его в то же время фертильным. Из уровня техники известны разнообразные способы и методики для получения мужской стерильности женской родительской особи. Примеры включают механическое удаление мужской пыльцы, которая продуцирует часть растения, такое как "удаление метелок", выполняемое на кукурузе.

Применение цитоплазматической мужской стерильности (CMS) для коммерческого производства гибридов требует стабильной обладающей мужской стерильностью цитоплазмы и источника пыльцы. Цитоплазматическая генетическая система мужской стерильности требует существования трех типов линий для производства гибридов, линии А (обладающей цитоплазматической мужской стерильностью), линии В (закрепителя мужской фертильности) и линии R (обладающей мужской фертильностью, с генами-восстановителями). Скрещивания, производимые при использовании данной системы, включают закрепление и производство трех линий, линии А и линии В одной из инбредных особей, которые скрещивают с увеличением семян женского компонента в состоянии линии А для применения на конечном этапе производства гибридов, и линии R, обладающей мужской фертильностью, содержащей ген(ы) восстановления, применяемой в качестве мужского компонента на конечном этапе производства гибридов.

Гибридные семена также можно производить посредством применения химических веществ, ингибирующих образование жизнеспособной пыльцы. Эти химические вещества, называемые гаметоцидами, применяют для придания преходящей мужской стерильности.

Гибриды можно дополнительно создавать посредством применения методик молекулярной биологии. В целом, женскую родительскую особь можно сконструировать так, чтобы сделать невозможным продуцирование пыльцы с целью достижения мужской стерильности. О таких методиках также широко сообщалось, и они являются хорошо известными специалисту в данной области техники. Последнее усовершенствование таких методик включает химическую систему мужской стерильности, основанную на превращении неактивного D-энантиомера (D-глюофосината) гербицида на основе глюофосината в фитотоксичный L-энантиомер (L-глюофосинат), чье превращение локализовано в пыльниках. Превращение не являющегося фитотоксичным D-глюофосината в фитотоксичный L-глюофосинат приводит в результате к локализованному в высокой степени разрушению пыльника, таким образом приводя растение в состоя-

ние мужской стерильности. Это превращение осуществляют посредством активирующего фермента (модифицированной формы оксидазы D-аминокислот), который специфически экспрессируется в пыльниках. Эта система дополнительно описана в WO 2005/005641.

Главным недостатком традиционных систем производства гибридных семян является необходимость высаживать отдельные ряды, полосы или блоки мужских и женских родительских линий. В отношении производства гибридов пшеницы, например, это иногда именуют системой посадки с изоляцией семенных участков. Одной из характерных свойств системы посадки с изоляцией семенных участков является то, что мужские и женские растения разделяют по разным семенным участкам. Мужской семенной участок содержит мужские растения-опылители, и он полностью отделен от женского семенного участка, который содержит женские особи, обладающие мужской стерильностью. Семенные участки отделяют до такой степени, что с целого женского семенного участка можно собирать урожай в полной уверенности, что он не будет содержать каких-либо мужских инбредных семян ввиду того, что мужские особи присутствуют в отдельном семенном участке. Существует аналогичная система для производства гибридов ячменя, где растения выращивают в полосах мужских и женских особей. В данном случае низкое коэффициентное опыление является особенно острой проблемой для таких видов сельскохозяйственных культур, как пшеница и ячмень, которые высвобождают небольшие количества пыльцы, которая не распространяется далеко по ветру и остается жизнеспособной лишь в течение очень короткого периода времени. При таких сельскохозяйственных культурах до двух третей поля, на котором производится гибриды, необходимо выделить под мужские растения, являющиеся донорами пыльцы, и в этом случае производство гибридных семян, следовательно, становится экономически невыгодным.

В целях достижения экономически более выгодного производства семян сельскохозяйственных культур пшеницы и ячменя было бы необходимо совместно переместить мужские и женские растения на более близкое расстояние в целях более эффективного переноса пыльцы; наиболее эффективно путем посадки в междурядьях мужских и женских особей в рамках нескольких сантиметров друг от друга в одних и тех же рядах. Однако в такой системе было бы непрактично собирать урожай семян только с (обладающих мужской стерильностью) женских родительских особей.

Кроме того, в то время как гибриды ячменя можно создавать посредством системы посадки в междурядьях, практический объем этих действий ограничен, поскольку семена из собранного урожая включают как гибридные, так и инбредные, и устойчивость к инбредному "загрязнению" в рамках семян из собранного урожая является относительно низкой. Одна из проблем методики посадки в междурядьях относится к общей эффективности производства гибридов, поскольку число мужских особей, применяемых в рамках методики посадки в междурядьях, может быть лишь небольшим, чтобы придерживаться строгих пределов низкой процентной доли инбредных семян, присутствующих в рамках общего урожая гибридных семян, получаемых посредством данной методики. Низкое число применяемых мужских особей означает, что с учетом низкой эффективности опыления, как указано выше, часть женских растений не будет опыляться и, таким образом, не будет вовсе продуцировать никаких зерен. Это оказывает влияние на общий урожай с поля, и с помощью увеличения числа мужских особей с целью увеличения эффективности опыления это явление не преодолеют, поскольку таковая мера увеличит число инбредных семян в общем урожае, если принять, что процентная доля инбредных форм, полученных в рамках общего урожая, находится вне допустимых пределов. Это представляет собой существенное препятствие, влияющее на эффективность гибридной системы посадки в междурядьях. Кроме того, существует необходимость в обеспечении системы, при помощи которой урожай гибридных семян можно было бы легко проверить, чтобы гарантировать, что процентная доля инбредных семян находится в рамках утвержденных пределов. К тому же существует необходимость в обеспечении системы, которая может гарантировать, что инбредные семена, присутствующие в рамках гибридных семян из собранного урожая, соответствуют таким пределам путем, при необходимости, удаления каких-либо избыточных инбредных семян для соответствия официальным требованиям.

Создание гибридных злаков, таких как пшеница и ячмень, экономически обоснованным способом остается проблемой. Как описано выше, метод отдельной посадки с изоляцией семенных участков/ленточной посадки является дорогостоящим методом, и более дешевая система посадки в междурядьях остается непрактичной с несколько более низким урожаем гибридных семян.

С учетом этих проблем существует необходимость в разработке способов увеличения урожая пшеницы и ячменя и в обеспечении механизма, при помощи которого можно было бы собирать урожай зерна пшеницы и ячменя коммерчески приемлемым образом. Настоящее изобретение адресовано решению разнообразных проблем, существующих в настоящих способах производства гибридной пшеницы и гибридного ячменя, в особенности гибридного ячменя. Более того, с ростом потребности в пищах увеличивающегося населения мира, остается необходимость в более эффективных способах производства высококачественных сельскохозяйственных культур, таких как гибридный ячмень и пшеница, и максимизации применения ограниченных земель сельскохозяйственного назначения, доступных благодаря, *inter alia*, сокращению отходов в связи с отсутствием опыления женских растений в производстве гибридов.

По настоящему изобретению обеспечивается способ выделения инбредных семян из смешанной популяции инбредных и гибридных семян, включающий следующие стадии: (а) обеспечение смешанной

популяции инбредных и гибридных семян; (b) разделение указанной популяции с помощью устройства на (i) популяцию инбредных семян и (ii) популяцию гибридных семян, где указанные семена являются семенами пшеницы или ячменя, и указанное устройство отделяет указанные инбредные семена от гибридных семян на основе различия между их светоотражательной и/или поглощательной характеристиками, которое выявляют с использованием излучения ближней инфракрасной области спектра, где это различие свидетельствует о различии в генотипе инбредных и гибридных семян, и где указанное устройство включает: (a) средство отбора каждого семени в рамках смешанной популяции; (b) средство для получения спектральных данных ближней инфракрасной области спектра для каждого семени; (c) средство для идентификации каждого семени, инбредного или гибридного, на основе указанных спектральных данных; (d) средство для отделения каждого семени на основе указанных данных и (e) средство сбора отделенных таким образом семян, где указанное различие в генотипе можно определить с помощью NIR спектрометра, имеющего технические характеристики, описанные в табл. 3. Суммарным эффектом способа по настоящему изобретению является обеспечение набора инбредных семян и набора гибридных семян, отделенных от их смешанной популяции. Устройство будет, как правило, содержать средство отбора образцов каждого семени в рамках популяции, которое, как правило, будет включать выделение семян таким образом, что каждое отдельное семя может быть выделенным. Указанный отбор образцов будет включать определение характеристик отражения и/или поглощения каждого семени при помощи света ближней инфракрасной области спектра. Например, семена можно освещать светом предварительно определенного спектра и измерять спектральные свойства отраженного света. Для выявления посредством пропускания выявитель располагают так, чтобы он измерял свет, пропускаемый через семя, и таким образом измерял спектральные свойства света, пропускаемого через семя. По получении этих данных устройство будет распознавать семя как инбредное или гибридное на основе измерений, произведенных при сравнении с контрольными стандартами, как распознается устройством. Как правило, данную операцию выполняют посредством сравнения с использованием вычислительной машины данных, полученных от образца семени, с предварительно запрограммированными стандартами так, чтобы семя можно было определить как таковое на инбредной или гибридной основе. По выполнении анализа и определении организма либо как гибридного, либо как инбредного устройство будет обеспечивать средство отделения семян в зону сбора, которая содержит семена, подвергнутые такому же анализу и которые дали на выходе такие же результаты. Смешанную популяцию семян, следовательно, разделяют на составляющие инбредную и гибридную части посредством операции на этом устройстве. Примеры устройств, которые можно применять в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают такие, описанные в EP 1401589 и EP 1578544.

Различие между гибридными и инбредными семенами по способам и устройствам по настоящему изобретению в данном описании также можно выявить посредством применения визуализации терагерцевого излучения, электромагнитного излучения; звуковых волн; ультрафиолетового света; инфракрасного света, флуоресцентного света; ультразвуковых волн; микроволн; ядерного магнитного резонанса в отдельности или в сочетании. Такие способы выявления можно также преимущественно сочетать с применением света ближней инфракрасной области спектра.

Гибридные и инбредные семена по настоящему изобретению преимущественно различают без необходимости в уничтожении или оказании отрицательного влияния на семена. Более того, применение света ближней инфракрасной области спектра обеспечивает механизм проведения различий между гибридными и инбредными семенами без необходимости сортировки на основе содержания белка, содержания масел или цвета, каковая уже является в целом общеизвестной из известного уровня техники как средство проведения различий между семенами. Способ по настоящему изобретению, следовательно, обеспечивает средство проведения различий между гибридными и инбредными семенами на основе свойств семян, которые не находятся, как правило/в значительной степени, под влиянием окружающей среды, в которой происходит выращивание.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ по любому из предыдущих пунктов, где указанное устройство содержит: (a) средство отбора каждого семени в рамках смешанной популяции; (b) средство для получения спектральных данных по ближней инфракрасной области спектра для каждого семени; (c) средство для идентификации каждого семени как инбредного или гибридного семени на основе указанных спектральных данных; (d) средство отделения каждого семени на основе указанных данных и (e) средство сбора отделенных таким образом семян. Семена можно определить в соответствии с данным способом посредством сравнения спектральных данных, полученных для каждого образца, со спектральными данными для контрольного образца гибридного и инбредного организмов.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ, описанный выше, где указанное устройство выделяет семена так, чтобы образующаяся в результате популяция разделенных гибридных семян содержала не более чем около 5% инбредных семян. Способ по настоящему изобретению можно задействовать в гарантировании того, что количество инбредных семян, присутствующих в рамках гибридных семян, собранных для последующей посадки, находится в рамках утвержденных пределов, путем отделения какого-либо избытка. Например, если утвержденный предел инбредных семян в рамках популяции гибридных семян, созданной для последующей посадки, составляет 5%, то способ по настоящему изобретению

бретению можно использовать для гарантирования того, что семена, выбранные для последующей посадки, содержат не более чем 5% инбредных семян. Способ по настоящему изобретению предпочтительно используют для выделения всех инбредных семян, однако способ можно, тем не менее, приводить в действие для гарантирования того, что семена, выбранные для последующей посадки, соответствуют любым инструкциям, связанным с количеством инбредных семян, разрешенного для присутствия в гибридной популяции. В еще одних вариантах осуществления настоящего изобретения способ можно использовать для гарантирования того, что семена, выбранные для последующей посадки, содержат не более чем процентная доля инбредных семян, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15% и более чем 15%. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способ используют на семенах ячменя для гарантирования того, что семена, выбранные для последующей посадки, содержат не более чем 10% инбредных семян. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения способ используют на семенах тритикале для гарантирования того, что семена, выбранные для последующей посадки, содержат не более чем 5% инбредных семян.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ, описанный выше, где указанными семенами являются таковые ячменя или пшеницы. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения способы и устройства, описанные в данном описании, задействуют в сортировке семян ячменя.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ, описанный выше, где в указанном устройстве задействован алгоритм проведения различий между спектральными данными по ближней инфракрасной области спектра, полученными от указанных инбредных и указанных гибридных семян, что в таком случае дает возможность отсортировать семена на основе указанных спектральных данных. Перед выполнением способов по настоящему изобретению контрольные семена можно испытывать для уточнения спектральных данных, данных отражательной способности и/или пропускания относительно выбора гибридных и инбредных семян. По создании этих данных их можно задействовать в создании алгоритма для применения в установлении различий между семенами. Это также можно применять в устройстве, которое, как описано выше, содержит средства испытания каждого из семян в общей популяции и затем на основе результатов, сравниваемых со стандартами, отбора семян, которые относятся к релевантной категории инбредных или гибридных таковых, и разделения соответственно этому. Специалист в данной области техники способен создать надлежащий алгоритм для применения в устройстве, описанном в данном описании, на основе определения спектральных данных семян, которые следует отсортировать.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ по любому из предыдущих пунктов, где указанное различие является генотипическим различием.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ по любому из предыдущих пунктов, где указанное различие относится к количеству соединения, выбранного из глюкозы; ксиллозы; маннозы; галактозы; арабинозы или их сочетания, в семенах.

Способ обеспечивает получение главным образом чистых гибридных семян F_1 и главным образом чистых инбредных семян, при этом указанный способ включает: (a) посадку в междурядьях популяции родительских растений в рамках поля, где указанная популяция содержит мужские и женские родительские особи, где указанные женские особи, по меньшей мере частично, обладают мужской стерильностью; (b) обеспечение самооплодотворения указанных мужских особей и перекрестного оплодотворения указанных женских особей; (c) сбор урожая полученных в результате удобренных семян и (d) разделение указанных семян на основе различия между указанными гибридными и указанными инбредными семенами с получением (i) гибридных семян F_1 и (ii) инбредных семян, отличающийся тем, что указанное растение является злаковым растением, указанные растения сажали в междурядьях в соотношении, обеспечивающем опыление существенного большинства указанных женских растений и где указанные семена разделяют на основе различия, которое выявляют посредством применения света ближней инфракрасной области спектра.

Термин "гибрид" эквивалентен "гибриду F_1 ". Термин "семена" может быть взаимозаменяемым с термином "зерно". Термин "проводить посадку в междурядьях" означает, что мужские и женские растения высаживают при относительно близком соседстве так, чтобы при сборе урожая семена содержали смесь гибридных семян и инбредных семян. Посадка в междурядьях будет поэтому предотвращать сбор урожая чистых гибридных семян *per se*, поскольку не будет представляться возможным избежать сбора урожая мужских инбредных семян в связи с близким соседством мужских растений в рамках поля, содержащего женские особи. Мужские растения-опылители можно высаживать в конкретных точках в рамках популяции женских особей рядами или по другому типу структуры в рамках популяции женских особей. Посадка в междурядьях будет, однако, делать невозможным сбор урожая с поля без сбора урожая как гибридных, так и инбредных семян, смешанных вместе. Специалист в данной области техники в целом хорошо знаком с принципом "посадки в междурядьях". Термин "разделение", применяемый к семенам, эквивалентен "сортировке".

Для применения в настоящем изобретении можно создать растение, обладающее мужской стерильностью, посредством многочисленных методик, хорошо известных специалисту в данной области техни-

ки и согласно изложенному выше. В конкретном варианте растение, обладающее мужской стерильностью, создают посредством метода использования цитоплазматической мужской стерильности (CMS). Такой метод описан *inter alia* в (Wilson, J.A., and W.M. Ross. 1961. Cross-breeding in wheat, *Triticum aestivum* L: I. Frequency of the pollen-restoring character in hybrid wheats having *Aegilops ovata* cytoplasm; *Crop Sci.* 1:191-193; Wilson, J.A., and W.M. Ross. 1962. Cross-breeding in wheat, *Triticum aestivum* L; II. Hybrid seed set on a cytoplasmic male-sterile winter wheat composite subjected to cross-pollination. *Crop Sci.* 2:415-417; Chen. 2003. Improving male fertility restoration of common wheat for *Triticum timopheevii* cytoplasm. *Plant Breeding* 122, pp. 401-404; и *Bread Wheat - Improvement and Production 2002* Edited by Curtis, Rajaram and Gomez Macpherson ISBN: 9251048096 - в особенности раздел "Hybrid Wheat" по G. Cisar и D.B. Cooper). Специалист в данной области техники признает, что вышеупомянутые общие принципы производства гибридов также применимы к производству гибридного ячменя. Система CMS для ячменя широко описана Ахокасом и соавт. (Ahokas et al.) (Ahokas, H. 1979. Cytoplasmic male sterility in barley. III. Maintenance of sterility and restoration of fertility in the *msm1* cytoplasm. *Euphytica* 28:409-419; Ahokas, H. 1980. Cytoplasmic male sterility in barley. VII. Nuclear genes for restoration. *Theor. Appl. Genet.* 57:193-202; Ahokas, H. 1982. Cytoplasmic male sterility in barley. XI. The *msm2* cytoplasm. *Genetics* 102:285-295; Ahokas, H., and E.A. Hockett. 1981. Performance tests of cytoplasmic male-sterile barley at two different latitudes. *Crop Sci.* 21:607-611), и ее применяли в производстве гибридов ячменя (Ramage RT (1983) Heterosis and hybrid seed production in barley. In: Frankel R. (ed) *Heterosis: reappraisal of theory and practice* (Monogr Theor Appl Genet vol. 6). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 71-93), что впоследствии развилось в коммерческую систему.

В дополнительном варианте осуществления растение, обладающее мужской стерильностью, создавали посредством химического метода с задействованием генетической модификации, такого как система, дополнительно описанная в WO 2005/005641.

Следует также иметь в виду, что способ по настоящему изобретению преимущественно дает возможность проводить посадку в междурядьях мужских и женских родительских особей без необходимости удаления родительской особи - донора, обладающей мужской фертильностью, из популяции вслед за опылением женской родительской особи. Данный способ поэтому избавлен от необходимости и затрат, включенных в удаление мужских особей из популяции вслед за опылением химическим или механическим путем. Еще более преимущественно в способах по настоящему изобретению преодолевают проблемы и затраты, связанные с системой посадки с изоляцией семенных участков, как описано выше. К тому же способ по настоящему изобретению дает возможность задействовать с коммерческой точки зрения как гибридные семена, так и инбредные семена.

Термин "по меньшей мере частично обладающий мужской стерильностью" означает, что женская родительская особь либо способна подвергаться перекрестному опылению пылью от отделенного мужского родительского растения, либо может в определенных условиях самоопылиться. Для производства гибридных растений женскую родительскую особь будут опылять посредством пыли от отделенного мужского родительского растения, посаженного в междурядьях с женским растением.

Специалист в данной области техники примет во внимание, что мужские растения следует сажать в междурядьях с женскими растениями таким способом, чтобы для пыли была максимально благоприятная возможность переноса к женским растениям в рамках поля. Это обыкновенно будет включать равномерное распределение мужских растений по всему полю так, чтобы все женские растения находились в рамках соседства с мужским растением на расстоянии, которое может быть признано специалистом в данной области техники как приемлемое для достижения опыления. В рамках компетентности специалиста в данной области техники вполне возможно спроектировать полевой план посадки в междурядьях на основе размера и формы поля.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ, описанный выше, где указанное соотношение обеспечивает опыление существенного большинства указанных женских растений, при этом минимизируя число самооплодотворяемых мужских растений, таким образом максимизируя урожай гибридных семян в рамках общего урожая семян с указанного поля. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанное соотношение обеспечивает минимальное число мужских растений, требуемых для достижения опыления существенного большинства указанных женских растений, таким образом максимизируя урожай гибридных семян в рамках общего урожая семян с указанного поля.

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ, описанный выше, где указанные женские родительские особи в полной мере обладают мужской стерильностью.

Термин "в полной мере обладающий мужской стерильностью" означает, что женская родительская особь не способна к самоопылению и таким образом может только подвергаться перекрестному опылению пылью от отделенного мужского родительского растения, посаженного в междурядьях с женским растением. Термин "в полной мере обладающий мужской стерильностью" может также быть взаимозаменяемым с термином "обладающий мужской стерильностью".

Настоящее изобретение, более того, обеспечивает способ, описанный выше, где указанное соотношение обеспечивает опыление по меньшей мере около 80% указанных женских растений. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения указанное соотношение обеспечивает опыле-

ние более чем 80% указанных женских растений. В еще одном варианте осуществления указанное соотношение обеспечивает опыление более чем 85% указанных женских растений. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанное соотношение обеспечивает опыление по меньшей мере около 90% указанных женских растений. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанное соотношение обеспечивает опыление более чем 90% указанных женских растений. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанное соотношение обеспечивает опыление по меньшей мере около 95% указанных женских растений. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанное соотношение обеспечивает опыление более чем 90% указанных женских растений. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения указанное соотношение обеспечивает опыление существенного большинства указанных женских растений. Как указано выше, желательно максимизировать урожай гибридов с поля, при этом минимизируя число самооплодотворяемых мужских растений, таким образом максимизируя урожай гибридных семян в рамках общего урожая семян с указанного поля. Это можно продемонстрировать численно через посредство расположенной ниже табл. А, в которой представлен типичный результат производства гибридов.

Таблица А

(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)
% посаженной в междурядьях женской линии А	% посаженной в междурядьях мужской линии R	% опыления женской линии А	Общий урожай с поля как % от нормальных показателей урожая	% полученных от женских особей семян F1 на поле, с которого собрали урожай	% мужских семян на поле, с которого собрали урожай	Урожай гибридов как % от урожая нормальных семян
100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
99%	1%	13%	14%	93%	7%	13%
98%	2%	26%	27%	93%	7%	25%
97%	3%	39%	41%	93%	7%	38%
96%	4%	52%	54%	93%	7%	50%
95%	5%	65%	67%	93%	7%	62%
94%	6%	67%	69%	91%	9%	63%
93%	7%	68%	70%	90%	10%	63%
92%	8%	70%	72%	89%	11%	64%
91%	9%	71%	74%	88%	12%	65%
90%	10%	73%	75%	87%	13%	65%
89%	11%	74%	77%	86%	14%	66%
88%	12%	76%	78%	85%	15%	66%
87%	13%	77%	80%	84%	16%	67%
86%	14%	79%	82%	83%	17%	68%
85%	15%	80%	83%	82%	18%	68%
84%	16%	82%	84%	81%	19%	68%
83%	17%	83%	86%	80%	20%	69%
82%	18%	85%	87%	79%	21%	69%
81%	19%	86%	89%	79%	21%	70%
80%	20%	88%	90%	78%	22%	70%
79%	21%	89%	91%	77%	23%	70%
78%	22%	91%	93%	76%	24%	71%
77%	23%	92%	94%	75%	25%	71%
76%	24%	94%	95%	75%	25%	71%
75%	25%	95%	96%	74%	26%	71%
74%	26%	95%	96%	73%	27%	70%
73%	27%	95%	97%	72%	28%	70%
72%	28%	96%	97%	71%	29%	69%
71%	29%	96%	97%	70%	30%	68%
70%	30%	96%	97%	69%	31%	67%
69%	31%	96%	97%	68%	32%	66%
68%	32%	96%	98%	67%	33%	66%
67%	33%	97%	98%	66%	34%	65%
66%	34%	97%	98%	65%	35%	64%
65%	35%	97%	98%	64%	36%	63%
64%	36%	97%	98%	63%	37%	62%
63%	37%	97%	98%	62%	38%	61%
62%	38%	98%	99%	61%	39%	61%
61%	39%	98%	99%	60%	40%	60%
60%	40%	98%	99%	60%	40%	59%
59%	41%	98%	99%	59%	41%	58%
58%	42%	98%	99%	58%	42%	57%
57%	43%	99%	99%	57%	43%	56%
56%	44%	99%	99%	56%	44%	55%
55%	45%	99%	99%	55%	45%	54%
54%	46%	99%	100%	54%	46%	54%
53%	47%	99%	100%	53%	47%	53%
52%	48%	100%	100%	52%	48%	52%
51%	49%	100%	100%	51%	49%	51%
50%	50%	100%	100%	50%	50%	50%

Из этого поэтому следует, что производственное поле с составляющей в 25% мужских особей и составляющей в 75% женских особей обеспечит урожай гибридов в 74% и урожай мужских самоопыляемых особей в 26% с поля. Данное распределение мужских/женских особей обеспечивает более высокий урожай гибридов как процент от урожая нормальных в полной мере фертильных семян (71%). В соответствии с настоящим изобретением данную популяцию можно затем отсортировать на соответствующие группы 74% гибридных семян и 26% мужских инбредных семян, предоставляя возможность продажи чистых гибридных семян и применения мужских семян в дополнительном производстве или продаже по хорошо известным путям сбыта зерна. Специалист в данной области техники способен выбрать надлежащее соотношение мужских:женских особей с целью максимизации урожая гибридов в рамках общего урожая семян с поля. Специалист в данной области техники также примет во внимание, что каждая отдельная генетическая комбинация мужских/женских особей может обладать собственной оптимальной структурой процентных долей в связи с различающейся способностью к завязыванию семян, связанной с генетическим контролем женской восприимчивости и ожидаемой производительности мужской пыльцы.

Одним из аспектов настоящего изобретения также является то, что разделение можно предпринимать быстро. В конкретном варианте осуществления семена можно разделять при скорости около 10 стандартных тонн (из общего количества семян) в час. В еще одном варианте осуществления семена можно разделять при скорости около 30 стандартных тонн в час. В еще одном варианте осуществления семена можно разделять при скорости свыше 55 стандартных тонн в час. По всему данному описанию термин "тонны" выражают в "стандартных тоннах".

В изобретении применяется уборочная машина для сбора урожая и разделения чистых гибридных семян злаков F_1 и чистых инбредных семян злаков, и она содержит средство сбора урожая семян злаков от зрелых злаковых растений и средство разделения указанных семян на основе различия между указанными гибридными и указанными инбредными таковыми с получением (i) гибридных семян злаков F_1 и (ii) инбредных семян злаков, где указанные семена разделяют на основе различия, которое выявляют посредством применения света ближней инфракрасной области спектра. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанные семена злаков являются семенами ячменя.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается применение разделяющего семена устройства для разделения гибридных семян злаков и инбредных семян злаков, где указанное разделение происходит на основе различия между указанными гибридными и указанными инбредными таковыми, где указанное различие выявляют посредством применения света ближней инфракрасной области спектра. В конкретном варианте осуществления указанного применения указанные семена злаков являются семенами ячменя. В альтернативном варианте осуществления указанного применения указанные семена злаков являются семенами пшеницы.

Способы, описанные выше, можно задействовать в создании главным образом чистых гибридных семян ячменя и главным образом чистых инбредных семян ячменя. Кроме того, способы можно задействовать в создании главным образом чистых гибридных семян пшеницы и главным образом чистых инбредных семян пшеницы. В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ, устройство и применение, как описано по всему данному описанию, где термин "ячмень" заменен на "пшеницу". Настоящее изобретение теперь будет продемонстрировано посредством следующего неограничивающего примера.

Пример. Протокол эксперимента для односемянных измерений с применением NIR.

Существует много технологий оптической сортировки, доступных сегодня на рынке, для сортировки на односемянной основе. Каждое семя измеряют, и его спектральные свойства сравнивают с предварительно определенными значениями. На основе этого сравнения семена можно классифицировать и сортировать на различные фракции с тем, чтобы каждая фракция показывала различное качество семян. Следующий способ разработали для сортировки гибридных семян злаков от инбредных мужских линий при помощи спектроскопии в ближней инфракрасной области спектра. Семь (7) образцов разведения ячменя (табл. 1 и 2) анализировали с применением NIR как на отражательную способность (NIRS), так и на режим пропускания (NITS), и полученные в результате спектральные данные применяли для разработки классификационной модели. Результаты показали, что спектры отдельных интактных семян при применении нормированных спектров различались незначительно; эти измерения можно усреднить с получением одного спектра на множество. Однако в целях данного исследования в классификации применяли одинарный спектр на семя, а не средний спектр на множество. Спектральные области обнаруживали в случаях, когда гибридные и мужские инбредные семена различались по нормированному сигналу. В отношении выбранного набора образцов картины распределения частично перекрывались, однако представляется возможным разработать математическую модель для установления различий между различными классами. Можно применять эффективный способ сортировки для гарантирования того, что гибридные семена из собранного урожая соответствуют уровням устойчивости к инбредному "загрязнению", т.е. когда число инбредных семян, присутствующих в популяции гибридных семян, ограничено конкретной процентной долей.

Таблица 1

Измерения отражательной способности: набор образцов 1

Множество	Тип	Число измеренных семян	Общее количество образцов
RE 07	Мужская инбредная линия	12	72
RE 11		24	
RE 15		24	
RE 18		12	
Fm 37-97	Женская инбредная линия	48	48
10-1500	Гибриды	48	108
10-1517		60	

Таблица 2

Измерения пропускания: набор образцов 2

Множество	Тип	Число измеренных семян	Общее количество образцов
RE 11	Мужская инбредная линия	12	24
RE 15		12	
Fm 37-97	Женская инбредная линия	24	24
10-1500	Гибриды	11	23
10-1517		12	

Общая процедура: прибор NIR и накопление спектров.

Прибор состоит из NIR-спектрометра типа многоцелевого анализатора FT-NIR Bruker MPA (<http://www.brukeroptics.com/ft-nir.html?&L=1>). Детали оборудования показаны в табл. 3.

Таблица 3

Технические характеристики

	Отражательная способность	Пропускание
Тип выявителя	PbS (Сульфид свинца)	InGaAs (Арсенид галлия-индия)
Диапазон волновых чисел	12500 – 3600 см ⁻¹	12500 – 5800 см ⁻¹
Диапазон длин волн	800 – 2780 нм	800 – 1720 нм
Число циклов сканирования	32	32
Разрешение спектров	4 см ⁻¹	4 см ⁻¹

В режиме отражения освещали отдельные семена светом предварительно определенного спектра и измеряли спектральные свойства отраженного света. Свет частично поглощается в различных интервалах длин волн в зависимости от различных свойств семян. Свет, возвращающийся из семян, улавливается выявителем и анализируется. Семена измеряли поочередно ручным способом. Это означает, что каждое отдельное семя располагали вручную на небольшой металлической пластине, центрированной по отверстию диаметром 2 мм в центре пластины. Пластины располагали на 2 см выше стеклянного окна прибора и свет фокусировали для освещения небольшого пятна на семени. Любой свет, отразившийся назад на фотометрический шар Ульбрихта, регистрировали и образовавшийся в результате спектр улавливали с помощью компьютера и сохраняли на жестком диске. В режиме пропускания выявитель располагали напротив источника света для измерения поглощения света отдельными семенами.

В начале каждого эксперимента прибору давали возможность нагреться до его рабочего режима в течение по меньшей мере 1 ч и затем регистрировали спектр фона при помощи поверхности, покрытой золотом. Новый спектр фона регистрировали через каждые 12 образцов. Каждое семя сканировали 32 раза, средний зарегистрированный спектр содержал 2307 (отражательная способность) или 1737 (пропускание) частных значений. Поскольку измерения являются таковыми на односемянной основе, каждый спектр предоставлял уникальный код, принадлежащий измеренным семенам. В целях определения семени затем хранили в одной из лунок 96-луночного планшета. Было обнаружено, что спектры отдельных семян одного и того же множества при применении нормированных спектров различались незначительно; эти измерения можно усреднить с получением одного спектра на множество.

Обработка данных.

Спектральные данные загружали в R (статистическая программа, <http://cran.r-project.org/>), при этом каждое из них имеет уникальный код и каждое принадлежит к одному из трех классов: мужские особи, женские особи или гибриды. Спектральные данные различных инбредных мужских семян сочетали в классификационной модели с обеспечением набора данных, соответствующего мужским семенам, харак-

терным для определенной группы. Подобным образом сочетали спектральные данные от двух гибридных образцов. PLS-DA (дискриминантный анализ методом частных наименьших квадратов) применяли для установления различий между различными классами. Шестьдесят семь процентов от общего количества образцов в каждом классе (табл. 1 и 2) произвольно выбирали для создания калибровочного набора, и оставшиеся тридцать три процента применяли для создания проверочного набора. Данный способ повторяли 10 раз с различными проверочными и подготовительными (калибровочными) наборами. Для оптимизации классификации исследовали различные области спектров и применяли различные методы предварительной обработки, такие как с использованием первой и второй производной; с и без множественной коррекции рассеяния. В конечном счете обработка с использованием первой производной и MSC позволяла создать прогностические таблицы, показанные в табл. 4 и 5.

Результаты.

Спектральные области обнаруживали в случаях, когда гибридные и мужские инбредные семена различались по нормированному сигналу. В отношении выбранного набора образцов и при условии, что образцы группировали по классам, картины распределения частично перекрывались. Однако представляется возможным разработать математическую модель для установления различий между различными классами. Результаты представлены в табл. 4 и 5 и показывают среднюю точность классификации после 10 повторов математической модели для правильного прогнозирования и установления проверочного набора против калибровочного набора для каждого класса семян.

Таблица 4

Прогностические результаты в режиме отражения: средняя процентная доля отдельных семян, правильно классифицированных в проверочном наборе

		Истинные		
		Гибриды	Женские особи	Мужские особи
Прогнозируемые при помощи NIR	Гибриды	85	14	5
	Женские особи	7	85	1
	Мужские особи	8	1	94

Таблица 5

Прогностические результаты в режиме пропуска: средняя процентная доля отдельных семян, правильно классифицированных в проверочном наборе

		Истинные		
		Гибриды	Женские особи	Мужские особи
Прогнозируемые при помощи NIR	Гибриды	74	22	11
	Женские особи	20	78	0
	Мужские особи	7	0	89

В заключение необходимо отметить, что в калибровочных моделях NIRS и NITS, разработанных в данном примере, допускается односемянная сортировка без разрушения гибридных образцов ячменя от их соответственных мужских инбредных таковых.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения инбредных семян из смешанной популяции инбредных и гибридных семян, включающий следующие стадии:

- (a) обеспечение смешанной популяции инбредных и гибридных семян;
- (b) разделение указанной популяции с помощью устройства на
 - (i) популяцию инбредных семян и
 - (ii) популяцию гибридных семян,

где указанные семена являются семенами пшеницы или ячменя, и указанное устройство отделяет указанные инбредные семена от гибридных семян на основе различия между их светоотражательной и/или поглощательной характеристиками, которое выявляют с использованием излучения ближней инфракрасной области спектра, где это различие свидетельствует о различии в генотипе инбредных и гибридных семян, и где указанное устройство включает:

- (a) средство отбора каждого семени в рамках смешанной популяции;
- (b) средство для получения спектральных данных ближней инфракрасной области спектра для каждого семени;
- (c) средство для идентификации каждого семени, инбредного или гибридного, на основе указанных спектральных данных;
- (d) средство для отделения каждого семени на основе указанных данных и
- (e) средство сбора отделенных таким образом семян,

где указанное различие в генотипе можно определить с помощью NIR-спектрометра, имеющего технические характеристики, описанные в табл. 3.

2. Применение разделяющего семени устройства, включающего средства (а)-(е), указанные в п.1, для осуществления способа по п.1.

