

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201490784 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2014.07.30

(51) Int. Cl. A01C 1/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
A01G 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2012.10.11

(54) СПОСОБЫ УЛУЧШЕНИЯ ВЫХОДА СЕМЯН МАИСА

(31) 61/547,142

(32) 2011.10.14

(33) US

(86) PCT/US2012/059747

(87) WO 2013/055916 2013.04.18

(71) Заявитель:

ПАЙОНИР ХАЙ-БРЕД
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК. (US)

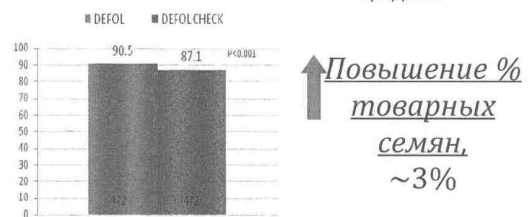
(72) Изобретатель:

Михура Эдуардо, Нельсон Скотт, Сааб
Имад, Сейерз Эдда, Шварте Аароон
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Дефолиация растений кукурузы, исходя из процентного содержания влаги в семени, имеет своим результатом преимущества, которые включают следующее: более высокое число семян на фунт; повышение объема или доли товарных семян с участка и с 1 акра женских растений; снижение доли семян, выбраковываемых в связи с несоответствием коммерчески предпочтительным размеру или форме; более низкое содержание влаги в семенах в момент сбора урожая; более ранняя дата созревания; меньшее количество топлива и времени, затраченных на высушивание семян для хранения; улучшенные характеристики, продемонстрированные в лабораторных испытаниях на всхожесть при низких температурах; повышение эффективности обработки семян; лучшая всхожесть в условиях стресса в полевых условиях; улучшенная пригодность к посадке с помощью механических систем; более однородный травостой; меньшее число низкорослых растений и повышенная урожайность зерна.



201490784 A1

201490784 A1

СПОСОБЫ УЛУЧШЕНИЯ ВЫХОДА СЕМЯН МАИСА

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Настоящее изобретение относится к области селекции и улучшения растений, а конкретно связано со способом получения, который предлагает преимущества, например, за счет ускорения сбора урожая и увеличения количества или доли полученного товарного семенного материала.

10 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Получение сортового посевного материала представляет собой способ, который включает многочисленные этапы. В случае кукурузы (маиса), например, инбредные растения должны быть сначала скрещены в поле, в условиях, которые позволяют пыльце с отцовских соцветий оплодотворить нити с рыльцами, расположенные в початках женских соцветий, для получения гибридных семян, которые будут релизывать фермеру для дальнейшей посадки. Качество этого гибридного семени определяет его цену на рынке.

Многие факторы могут повлиять на качество гибридных семян. Например, изменения в содержании влаги, размере, форме или целостности собранного урожая на начальном этапе осуществления способа могут повлиять на эффективность каждого дополнительного этапа способа получения гибридных семян. Результатом этого могут стать существенные различия в конечном продукте, что является нежелательным. Дополнительно, различия заготовленных семян на любом этапе получения могут потребовать повторной калибровки оборудования или других корректировок рабочего процесса для того, чтобы приспособиться к таким различиям. Кроме того, корректировка в отношении какого-либо операционного параметра на одном этапе может привести к нежелательным эффектам и/или дополнительным корректировкам на другом этапе. Например, для сортировочных столов может потребоваться относительно постоянная скорость потока для их нормального функционирования, и, следовательно, применение промежуточных выравнивающих бункеров может быть необходимым для уравнивания скоростей потоков.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в усовершенствованных системах и способах получения семян, которые приводят к увеличению количества или доли товарных семян, с сохранением или улучшением их

35 всхожести.

Настоящие изобретения относятся к таким методикам получения семян и, в частности, к методике, согласно которой растение обрабатывают, чтобы вызвать дефолиацию в определенный момент его развития. В некоторых вариантах осуществления время обработки зависит от содержания влаги в развивающихся семенах.

5 Когда растение лишено листвы на соответствующем этапе, урожай товарных семян является максимальным. Семя, имеющее слишком большой или слишком маленький размер, выбраковывается во время послеуборочных технологических операций. Поэтому получение большего количества семян, имеющих коммерчески предпочтительные размер и/или форму, повышает продуктивность из расчета на початок и на поле. Дефолиация на
10 растении маиса в оптимальные сроки, исходя из содержания влаги в семени, обеспечивает улучшение контроля размера и/или формы семян, что приводит к увеличению продуктивности в многочисленных аспектах.

Дополнительно, семя, полученное с применением раскрываемых здесь методик дефолиации, проявляет улучшенные характеристики в стрессовых условиях роста.
15 Семена из растений, лишенных листвы, демонстрируют повышенные доли всхожести и прорастания, особенно в условиях стресса, и более однородную закладку травостоя, а также повышенную урожайность зерна относительно семян, полученных на растениях, не лишенных листвы.

Улучшенная продуктивность растений является предпочтительной из-за широкого
20 использования маиса в качестве пищи для человека, корма для скота и в качестве сырья в промышленности. Использование маиса в пище, в дополнение к потреблению человеком ядер кукурузы, включает отрасли мукомольной промышленности, в которой используют сухой и мокрый помол. Основные продукты сухого помола маиса представляют собой зерно грубого помола, муку грубого помола и муку мелкого помола.
25 Производства, в которых используют кукурузу мокрого помола, могут производить маисовый крахмал, маисовые сиропы и декстрозу для использования в пищевых продуктах. Маисовое масло получают из зародышей кукурузы, и оно является побочным продуктом мукомольной промышленности, в которой используют сухой и мокрый помол. Маис, включая как зерно, так и незерновые части растения, также широко используется в
30 качестве корма для скота, в первую очередь для мясного скота, молочного скота, свиней, и птицы.

Промышленное использование маиса включает получение этилового спирта, маисового крахмала в мукомольной промышленности, в которой используют мокрый помол, и маисовой муки мелкого помола в мукомольной промышленности, в которой
35 используют сухой помол. Промышленные применения маисового крахмала и муки

мелкого помола основаны на функциональных свойствах этих продуктов, таких как вязкость, формирование пленки, адгезионные свойства и возможность суспендирования частиц. Кукурузный крахмал и мука мелкого помола находят применение в бумажной и текстильной промышленности. Другие промышленные сферы применения включают применение в производстве клеев, строительных материалов, связующих для литейных масс, крахмалов для прачечных, взрывчатых веществ, в резервуарах нефтяных скважин и в других горных работах.

Части растения, отличные от зерна маиса, также используются в промышленности: например, из стеблей и шелухи делают бумагу и древесные плиты, а также их можно использовать для производства целлюлозного этанола. Початки используются в подстилке для скота, в качестве топлива и для производства древесного угля.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Определенные варианты осуществления представляют способ повышения продукции семян маиса, где по меньшей мере у одного растения маиса удаляют листья, когда содержание влаги в развивающемся семени растения маиса составляет или равно приблизительно 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 или 70%, а сбор растения осуществляют, когда содержание влаги в развивающемся семени растения составляет или равно приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60%.

Определенные варианты осуществления представляют собой средства для определения оптимального времени для дефолиации инбредного растения. Факторы, участвующие в определении, включают, но без ограничений, условия окружающей среды, генетические признаки и утилизируемый продукт.

Использование дефолиации, произведенной в правильное время, обеспечивает многочисленные преимущества, которые обсуждаются в рамках настоящего документа, включая фигуры и примеры. Эти преимущества включают, но без ограничений, более высокое число семян на фунт; повышение объема или доли товарных семян с участка и с 1 акра женских растений; снижение доли семян, выбраковываемых в связи с несоответствием коммерчески предпочтительным размеру или форме; более низкое содержание влаги в семенах в момент сбора урожая; более раннюю дату созревания; меньшее количество топлива и времени, затраченных на высушивание семян для хранения; улучшенные характеристики, продемонстрированные в лабораторных

испытаниях на всхожесть при низких температурах; повышение эффективности обработки семян; улучшенное прорастание под воздействием стресса в полевых условиях; улучшенная пригодность к посадке с помощью механизированных систем; более однородный травостой и более высокую урожайность зерна.

5

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1 – на верхней гистограмме показано, что в 472 полях различных гибридов семенной кукурузы обработка с использованием дефолиации ("DEFOL" или "использование DEFOL" или "обработка DEFOL ") привела к урожаю в среднем 1821
10 семян на фунт, что составляет увеличение на 266 зерен, или на 17%, по сравнению с необработанной контрольной группой ("DEFOL Check"), в которой было собрано в среднем 1555 семян на фунт. Разница в числе зерен на фунт между группой DEFOL и необработанной группой была статистически значимой ($P < 0.001$).

На нижней гистограмме показано, что в 472 полях семенной кукурузы в
15 среднезападной части США, обработка DEFOL повышала долю товарных семян приблизительно на 3,4 процентных пункта. Из графика видно, что в необработанных образцах часть товарных семян составляла 87,1%, тогда как в семенах, собранных с участка, обработанного DEFOL, пригодные для продажи семена составляли 90,5%. Разница в доле товарных семян была статистически значимой, с $P < 0.0001$.

Фигура 2 – на верхней левой гистограмме отображено различие в проценте
20 выбраковки семян крупного размера (семя большее, чем диаметр круглого отверстия в сите 23/64") между двумя обработками с 472 семенных полей, расположенных в среднезападной части США. Процент выбраковки семян крупного размера снизился с 10,9% до 5,7% с использованием DEFOL, с общим снижением выбраковки семян крупного
25 размера на 5,2 процентных пункта. Разница в выбраковке семян крупного размера между этими двумя видами обработки была статистически значимой, с $P < 0.0001$.

На верхней правой гистограмме отображено различие в проценте выбраковки
30 семян мелкого размера (семя меньшее, чем диаметр круглого отверстия в сите 16.5/64") между этими двумя обработками для семян, собранных с 472 семенных полей, расположенных в среднезападной части США. Процент выбраковки семян мелкого размера повышался с 2,1% в необработанной контрольной группе ("DEFOL CHECK") до 3,9% ("DEFOL"), с общим повышением на 1,8 процентных пункта. Разница в проценте выбраковки семян мелкого размера была статистически значимой, с $P < 0.0001$.

На нижней левой гистограмме отображена общая выбраковка, основанная на
35 размере семян, т.е. семя слишком крупное для продажи (выбраковка семян крупного

размера) и семя слишком мелкое для продажи (выбраковка семян мелкого размера), по 472 семенным полям в среднезападной части США. Общая выбраковка, основанная на размере семян, снизилась с 13% на участке необработанной контрольной группы до 9,5% на участке, обработанном DEFOL, с общим снижением выбраковки семян на 5 3,5 процентные точки. Разница в общей выбраковке семян между этими двумя видами обработки была статистически значимой, с $P < 0.0001$.

Фигура 3 – Этот график изображает различия в числе зерен на фунт для семян с участка, обработанного DEFOL, и семян с необработанного участка по 472 семенным полям в среднезападной части США. На 95% из 472 семенных полей, число зерен на 10 фунт ("KERLB") было выше на участке, обработанном DEFOL, чем на необработанном участке.

Фигура 4 – на данном графике отображена корреляция и представлен прогноз, между числом зерен на фунт семян на необработанном участке и числом зерен на фунт 15 семян на обработанном участке. Уравнение регрессии представляет собой расчетное число зерен на фунт после обработки DEFOL, проведенной при содержании влаги в развивающихся зернах приблизительно 60%, на основании числа зерен на фунт необработанных инбредных растений. Например, если инбредное растение обычно производит семена в количестве 1500 зерен на фунт, применение DEFOL при влажности 20 зерна приблизительно 60% повысило бы число зерен на фунт до 1766 $((1,0382 \times 1500) + 208,26)$.

Фигура 5 – на данном графике отображены различия во влажности собранного зерна в семенах с обработанного участка ("DEFOL") и с необработанного ("UNT") участка с 313 семенных полей, расположенных в среднезападной части США. Столбцы ниже 25 нулевой линии оси x показывают, что семена в участках, обработанных DEFOL, имели более низкую влажность зерна, чем семена из соответствующего необработанного участка.

Фигура 6 – на данной гистограмме отображен % всхожести в полевых условиях (приживаемость культуры) для обработанных ("DEFOL") и необработанных ("CHECK") 30 семян в стрессовых и нестрессовых полевых участках. Каждый столбец изображает средний % всхожести для 16 гибридов Pioneer. Обработанные и необработанные семена от каждого гибрида были получены на тех же семенных полях в 2010 г. (см. Пример 1). Семена были высеяны в поле весной 2011 г. Участки считались стрессовыми ("Стрессовые участки"), если средняя всхожесть всех гибридных семян составляло 85% 35 или менее, или если температура почвы удерживалась на уровне 10°C или ниже в течение двух недель после посева. Участки, в которых средний % всхожести всех

гибридных семян был выше 85%, считались нестрессовыми (“Нестрессовые участки”). Следующие участки считались “стрессовыми”: О-Клэр, Висконсин; Джейнсвилл, Висконсин; Шуйлер, Небраска; Минберн, Айова; Фландро, Южная Дакота. “Нестрессовыми” участками были Джонстаун, Северная Дакота и Кото-дю-Лак, Канада.

5 Фигура 7 – на данной гистограмме отображен % всхожести в поле (приживаемость культуры) для обработанных (“DEFOL”) и необработанных (“CHECK”) семян восьми гибридов Pioneer. Обработанные и необработанные семена от каждого гибрида были получены на одних и тех же семенных полях в 2010 г. (см. Пример 1). Семена были
10 высеяны весной 2011 г. на следующих участках: О-Клэр, Висконсин; Джейнсвилл, Висконсин; Шуйлер, Небраска; Минберн, Айова; Фландро, Южная Дакота. Столбцы показывают средний % всхожести по всем участкам.

 Фигура 8 – на данной гистограмме отображена урожайность в бушелях на акр для обработанных (“DEFOL”) и необработанных (“CHECK”) семян в двух полевых участках. Каждый столбец отображает среднюю урожайность для 15 гибридов Pioneer.
15 Обработанные и необработанные семена от каждого гибрида были получены на одних и тех же семенных полях в 2010 г. (см. Пример 1). Семена были высеяны весной 2011.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

 Варианты осуществления и аспекты, обсуждаемые в данном документе,
20 описываются в сочетании с системами, инструментами и способами, которые приводятся в виде примеров, с иллюстративными целями и не ограничивают сферу применения. В различных вариантах осуществления одна или несколько из указанных выше проблем были уменьшены или устранены, в то время как другие варианты осуществления направлены на другие усовершенствования.

25 Раскрытие каждой ссылки, указанной в данном документе, включено в полном объеме посредством ее упоминания, в той степени, в какой данной ссылке относятся к материалам и способам, описываемым в данном документе.

 Полевые культуры выращивают с использованием методик, которые используют способ опыления растения. В практическом применении выбранной программы селекции
30 селекционер часто вначале осуществляет селекцию и скрещивание двух или более родительских линий с последующим повторным самоопылением и селекцией, получая, таким образом множество уникальных генетических комбинаций. Селекционер теоретически может получать миллиарды различных генетических комбинаций путем скрещивания, самоопыления и мутагенеза. Поэтому весьма маловероятно, чтобы два
35 селекционера самостоятельно получили одинаковый ряд растений, имеющих одинаковые

признаки.

В каждом цикле оценки, селекционер растений выбирает идиоплазму для ее передачи следующему поколению. Эта идиоплазма выращивается при выбранных географических, климатических и почвенных условиях и при необходимости подвергается
5 испытанию на устойчивость к стрессовым воздействиям, устойчивость к насекомым и испытаниям в отношении других признаков. Затем проводится дополнительная селекция во время и после периода вегетации.

Методики получения используют для управления размножением гибрида маиса, семена которого будут продавать на рынке. Инбредный мужской родитель и инбредный
10 женский родитель, как правило, высаживают в поле таким образом, чтобы на один мужской ряд приходился один или несколько женских рядов. У растений из женского ряда удаляют метелки до того, как они начнут производить пыльцу, тем самым приводя к оплодотворению початков женского ряда пыльцой от растений мужского ряда. С другой стороны, женские растения могут обладать стерильностью мужских соцветий и не
15 производить пыльцу. В любом случае, результат заключается в том, что пыльца от мужского растения оплодотворяет початок на женском растении, тем самым приводя к получению гибридных семян. Эти семена затем собирают.

Методики сбора урожая могут оказать существенное влияние на качество семян. Например, сбор урожая должен быть произведен в надлежащее время, когда семя имеет
20 соответствующий размер и стадию развития. Некоторые методики, такие как те, которые раскрываются в данном документе, можно использовать для улучшения качества семян в момент или близко к моменту сбора урожая и/или во время хранения и обработки урожая после его сбора. Данные показатели качества могут включать один или несколько из следующих: более высокое число семян на фунт; повышение объема или доли товарных
25 семян с участка и с 1 акра женских растений; снижение доли семян, выбраковываемых в связи с несоответствием коммерчески предпочтительным размеру и форме; более низкое содержание влаги в семенах в момент сбора урожая; более ранняя дата созревания; меньший объем топлива и времени, затраченных на высушивание семян для хранения, что также снижает инвестиции в производительность сушилки; улучшение целостности семян
30 во время обработки, производимой после сбора урожая из-за снижения воздействия на зародыш в семенах плоской формы; улучшенные характеристики, продемонстрированные в лабораторных испытаниях на всхожесть при низких температурах или в других стрессовых условиях; более однородное воздействие химической обработки на семена, что тем самым улучшает эффективность обработки; снижение веса стандартного
35 промышленного мешка семян, рассчитанного на 80000 зерен, что обеспечивает

эргономичные преимущества для популяции фермеров пожилого возраста; улучшенная пригодность к посадке с помощью механизированных систем; лучшая всхожесть в условиях стресса в полевых условиях; более однородная приживаемость травостоя и более высокую урожайность зерна.

5 В одном варианте осуществления настоящее раскрытие представляет собой оптимизированную обработку женского инбредного растения, несущего початок, содержащий гибридные семена, которая позволяет получить большее количество или большую долю товарных семян. Товарные семена включают такие, которые помимо прочих признаков, являются жизнеспособными и имеют коммерчески предпочтительные
10 размер и форму.

Обработка с целью дефолиации включает ускорение побурения листьев и остановку или значительное сокращение образования продуктов фотосинтеза и/или перемещение продуктов фотосинтеза от листьев к початку. Это может быть достигнуто с использованием, например, распыления на поле, на котором произрастают растения,
15 каким-либо из ряда растворов солевых или гербицидных дефолиантов, включая, но без ограничений, IGNITE®, дикват, паракват, глифосат и хлорат натрия. Альтернативно или дополнительно, дефолиация может осуществляться с использованием механических средств, вручную или с применением любой комбинации ручных, механических и/или химических средств. В определенных вариантах осуществления можно использовать
20 несколько видов дефолиационной обработки. Заявляемый способ не зависит от способа, с использованием которого с растения удаляют листья. Способы применимы к растениям с мужской стерильностью, а также с мужской фертильностью. Контрольное растение или контрольное поле или контрольная обработка будут соответствовать испытываемому растению или полю, за исключением отсутствия дефолиационной обработки.

25 Предыдущие способы дефолиации были разработаны для того, чтобы улучшить энергию прорастания семян без снижения размера семян. См. например, в патенте США № 6162974, в колонке 4: "Размер семян в урожае семян маиса является важным коммерческим вопросом, потому что больший размер семян является предпочтительным на рынке." Напротив, нынешние способы дефолиации предназначены для воздействия на
30 размер семян и форму, и намеренно приводят к получению меньших по размеру, более плоских, более однородных семян.

Также ранее применявшиеся способы дефолиации основывались на днях степени роста (GDD) или единицах степени роста (GDU) для определения соответствующего момента времени для дефолиации. Влияние GDD на созревание растений различается у
35 разных инбредных растений (как показано в таблице 1 патента США № 6162974). В

дополнение, значение GDD должно пересчитываться каждый день каждого года и взаимодействие между GDD и созреванием растения осложняется такими факторами, которые включают, но без ограничений, тип почвы и количество атмосферных осадков. Таким образом, способ дефолиации, основанный на значении GDD, зависит от изменчивости окружающей среды.

Напротив, уровень содержания влаги в семени является стабильной характеристикой, постоянной для всех инбредных растений во всех участках и во все года, даже при различных погодных условиях, и поэтому является более надежным для прогнозирования оптимального времени для дефолиации. Определение оптимального уровня содержания влаги в семени, при котором следует проводить дефолиацию, осуществляют путем тщательного тестирования и калибровки эффектов дефолиации, с учетом генетических параметров, типа обработки, сроков обработки и условий окружающей среды.

Применение дефолиации, проведенной в надлежащий момент времени, выбранный с учетом содержания влаги, обеспечивает многочисленные преимущества, которые включают, но без ограничений, более высокое число семян на фунт; повышение объема или доли товарных семян с участка и с 1 акра женских растений; снижение доли семян, выбраковываемых в связи с несоответствием коммерчески предпочтительным размеру или форме; более низкое содержание влаги в семенах в момент сбора урожая; более раннюю дату созревания; меньший объем топлива и времени, затраченных на высушивание семян для хранения; улучшенные характеристики, продемонстрированные в лабораторных испытаниях на всхожесть при низких температурах; повышение эффективности обработки семян; лучшая всхожесть в условиях стресса в полевых условиях; улучшенную пригодность к посадке с помощью механизированных систем; более однородный травостой; меньшее число низкорослых растений и более высокую урожайность зерна.

Важнейшими факторами в таком определении (выборе инбредного растения) являются исходный размер семян (число зерен на фунт) и способность к всхожести в условиях стресса для женских растений (всхожесть). Размер семян является более решающим фактором, поскольку дефолиация может привести к получению слишком мелких семян, с недопустимыми уровнями выбраковки.

Другой фактор включает выбор инбредных растений, которые с большой вероятностью будут реагировать на дефолиацию с получением гибридов с более высокой всхожестью и приживаемостью растений, особенно в стрессовых условиях. Выбор этих инбредных растений включает характеристику признака всхожести в условиях стресса для гибридов с этими инбредными растениями, используемыми в качестве женских

растений. Это достигается путем оценки материала в сочетании с лабораторными испытаниями на всхожесть и испытаниями с ранним высаживанием в поле. Комбинированные данные используются для того, чтобы присвоить индекс всхожести в условиях стресса, который характеризует способность материала к образованию всходов в условиях стресса. Инбредные растения, которые, по прогнозам, производят гибриды с индексами всхожести в условиях стресса ниже среднего, считаются подходящими для дефолиации.

Используемые в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа, включают ссылку на множественное число, если только контекст явно не указывает иное. Так, например, упоминание "растения" включает множество таких растений, упоминание "клетки" включает одну или несколько клеток, упоминание "семена" включает множество таких семян и их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

"Определение" означает измерение, оценку, расчет, мониторинг и/или прогнозирование.

"Дефолиант" означает любое соединение, которое замедляет или останавливает образование продуктов фотосинтеза и/или перемещение продуктов фотосинтеза от листьев к початку, и включает, но без ограничений, гербицидные и солевые композиции, которые могут привести к гибели растения. Эти композиции могут также включать поверхностно-активные вещества.

"Дефолиация" обозначает удаление, уничтожение или усыхание значительной части ткани листьев растения, как правило, по меньшей мере на 50%, и до 100% включительно. Дефолиацию можно проводить с использованием химических или физических средств (механических средств и/или вручную), или любой комбинации таких средств. Сочетание физических и химических средств для дефолиации может быть особенно полезным в таких условиях как засуха, которые в противном случае приводят к ухудшению опыления и формированию небольшого количества крупных зерен.

Выражение "всходить" или "всхожесть" означает появление всходов над средой для проращивания, например над поверхностью почвы в поле.

Выражение "доля всхожести" означает процент посеянных семян, которые всходят. Например, доля всхожести 80% указывает на то, что 80 из 100 посеянных семян всходят.

"Ген" означает фрагмент нуклеиновой кислоты, который экспрессирует определенный белок, содержащий регуляторные последовательности, предшествующие (некодирующие последовательности в направлении 5') и следующие за (некодирующие последовательности в направлении 3') кодирующей последовательностью. "Нативный

ген” означает ген, который встречается в природе со своими собственными регуляторными последовательностями. “Химерный ген” означает любой ген, который не является нативным геном, и который содержит регуляторные и кодирующие последовательности, которые не встречаются вместе в природе. Соответственно, химерный ген может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые получены из различных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, которые получены из одного источника, но расположены таким образом, который отличается от расположения в природе. “Чужеродный” ген означает ген, который обычно не встречается в организме хозяина, но который вводится в организм хозяина путем переноса генов. Чужие гены могут включать нативные гены, встроенные в ненативный организм, или химерные гены. “Трансген” представляет собой ген, который был введен в геном с помощью процедуры трансформации.

Выражение “проращение” относится к начальным стадиям роста семени с формированием всхода. Семя считается проросшим, если в нем обнаруживают первичный корешок (корень) или появляется побег или если появляющиеся структуры всхода соответствуют специальным критериям, таким как критерии, установленные Международными правилами тестирования семян (International Seed Testing Association, ISTA) или Association of Official Seed Analysts, Inc., AOSA).

Выражение “проросший” может относиться к семени, из которого был получен жизнеспособный всход растения под воздействием света или без света с применением камеры для проращивания семян, шкафа для выращивания, теплицы или в поле.

Выражение “доля прорастания” или “процент прорастания” означает процент посеянных семян, которые прорастают. Например, доля всхожести 80% указывает на то, что 80 из 100 посеянных семян прорастают.

“Гибридное растение” или “гибридное потомство” – это индивидуум, полученный от генетически различных родители (т.е. генетически гетерозиготный или в основном гетерозиготный индивидуум). Как правило, родители гибрида отличаются по нескольким важным аспектам. Гибриды часто более сильные, чем любой из родителей, но они не способны размножаться как чистая линия.

Выражение гибридное разнообразие относится к, по сути, гетерозиготной гибридной линии и ее мелким генетическим модификациям, которые сохраняют общие генетические черты гибридной линии, включая, но без ограничений конверсию локуса, мутации или соматональные варианты.

В рамках данного документа "улучшенное прорастание в стрессовых условиях" является мерой способности семени к прорастанию в условиях стресса, включая, но без ограничений, такие условия как холод, насыщенные почвы, засуха, наводнения и жара, по сравнению с семенем с совпадающими генетическими характеристиками, прорастающим в тех же стрессовых условиях.

Выражение "растение" может включать целое растение, любую его часть, или клетку или культуру ткани, полученную из растения. Таким образом, выражение "растение" может относиться к любому из следующих: целые растения, компоненты или органы растения (например, листья, стебли, корни и т.д.), ткани растения, семена, клетки растения и/или потомство этого растения. Растительная клетка представляет собой клетку растения, взятую из растения или полученную в результате культивирования из клетки, взятой от растения. Растительные клетки включают, без ограничений, клетки из семян, суспензионных культур, зародышей, меристематических участков, каллусной ткани, листьев, корней, побегов, гаметофитов, спорофитов, пыльцы и микроспор.

Выражение "потомство" означает потомков конкретного растения (самоопыление) или пары растений (перекрестное опыление). Потомки могут быть, например, поколения F_1 , F_2 или любого последующего поколения.

Выражение "низкорослое (низкорослые)" означает растение или всход, которое визуально меньше, чем соседние растения в поле. Растение считается низкорослым, если оно отстает на одну или две стадии листования от средней стадии окружающих растений, или если его высота на треть или более меньше по сравнению с окружающими растениями. Выражения "низкорослое (низкорослые)" и "единообразие" часто используются для описания сходных фенотипов, при которых меньшее число низкорослых растений ассоциируется с повышенной однородностью всхожести семян или приживаемостью травостоя и наоборот.

Используемое в данном документе выражение "семя" означает часть гибридного или инбредного растения, содержащую зародыш.

Используемый в данном документе выражение "приживаемость травостоя", является способностью группы семян всходить и образовывать нормальные всходы, обычно в полевых условиях. Приживаемость травостоя может также относиться к густоте стояния растений или приживаемости культуры.

"Стресс", "стрессовые условия" и связанные с ними выражения относятся к любым факторам, которые угнетают рост и размножение растения ниже генотипического потенциала, включая, но без ограничений, холодную почву, наводнения (затопление), холодный дождь, мороз, снег, уплотнение грунта и чрезмерный уровень остатков от

предыдущих культур. Устойчивость к стрессовым воздействиям означает способность растения или видов культур выдерживать стресс.

“Влажность семян” можно определить различными способами, но часто используют Ohaus© Moisture Balance, с соблюдением инструкции производителя.

5 Влажность семян – важный показатель, так как он указывает на созревание семени и влияет на восприимчивость к некоторым заболеваниям. Другие способы определения содержания влаги в семени включают, но без ограничений, сушку в инкубаторе, сушильные шкафы, принудительную воздушную сушку, сушку в печи, микроволновую сушку, сушку на солнце и сушку над насыщенными солевыми растворами (см. Abendroth, 10 *et al.*, (2011) PMR 1009, Corn Growth and Development, Iowa State University and Winston and Bates, (1960) *Ecology* 41:232-237.) Различные осушители можно использовать в сочетании со способами сушки семян. Семена можно сушить в широком диапазоне температур, включая сушку при комнатной температуре и температуре окружающей среды наружного воздуха, с циркуляцией воздуха или без нее.

15 Настоящее изобретение дополнительно относится к трансгенным растительным клеткам и трансгенным растениям, трансформированным для содержания и экспрессии полинуклеотида. Выражения “трансформированный”, “трансфицированный” или “трансгенный” относятся к клетке, ткани, органу или организму, в который была введена чужеродная нуклеиновая кислота, такая как рекомбинантный вектор. Предпочтительно, 20 введенная нуклеиновая кислота интегрируется в геномную ДНК клетки, ткани, органа или организма реципиента таким образом, что введенная нуклеиновая кислота наследуется последующим потомством. “Трансгенная” или “трансформированная” клетка или организм также включает потомство клетки или организма и потомство, полученное в программе селекции, в которой такое “ трансгенное” растение используется как родитель 25 в кроссе, и которое демонстрирует измененный фенотип в результате присутствия рекомбинантной конструкции или вектора. В настоящее время известны и доступны различные способы трансформации растений. Например, введение последовательностей ДНК в растения и/или клетки растений можно выполнить с использованием *Agrobacterium* -опосредованной трансформации, опосредованной вирусным вектором трансформации, 30 электропорации и трансформации, опосредованной бомбардировкой микрочастицами (генная пушка или способы биолистики). Последовательность ДНК также может быть трансформирована непосредственно в геном пластиды путем трансформации пластид. Используемое в данном документе выражение “пластида” означает класс клеточных органелл растений, который включает амилопласты, хлоропласты, хромопласты, 35 элайопласты, зопласты, этиопласты, лейкопласты и пропластиды. Данные органеллы

способны к самовоспроизведению и содержат то, что обычно называют "геном хлоропласта" - кольцевую молекулу ДНК, размер которой колеблется от приблизительно 120 до приблизительно 217 тысяч нуклеотидов, в зависимости от вида растения, и которая, как правило, содержит участок с обращенным повтором.

5 Признаки, являющиеся результатом трансгенеза, могут включать устойчивость к гербицидам, засухе, урожайность, содержание масла в семени и содержание крахмала в семени, распределение углерода в семени, устойчивость к инсектицидам или любой один или несколько из множества других признаков.

10 Обработка и покрытие семян можно использовать на семенах, полученных с применением раскрываемых способов. Использование покрытия семян и обработки известно в данной области техники; см. например, патент США № 5876739. Сочетание обработки дефолиантом и обработки/покрытия семян может обеспечить требуемые дополнительные эффекты. Хотя считается, что обработка семян может быть применена в отношении к семени в любом физиологическом состоянии, предпочтительно, чтобы семя 15 было в достаточно твердом состоянии, чтобы избежать причинения ущерба в процессе обработки. Обычно, семенем будет являться семя, которое было собрано с поля, выделено из растения и отделено от любых других, не относящихся к семени материалов растения. Семя также предпочтительно должно быть биологически стабильным до такой степени, чтобы обработка не приводила к биологическому повреждению семени. Лучшее 20 покрытие составом для обработки семян происходит при обработке семян меньшего размера, более плоских, полученных с применением способов, раскрываемых в данном документе; в свою очередь, лучшее покрытие может обеспечить повышение эффективности. В одном варианте осуществления, например, обработка может быть применена в отношении семян кукурузы, которые были собраны, очищены и высушены до 25 содержания влаги ниже, приблизительно 15% по весу. В альтернативном варианте осуществления семенем может быть семя, которое было высушено, а затем обработано водой и/или другим материалом и затем вновь высушено перед или во время обработки. В рамках только что описанных ограничений считается, что обработка может быть применена к семенам в любое время между сбором урожая и посевом семян.

30 Используемое в данном документе выражение "невысеянное семя" включает семена в любой период между сбором урожая семян и посевом семян в почву с целью получения всходов и роста растения.

35 Выражение "урожайность" означает продуктивность на единицу площади для определенного растительного продукта, имеющего коммерческую ценность. Например, урожайность маиса обычно измеряется в бушелях семян на акр или метрических тоннах

семян на гектар за сезон. Урожайность зависит как от генетических факторов, так и от факторов окружающей среды. "Агрономия", "агрономические признаки" и "агрономические характеристики" относятся к признакам (и лежащим в их основе генетическим элементам) разнообразия данного растения, которые способствуют урожайности в течение вегетационного периода. Индивидуальные агрономические признаки включают энергию прорастания, силу вегетации, устойчивость к стрессовым воздействиям, резистентность или устойчивость к заболеваниям, устойчивость к гербицидам, ветвление, цветение, набор семян, размер семян, плотность семян, устойчивость к полеганию, обмолачиваемость и т.п. Поэтому урожайность является окончательным пунктом всех агрономических признаков.

Продукты, важные агрономическом и коммерческом отношениях, и/или композиции химических веществ, включая, но без ограничений, корма для животных, промышленные товары и продукты из семян, а также побочные продукты, которые предназначены для применения в качестве пищи для потребления человеком или для применения в составе композиций, которые предназначены для потребления человеком, включая, но без ограничений, муку мелкого помола, муку грубого помола, патоку, масло, крахмал, пищевые продукты, содержащие семена или части семян и побочные продукты семян, и тому подобное, рассматриваются в том случае, если эти продукты и композиции химических веществ являются производными или получены непосредственно из семян, полученных с применением способов настоящего изобретения. Такие продукты и/или композиции также называются в данном документе биологическими образцами. Биологические образцы могут быть получены из растения, ткани растения, или семени, произведенного растением.

Все публикации и патентные заявки, упоминаемые в данном описании, свидетельствуют об уровне специалистов в той области техники, к которой относится это изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки.

Хотя вышеуказанное изобретение было описано в некоторых подробностях в качестве иллюстрации и примера для ясности понимания, будет очевидным, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в рамках прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Подразумевается, что примеры, описываемые в данном документе, являются образцовыми и приводятся в качестве примеров открытий, и не ограничивают объем формулы изобретения.

5 Пример 1. Реализация обработки дефолиантом

В 2010 году, на 472 семенных полях, расположенных в среднезападной части Соединенных Штатов Америки, целые поля обрабатывали Defol® 750 (хлорат натрия от Drexel Chemical Company) в соответствии с наставлениями производителя, и в каждом поле была оставлена полоса необработанной контрольной площади (т.е. 10 необработанную испытываемую полосу не опрыскивали дефолиантом). Контрольная полоса имела ширину, равную штанге опрыскивателя, и длину, равную длине поля внутри образцовому участку засеянного поля. Defol® 750 применяли при влажности семян 55-60%, которую определяли с помощью Ohaus® MB35 moisture balance. После обработки, 15 семена оставляли для высыхания естественным путем в поле, приблизительно в момент или приближаясь к моменту физиологической зрелости (~32% влажность семян). За один-два дня до механизированной уборки урожая в поле все пригодные для уборки урожая початки с 12 растущих подряд растений из 3 различных участков каждой группы обработки (DEFOL, необработанная контрольная группа) очищали от листовой обертки и помещали в мешки из джутовой ткани. Бирку с указанием расположения, номера поля и 20 обработки помещали снаружи и внутрь мешка. Пригодный для сбора урожая початок описывали как початок, длиной 4 дюйма или более, содержащий более 30 зерен. Початки, имевшие более 25% повреждений из-за болезни или воздействия насекомых, не включали. Мешки из джутовой ткани доставляли на местное производственное предприятие и сушили в нижних туннелях больших промышленных сушилок от 3 до 4 25 дней (или до достижения влажности семени приблизительно 12%). Влажность семян во время уборки урожая определяли из образцов, собранных из каждого участка обработки с использованием тестера DICKEY-john® GAC® moisture tester.

Небольшую луцильную машину (луцильная машина АЕС для малых партий) использовали для отделения семян от початка. После отлущивания семена пропускали 30 через сортировочную установку, снабженную ситом в 23/64 дюйма с круглыми отверстиями (RH) и в 16,5/64 дюйма с круглыми отверстиями. Семена, которые оставались сверху сита 23/64" RH, считались слишком крупными для продажи (выбраковка семян крупного размера). Семена, которые проходили через сито 16,5/64 RH считали слишком мелкими для продажи и выбраковывали (выбраковка семян мелкого 35 размера). Семена, которые проходили сквозь сито 23/64", но оставались на поверхности

сита 16,5/64" RH считали товарными семенами в отношении размера и формы. Из товарных семян, число зерен в 0,25 фунтах товарных семян подсчитывали с использованием счетчика семян с чашей для определения числа зерен на фунт. Статистический анализ проводили с применением процедур t-теста в Statistical Analysis System (SAS Inst., Кэри, Северная Каролина). Однородные семена, и особенно более плоские, мелкие, однородные семена, являются предпочтительными для облегчения и повышения эффективности обработки, упаковки, доставки, манипуляций и посева. В дополнение, семена, которые являются менее круглыми, ассоциируются с более низкой частотой синдрома "большого зародыша". Большие зародыши повышают восприимчивость к физическим повреждениям во время кондиционирования и обработки семян.

Кроме того, обработка дефолиантом ускоряет созревание и высушивание, так что сбор урожая может обычно происходить на 4-5 дней раньше, чем в необработанной контрольной группе в типичных условиях уборки урожая и до 14 дней раньше при холодных погодных условиях. Это является преимуществом при предотвращении полевых потерь из-за неблагоприятных погодных условий. Это также снижает расход топлива и общую производительность сушилки, необходимые для сушки после сбора урожая.

Пример 2. Обработка дефолиантом приводит к получению семян с улучшенной приживаемостью травостоя и повышенным конечным выходом зерна

Гибридные семена, полученные с полей, обработанных Defol® 750 и с необработанных контрольных полос, высеяли на семи полевых участках весной 2011 года. Семена с растений с удаленными листьями и контрольных гибридов получали на одних и тех же семенных полях в 2010 году. Семена высевали в период между 12 апреля и 18 мая в городах О-Клэр, Висконсин, Джейнсвилл, Висконсин, Шуйлер, Небраска, Минберн, Айова, Фландро, Южная Дакота, Джонстаун, Северная Дакота и Кото-дю-Лак, Канада. Всхожесть культуры оценивали на стадиях от V3 до V4 на всех участках, и всхожесть отмечали как процент высеянных семян, которые проросли и дали нормальные всходы. Например, если было высеяно 30 семян и 21 семя возшло, всхожесть отмечали как 70%.

Расположение участка считали ассоциированным со стрессовыми условиями, если средняя всхожесть всех гибридов составляла 85% или менее, или если температура почвы удерживалась на уровне 10°C или ниже в течение двух недель после посева. Участки, где средний % всхожести всех гибридов был выше 85%, считали нестрессовыми.

Следующие участки считали стрессовыми: О-Клэр, Висконсин; Джейнсвилл, Висконсин; Шуйлер, Небраска; Минберн, Айова; Фландро, Южная Дакота. В совокупности, эти участки имели средний процент всхожести 74%. Не-стрессовые участки включали Джонстаун, Северная Дакота и Кото-дю-Лак, Канада, где совокупная средняя всхожесть составляла 91%. В среднем, семена с гибридов с удаленными листьями имели на 10% более высокий процент всхожести на стрессовых участках и на 4% более высокий процент всхожести на нестрессовых участках, по сравнению с контрольными растениями с неудаленными листьями (Фиг. 6). На фигуре 7 показана разница в % прорастания для восьми отдельных гибридов с удаленными листьями и контрольных гибридов в тесте.

Данные по урожайности собирали в г. Шуйлер, Небраска и г. Минберн, Айова. Пятнадцать гибридов, полученных в результате дефолиации и контрольной обработки, собирали вручную при уровне влажности приблизительно 18%, и полученные данные по двум участкам объединяли; в среднем, семена с гибридов с удаленными листьями давали приблизительно 14 дополнительных бушелей на акр на участке в г. Шуйлер и приблизительно 23 дополнительных бушелей на акр на участке в г. Минберн.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Способ повышения выхода товарных семян маиса с поля для получения гибридных семян, включающий обработку указанного поля средством для дефолиации.
- 5 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дефолиацию осуществляют с применением химических средств.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что осуществляют несколько обработок для дефолиации.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что повышается доля плоских семян.
- 10 5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что повышается число зерен на фунт.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что собранные семена проявляют относительно контроля один или несколько следующих признаков: более раннее созревание; более низкая влажность на момент сбора урожая; более низкие требования к высушиванию после сбора урожая; большая однородность размеров;
- 15 повышенный процент прорастания или доля всхожести в условиях испытания с лабораторным стрессом; улучшенная пригодность к механизированной посадке; повышенный процент всхожести или доля всхожести в полевых условиях; более однородная всхожесть в полевых условиях; меньшее число низкорослых или недоразвитых всходов и повышенная урожайность зерна.
- 20 7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что семена собирают при содержании влаги от приблизительно 20% до 45%.
8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что % содержание влаги в семенах составляет от приблизительно 50% до 70%.
9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в отношении растения был осуществлен
- 25 трансгенез, наделяющий признаком, выбранным из группы, состоящей из мужской стерильности, сайт-специфической рекомбинации, абиотической устойчивости к стрессу, измененного фосфора, измененных антиоксидантов, измененных жирных кислот, измененных незаменимых аминокислот, измененных углеводов, устойчивости к гербицидам, устойчивости к насекомым и устойчивости к
- 30 заболеваниям.
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что семя выбрано из группы, состоящей из следующего: маис (*Zea mays*), соя (*Glycine max*), хлопчатник (*Gossypium hirsutum*), арахис (*Arachis hypogaea*), ячмень (*Hordeum vulgare*); овес (*Avena sativa*); ежа сборная (*Dactylis glomerata*); рис (*Oryza sativa*, в том числе разновидности *indica* и
- 35 *japonica*); сорго (*Sorgho bicolor*); сахарный тростник (*Saccharum* sp); овсяница

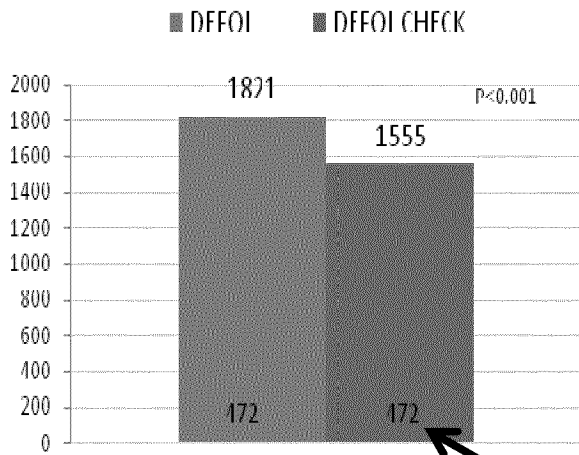
луговая (*Festuca arundinacea*); виды газонных трав (например, виды *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum secundatum*); пшеница (*Triticum aestivum*) и люцерна (*Medicago sativa*), представители рода *Brassica*, брокколи, капуста, морковь, цветная капуста, китайская капуста, огурец, зрелая фасоль, баклажан, укроп, фасоль обыкновенная, тыква бутылочная, лук-порей, салат, дыня, бамя, лук, горох, перец, тыква обыкновенная, редис, шпинат, кабачок, кукуруза сахарная, томат, арбуз, декоративные растения и другие фрукты, овощи, клубневые и корневые культуры.

- 5 11. Способ получения семени, которое имеет повышенный процент прорастания, 10 долю всхожести и повышенную однородность всхожести в полевых условиях, включая, но без ограничений, стрессовые условия, включающий обработку данного поля средством для дефолиации.
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что дефолиацию осуществляют с применением химических средств.
- 15 13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что осуществляют несколько обработок для дефолиации.
14. Способ по п. 11, отличающийся тем, что повышается доля плоских семян.
15. Способ по п. 11, отличающийся тем, что повышается число зерен на фунт.
16. Способ по п. 11, отличающийся тем, что собранные семена проявляют 20 относительно контроля один или несколько следующих признаков: более раннее созревание; более низкое содержание влаги на момент сбора урожая; более низкие требования к высушиванию после сбора урожая; большая однородность размеров; повышенный процент прорастания или доля всхожести в условиях испытания с лабораторным стрессом; улучшенная пригодность к механизированной посадке; повышенный процент всхожести или доля всхожести в 25 полевых условиях; более однородная всхожесть в полевых условиях; меньшее число низкорослых или недоразвитых всходов; и повышенная урожайность зерна.
17. Способ по п. 11, отличающийся тем, что семена собирают при содержании влаги от приблизительно 20% до 45%.
- 30 18. Способ по п. 11, отличающийся тем, что % содержания влаги в семени составляет от приблизительно 50% до 70%.
19. Способ по п. 11, отличающийся тем, что в отношении растения осуществляли 35 трансгенез, наделяющий признаком, выбранным из группы, которая состоит из мужской стерильности, сайт-специфической рекомбинации, абиотической устойчивости к стрессовым воздействиям, измененного фосфора, измененных

антиоксидантов, измененных жирных кислот, измененных незаменимых аминокислот, измененных углеводов, устойчивости к гербицидам, устойчивости к насекомым и устойчивости к заболеваниям.

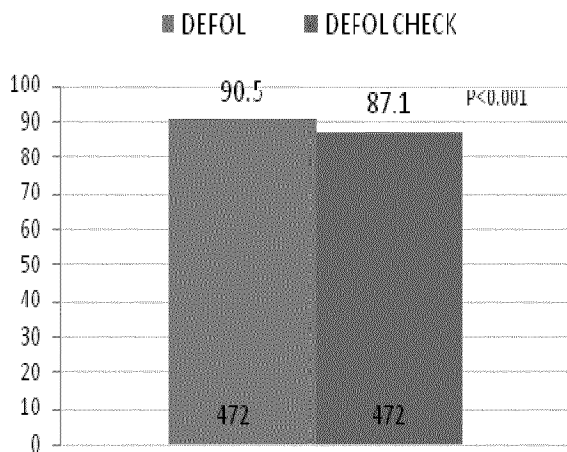
20. Способ по п. 11, отличающийся тем, что семя выбрано из группы, состоящей из
5 следующего: маис (*Zea mays*), соя (*Glycine max*), хлопчатник (*Gossypium hirsutum*), арахис (*Arachis hypogaea*), ячмень (*Hordeum vulgare*); овес (*Avena sativa*); ежа сборная (*Dactylis glomerata*); рис (*Oryza sativa*, в том числе разновидности *indica* и *japonica*); сорго (*Sorgho bicolor*); сахарный тростник (*Saccharum* sp); овсяница луговая (*Festuca arundinacea*); виды газонных трав (например, виды: *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, *Stenotaphrum secundatum*); пшеница (*Triticum aestivum*) и
10 люцерна (*Medicago sativa*), представители рода *Brassica*, брокколи, капуста, морковь, цветная капуста, китайская капуста, огурец, зрелая фасоль, баклажан, укроп, фасоль обыкновенная, тыква бутылочная, лук-порей, салат, дыня, бамя, лук, горох, перец, тыква обыкновенная, редис, шпинат, кабачок, кукуруза сахарная,
15 томат, арбуз, декоративные растения и другие фрукты, овощи, клубневые и корневые культуры.
21. Способ снижения количества выбракованных семян с маисового семенного поля, включающий обработку данного поля средством для дефолиации.
22. Способ по п. 19, отличающийся тем, что снижается выбраковка крупных семян
20 и/или мелких семян.

По доверенности



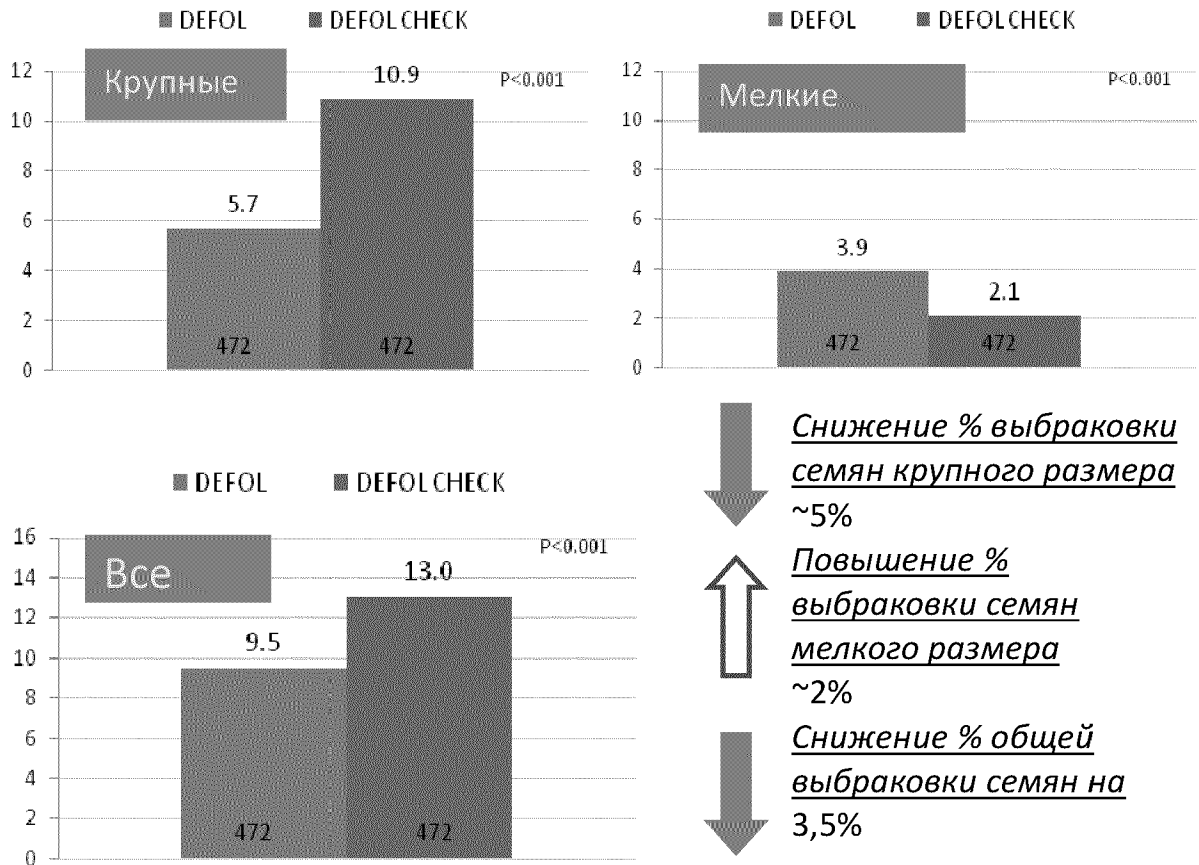
Значимость: среднее значение t-критерия

Число точек данных для генерации среднего

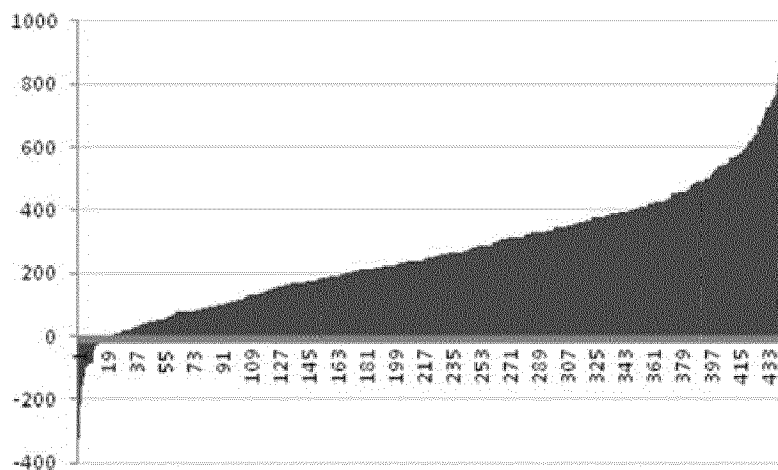


↑ Повышение % товарных семян, ~3%

ФИГУРА 1

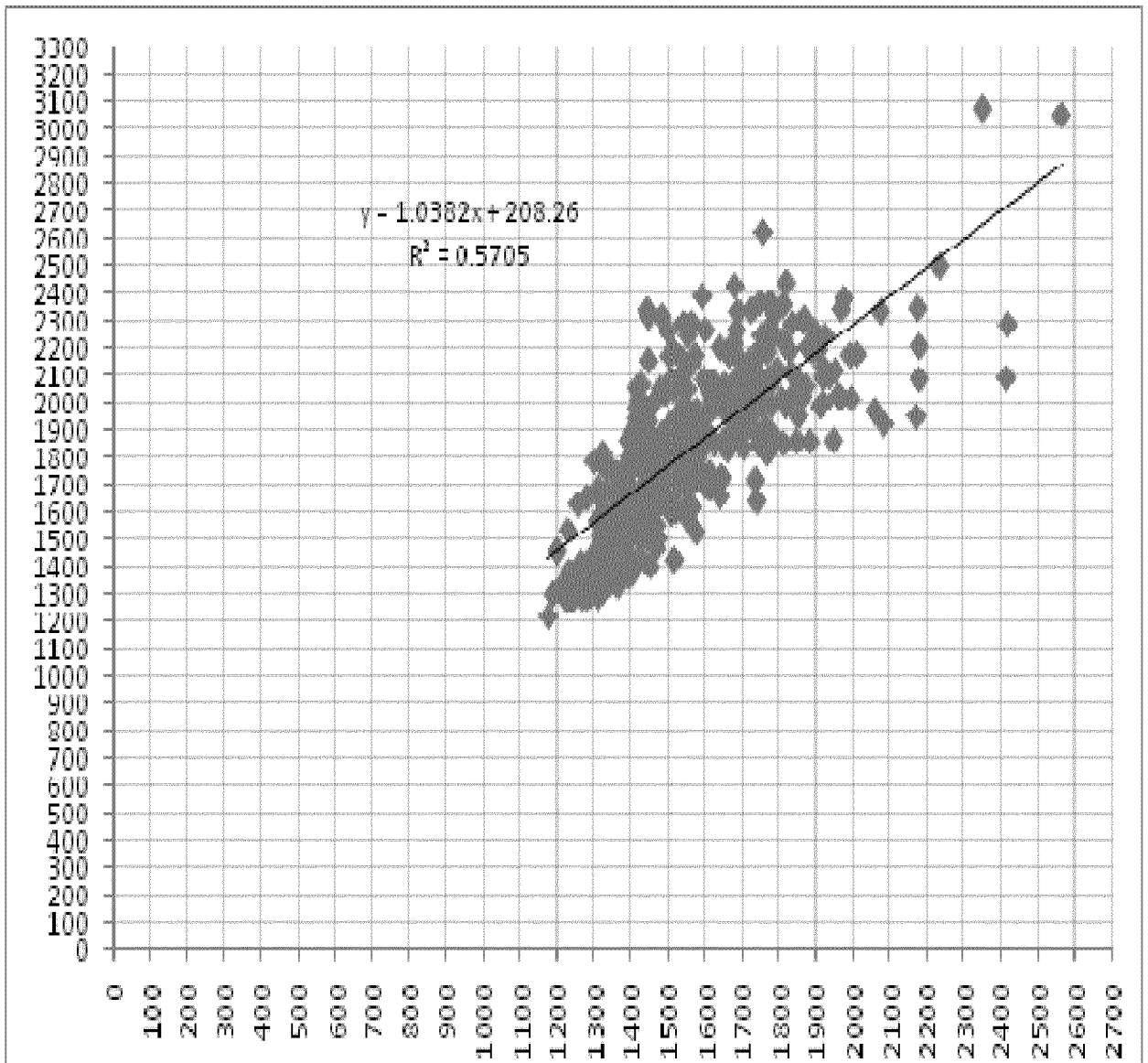


ФИГУРА 2

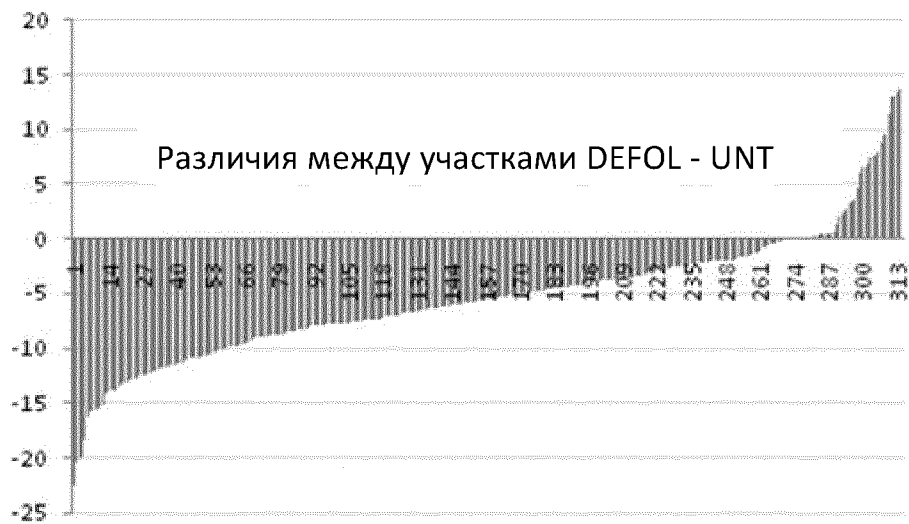


Обработка DEFOL
повышала число зерен на
фунт (KERLB) на 95%
полей

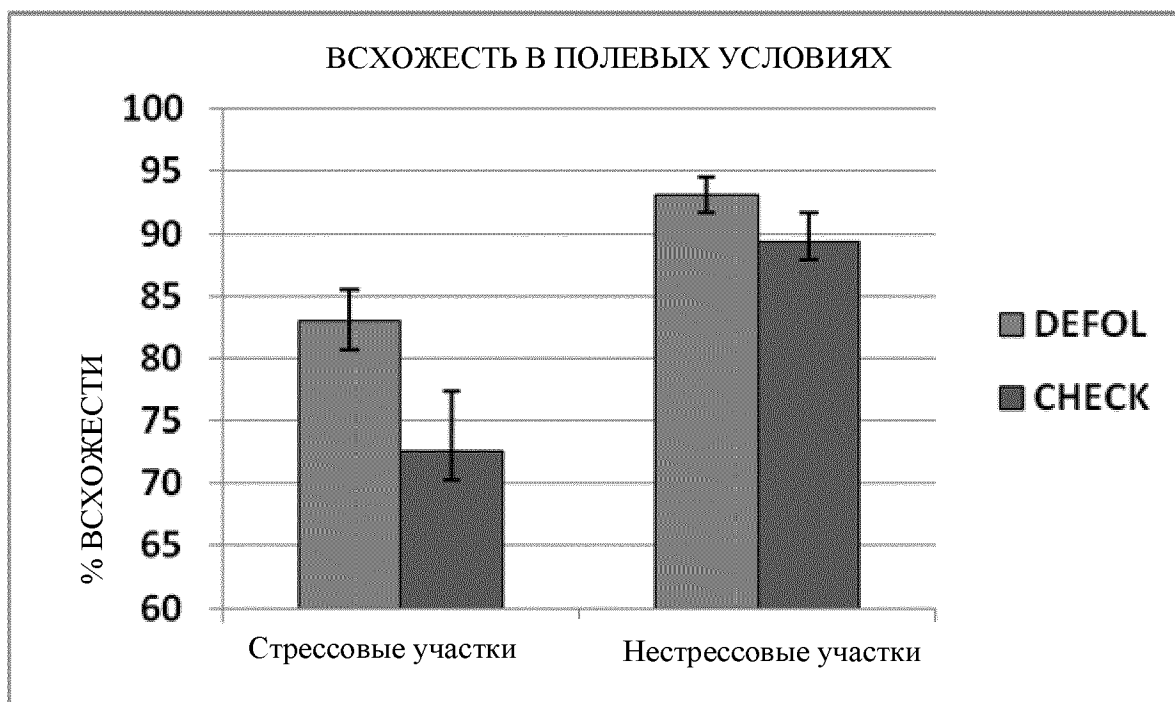
ФИГУРА 3



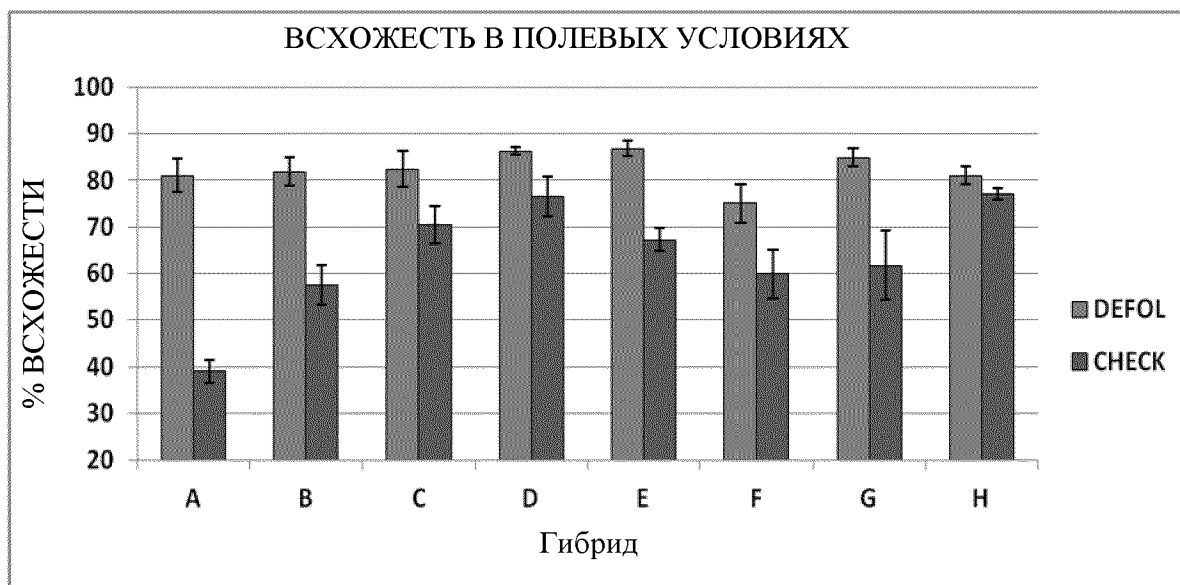
ФИГУРА 4



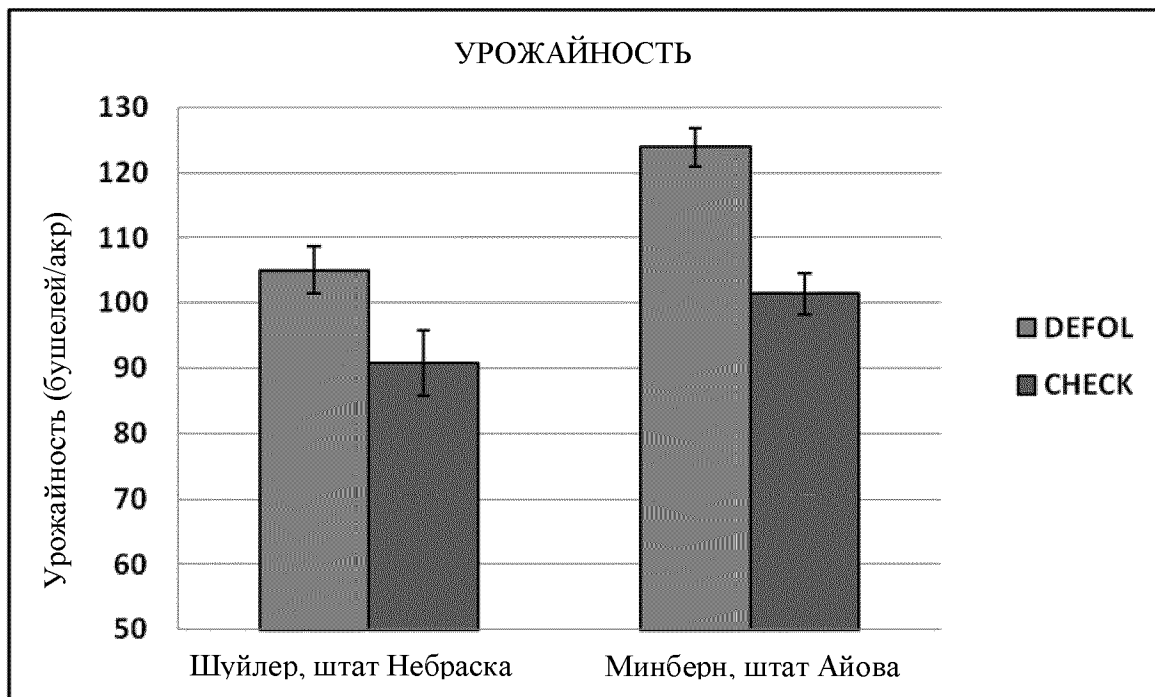
ФИГУРА 5



ФИГУРА 6



ФИГУРА 7



ФИГУРА 8