



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118331** (13) **C2**  
(51) МПК (2018.01)**A01N 63/02** (2006.01)**C12N 1/20** (2006.01)**C12N 1/21** (2006.01)**C05G 3/02** (2006.01)**A01C 1/06** (2006.01)**A01H 5/00****A01H 5/10** (2018.01)**C12N 5/04** (2006.01)**A01P 7/02** (2006.01)**A01P 1/00****A01P 3/00****A01P 7/04** (2006.01)**A01P 5/00**МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2014 01823**  
(22) Дата подання заявки: **24.07.2012**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.01.2019**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/511,467**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **25.07.2011**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.06.2014, Бюл.№ 11**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.01.2019, Бюл.№ 1**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2012/048012, 24.07.2012**

(72) Винахідник(и):  
**Грендлік Крістофер Дж. (US),  
Грін Уейн А. (US),  
Керовуо Янне С. (US),  
МакКанн Райан Т. (US)**  
(73) Власник(и):  
**МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ, ЛЛС,  
800 North Lindbergh Blvd., Saint Louis, MO  
63167, United States of America (US)**  
(74) Представник:  
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.  
№115**  
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
**US 6312940 B1, 06.11.2001  
US 7601346 B1, 13.10.2009  
US 2002/119124 A1, 29.08.2002  
US 2003/0165470 A1, 04.09.2003  
US 2009/0175837 A1, 09.07.2009  
BACON ET AL., "Biological Control of  
Fusarium moniliforme in Maize.",  
ENVIRONMENTAL HEALTH  
PERSPECTIVES, (200105), vol. 109, no.  
SUPPL, pages 325 - 332**

**(54) КОМПОЗИЦІЯ ТА СПОСІБ ДЛЯ БОРОТЬБИ З ФУЗАРІОЗОМ****(57) Реферат:**

Винахід стосується виділеного мікробного штаму, який є штамом SGI-014-C06 роду *Microbacterium*, депонованого NRRL B-50470, і його варіантів, які мають пестицидну активність, причому штам і його варіанти мають супресорну активність щодо фузаріозу, також композиції для біологічної боротьби і способів використання цих композицій для запобігання, інгібування або обробки проти фузаріозу і для збереження продуктивності рослини.

UA 118331 C2



## ВКЛЮЧЕННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Вміст доданого Переліку послідовностей включено тут в усій його повноті шляхом посилання. Доданий файл під назвою "SGI1520-IWO\_ST25.txt" розміром 55 Кб був створений 24 липня 2012 р. Цей файл відкритий для доступу за допомогою Microsoft Word на комп'ютері з операційною системою Windows OS.

## ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

Даний винахід стосується біологічних методів боротьби з фітопатогенними хворобами. Зокрема, винахід стосується композицій і способів, які можуть використовуватися в боротьбі з фузаріозом злакових рослин, таких, як пшениця та ячмінь.

## РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Фузаріоз, відомий також як "п'яний хліб", цвілеподібна рожева гниль і "снігова пліснява", є хворобою, що спустошує сільськогосподарські угіддя пшениці, ячменю і багатьох інших злакових культур в усьому світі і, особливо, у США, Європі та Китаю. Ця хвороба може досягати епідемічних масштабів і завдавати великі збитки зерновим культурам, особливо пшениці та ячменю, у вологих і напіввологих ареалах вирощування хлібних злаків, включаючи Індію, Росію, Францію, Німеччину і Великобританію. Зокрема, фузаріоз або фузаріоз пшениці є однією з найбільш збиткових хвороб пшениці у Сполучених Штатах. У загальнонаціональних масштабах ця хвороба, яка розвинулася на Середньому Заході і на Високих Рівнинах, завдала виробництву пшениці втрати, що досягають мільйонів доларів і стала, таким чином, головною перешкодою для успішного функціонування цієї індустрії в останні роки. Фузаріоз, окрім пшениці, вражає також ячмінь, овес, кукурудзу і багато інших зернових культур, та репродукується на них.

Дана хвороба може викликатися різними численними фітопатогенами і в першу чергу кількома видами грибів роду *Fusarium*. До імовірних збудників фузаріозу пшениці входять численні види роду *Fusarium*, наприклад, *F. culmorum*, *F. graminearum* (телеоморф, *Gibberella zeae*), *F. avenaceum* (телеоморф, *G. avenacea*), *F. roseum*, а також патогени, які не належать до роду *Fusarium*, такі, як *Microdochium nivale* (телеоморф, *Monographella nivalis*) і *Microdochium majus*. У Сполучених Штатах, Європі та інших найважливіших агрономічних ареалах світу домінуючим збудником фузаріозу виступає *Fusarium graminearum* (телеоморф, *Gibberella zeae* у буквальному сенсі).

Ці патогени, як правило, виживають на рослинних рештках. На колоски злаків вони потрапляють і вражають їх під час цвітіння, зупиняючи або частково затримуючи розвиток зерна в колосі злаку. В результаті цього патоген, що потрапив на рослину, може вбити частину колосу або весь колос. Деякі інфіковані насінини мають настільки низьку енергію проростання, що нерідко втрачають здатність прорости. Інфіковані насінини, які проросли, часто гинуть у фазі проростання внаслідок пелікуляріозу або кореневої гнилі, що викликають поганий хлібостій виростлого злаку. Здорові сіянці можуть інфікуватися також у фазі появи сходів. Окрім поганого, неекономічного хлібостою, втрати врожаю внаслідок ураження патогеном можуть бути доволі високими, якщо умови сприяють розвитку хвороби.

Грибні патогени роду *Fusarium* розповсюджуються по ареалах культивування злаків в усьому світі і завдають особливо великий збиток у місцях випадання великих осадів в період між цвітінням і наливом зерна. Якщо збудником захворювання є *Fusarium graminearum*, то дана хвороба потребує першочергового втручання не тільки тому, що вона знижує комерційні показники ураженого зерна, крім прямих втрат врожаю, а й також тому, що зараження грибом *Fusarium* може призводити до накопичення трихотеценових мікотоксинів у зернах, створюючи таким чином загрозу здоров'ю людей і худоби. Трихотецени являють собою головне мікотоксичне забруднення зернових культур в усьому світі, здатне у нежуйних тварин викликати відмову від їжі, блювоту, діарею і втрату ваги та створювати загрозу здоров'ю для інших тварин і людей у випадках високих рівнів впливу цих токсинів. У Сполучених Штатах ця загроза зросла ще більше внаслідок нещодавнього зсуву в штаммах *F. graminearum* у бік підвищення продуктування і сили токсинів. Мікотоксинами, що виявляються найчастіше, є дезоксиніваленон (DON, відомий також як вомітоксин) і зеараленон (ZEA). Дезоксиніваленон є особливо небезпечним токсином, який викликає шлунково-кишкові розлади, що супроводжуються кровотечами та іншими важкими станами у людей і тварин, які спожили інфіковані зерна, а в деяких випадках можуть призвести до смерті. Оскільки дезоксиніваленон у загальному випадку є стійким до змін рН і до високих температур, дезінтоксикація може проходити дуже важко. Таким чином, зерна, забруднені вище певного рівня, не можуть використовуватися у пивоварінні, переробці, кормі для худоби і, отже, повинні видалятися у відходи.

Сьогодні розроблено чимало різноманітних стратегій боротьби з фузаріозом у сільськогосподарських культур. Найбільш перспективними серед них є хімічні методи, розробка

стійких сортів культур, а також традиційні методи сівозміни та обробки полів. Серед цих напрямків певну ефективність у зниженні зараження фузаріозом можна отримати від застосування хімічних пестицидів, проте залишки фунгіцидів, використаних на пізніх стадіях росту культур, як правило, в періоди цвітіння, лише за декілька тижнів до збору врожаю, зменшують привабливість цих методів. З іншого боку альтернативним підходом у боротьбі з цією хворобою є методи традиційної селекції та генної інженерії, завдяки яким відбувається помітний прогрес в розробках стійких сортів агрокультур. Генна інженерія дозволяє змінювати продукування фітогормону і здійснювати маніпуляції в його сигнальному шляху. Досягнутий останніми роками прогрес в галузі традиційної селекції дозволив значно просунутися в розумінні генетичних основ стійкості до фузаріозу й отримати відомості про численні гени і локуси кількісних ознак (QTL: quantitative trait loci), які надають цієї стійкості. Але прогрес у підвищенні стійкості агрокультур до фузаріозу був повільним, що пояснюється, в першу чергу, труднощами, пов'язаними з вивченням даної хвороби. Фактично про механізми, які визначають стійкість або сприйманість рослин до фузаріозу, в даний час відомо порівняно мало. Крім того, генетичне різноманіття грибів виду *Fusarium*, які є переважними збудниками хвороби, часто створює проблеми у визначенні того, наскільки тривалою повинна бути ефективність хімічних фунгіцидів і наскільки стійкими повинні бути агрокультури, які потрібно захистити. Внаслідок цього в даний час практично всі сорти пшениці в агропромисловому виробництві залишаються уразливими до інфікування.

Крім того, незважаючи на певний успіх у боротьбі з фузаріозом, який можуть давати традиційні методи орної обробки з закопуванням пожнивних залишків, інфікованих збудником, наприклад, *F. graminearum*, звичайне орання ґрунту після жнив є несумісним з усталеною практикою охорони ґрунтів, тобто за умови мінімальної орної обробки. Беручи до уваги ймовірність розкидання інокуляту на великі відстані і те, що різні культури можуть ставати альтернативними хазяїнами патогенів, метод сівозміни нерідко виявляється неприйнятним. Окрім забруднення навколишнього середовища пестицидами, їх використання може породжувати проблеми, пов'язані з пестицидостійкістю. Крім того, з їх використанням можуть бути зв'язані також зареєстровані випадки росту вмісту DON в зернах. Крім цього, витрати і зрослі проблеми як в державному, так і в приватному секторі, пов'язані з забрудненням пестицидами навколишнього середовища і вимогами щодо безпеки харчових продуктів, знижують привабливість даного способу боротьби з такими хворобами і примушують у культивуванні агрокультур застосовувати пестициди якомога менше.

Підсумовуючи вищевикладене, можна сказати, що, незважаючи на суттєве просування в галузі розробок способів боротьби з фузаріозом, зменшення впливу цієї згубної хвороби на виробництво і якість зерна поки що залишається невирішеною проблемою. Отже, для підвищення продуктивності виробництва і якості багатьох зернових культур важливо вести пошук і розробку нових способів боротьби з фузаріозом. Ці проблеми потребують термінового вирішення не тільки у Сполучених Штатах, а й на всій земній кулі, включаючи Азію і Європу.

Боротьба з фузаріозом за допомогою біологічних агентів стала привертати до себе увагу, починаючи з середини 1990-х років. Біологічні агенти для такої боротьби (BCA: Biological control agents), незважаючи на те, що кількість їх в даний час доволі обмежена, можуть, за своєї сумісності з навколишнім середовищем, бути дуже ефективними в зниженні рівня захворюваності, зумовленої патогенами роду *Fusarium*. Суспільне визнання, сумісність з іншими засобами боротьби з хворобами агрокультур, довговічність і стійкість – все це поряд з іншими позитивними факторами свідчить про необхідність розробок стратегій біологічної боротьби з фузаріозом. Засоби такої біологічної боротьби можуть відігравати важливу роль в органічній зерновій індустрії. У звичайному виробництві зерна такі засоби можуть продовжити захист колосків на час після фази цвітіння, коли хімічні фунгіциди застосовуватися більше не можуть. Сьогодні в галузі біологічної боротьби вже досягнутий значний прогрес. Так, наприклад, деякі штами бактерій, які продукують спори (наприклад, видів *Bacillus* і *Pseudomonas*), і дріжджів (наприклад, виду *Cryptococcus*) демонструють якості, потрібні для боротьби з фузаріозом і для зниження мікотоксिनного забруднення. Але, незважаючи на цей прогрес, залишається незадоволеною потреба у поліпшених мікроорганізмах для їх використання у боротьбі з фузаріозом. Хоча самі по собі BCA-засоби вже є визнаними більш придатним інструментом для боротьби з фітопатогенами, а BCA-продукти знаходять на ринку значно більш широкий попит, ніж коли-небудь раніше, все ж сьогодні було зроблено зовсім мало спроб розробити стратегії й антагоністичний мікроорганізм для біологічної боротьби з фузаріозом. Крім того, життєвий цикл роду *Fusarium* та інших збудників фузаріозу вказує на те, що ці патогени потенційно можуть бути придатними для використання їх в методах біоборотьби за допомогою антагоністичних мікроорганізмів на різноманітних фазах росту і розвитку. Таким чином існує потреба в пошуку

нових засобів біологічної боротьби, бажано з різноманітними видами активності, а також способів біоборотьби, які б дозволяли ефективно запобігати або пригнічувати розвиток фузаріозу.

#### СУТЬ ВИНАХОДУ

Даним винаходом пропонуються композиції, які містять мікробіологічні штами і культури. Деякі штами, культури та їх композиції можуть використовуватися для боротьби з фузаріозом, наприклад, різноманітних сільськогосподарських культур, включаючи пшеницю та інші зернові. Винаходом пропонуються також композиції для біологічної боротьби і способи використання даних композицій для запобігання виникненню, пригнічення розвитку або для лікування викликані патогенами хвороби і для збереження врожаю. Винаходом пропонуються також способи використання таких композицій як засобів біологічної боротьби в комбінації з іншими ефективними в сільському господарстві сполуками або композиціями для боротьби зі шкідливими фітопатогенами.

В одному з аспектів даного винаходу пропонуються виділені мікробні штами, які мають супресорну активність до фузаріозу. Мікробні штами відповідно до цього аспекту вибираються із групи, яка складається із видів *Microbacterium*, *Bacillus*, *Mycosphaerella* і *Variovorax*. В деяких переважних варіантах здійснення винаходу мікробні штами вибираються із групи, яка складається зі штаму SGI-010-H11 виду *Mycosphaerella* (депозит NRRL 50471), штаму SGI-014-C06 виду *Microbacterium* (депозит NRRL B-50470), штаму SGI-005-G08 виду *Microbacterium* (депозит NRRL\_\_-), штаму SGI-014-G01 виду *Variovorax* (депозит NRRL B-50469), штаму SGI-Q15-F03 виду *Bacillus* (депозит NRRL B-50760), штаму SGI-015-H06 виду *Bacillus* (депозит NRRL B-50761) та їх варіантів, які мають пестицидну активність. Мікробний штам відповідно до інших переважних варіантів здійснення винаходу може містити послідовність ДНК, що демонструє щонайменше 85 % ідентичність будь-якій із нуклеотидних послідовностей, наведених в доданому Переліку послідовностей. Винаходом пропонуються також біологічно чисті культури і збагачені культури описаних тут мікробних штамів.

Відповідно до інших аспектів даного винаходу пропонуються композиції, які містять мікробний штам згідно з винаходом або його культуру та ефективну для сільськогосподарського виробництва кількість сполуки або композиції, вибраних із групи, яка складається із акарициду, бактерициду, фунгіциду, інсектициду, мікробіциду, нематоциду, пестициду і добрива. Зазначені композиції в деяких варіантах здійснення даного аспекту можуть бути приготовані у формі препарату, вибраного із групи, яка складається із емульсії, колоїду, пілоподібного препарату, частки, гранули, порошку, спрею і розчину; в деяких інших варіантах здійснення винаходу зазначені композиції можуть містити носій. В одному із переважних варіантів носій є прийнятним для сільськогосподарського виробництва. В одному з особливо переважних варіантів здійснення винаходу носієм є насінина рослини. В інших переважних варіантах композицією є препарат покриття насіння. Крім того, винаходом передбачене насіння, вкрите композицією відповідно до даного винаходу.

В іншому аспекті даного винаходу пропонуються способи запобігання, інгібування або обробки проти розвитку фітопатогену. Дані способи включають вирощування мікробного штаму згідно з винаходом або його культури в поживному середовищі або ґрунті рослини-хазяїна перед або водночас із вирощуванням рослини-хазяїна в живильному середовищі або ґрунті, де в деяких переважних варіантах здійснення даного аспекту фітопатоген викликає фузаріоз. В одному з особливо переважних варіантів здійснення винаходу фітопатогеном є *Fusarium graminearum*.

В іншому аспекті даного винаходу пропонуються способи запобігання, інгібування або обробки проти розвитку фузаріозу рослини. Дані способи включають постачання до рослини або до середовища навколо рослини ефективною кількістю мікробного штаму згідно з винаходом або його культури. В одному із варіантів здійснення винаходу такий фузаріоз викликається грибом *Fusarium graminearum*. В деяких варіантах здійснення даного аспекту мікробний штам або його культуру постачають до ґрунту, насінини, коренів, квітки, листка, частини рослини або всієї рослини, де в переважному варіанті рослина є сприйнятливою до *Fusarium graminearum*. В деяких інших переважних варіантах здійснення винаходу рослиною є пшениця, кукурудза, ячмінь або овес, в іншому переважному варіанті здійснення мікробний штам згідно з винаходом або його культуру вводять у рослину як ендофіт.

В подальшому аспекті даного винаходу пропонуються рослини неприродного походження. Рослини неприродного походження штучно інфікуються мікробним штамом згідно з винаходом або його культурою. Крім того, в деяких переважних варіантах здійснення даного аспекту винаходу пропонуються насінина, репродукційна тканина, вегетативна тканина, частини рослини і потомство рослини неприродного походження.

В іншому аспекті даного винаходу пропонується спосіб приготування сільськогосподарської композиції. Даний спосіб включає інокуляцію мікробного штаму відповідно до даного винаходу або його культури в субстрат або на субстрат і вирощування його при температурі 1-37 °C до отримання клітин або спор в кількості щонайменше  $10^2$ - $10^3$  на мілілітр або на грам.

5 Цим та іншим цілям й ознакам даного винаходу дано більш повне роз'яснення нижче, у детальному описі і формулі винаходу.

#### ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

##### Визначення

10 Якщо не вказано іншого, то всі використовувані в даному описі терміни, які стосуються даної галузі техніки, умовні позначки та інші наукові терміни мають загальноприйняті значення, відомі фахівцям у галузі техніки, до якої належить даний винахід. Деяким термінам із загальновідомими значеннями тут дані визначення з метою уникнення різночитання і/або для полегшення посилань, і включення тут таких визначень не повинно розглядатися як таке, що представляє суттєву відмінність від значень, загальноприйнятих серед фахівців. Багато

15 способів і процедур, які тут описані або на які зроблені посилання, повинні бути фахівцям добре відомими і широко використовуються ними відповідно до звичайних методологій.

Якщо із контексту зрозуміло не впливає іншого, то однина може мати значення множини. Наприклад, термін "клітина" може мати значення як однієї клітини, так і множини клітин, включаючи їхні суміші.

20 Вирази "антагоністичний мікроорганізм" і "мікробний антагоніст" – обидва означають мікроорганізм, штам якого демонструє ступінь інгібування фузаріозу, який на статистично значущому рівні перевищує ступінь інгібування від необробленого контролю.

25 Антибіотик: термін "антибіотик" в даному описі означає субстанцію, здатну вбити або інгібувати ріст мікроорганізму. Антибіотики можуть продукуватися щонайменше одним із таких джерел: 1) мікроорганізмом, 2) процесом синтезу, 3) процесом напівсинтезу. Антибіотиком може бути мікроорганізм, який виділяє летку органічну сполуку. Крім того, антибіотиком може бути летка органічна сполука, яка виділяється мікроорганізмом.

30 Бактерицидний: термін "бактерицидний" у даному описі означає здатність композиції або субстанції збільшити смертність бактерій або інгібувати швидкість їх росту. Інгібування швидкості росту бактерій у більшості випадків може оцінюватися за зменшенням кількості життєздатних бактеріальних клітин у плині часу.

35 Біологічна боротьба: термін "біологічна боротьба" і його скорочена форма "біоборотьба" в даному описі означають боротьбу з патогеном або з комахою або з будь-яким іншим небажаним організмом за допомогою щонайменше одного іншого організму, який не є людиною. Як приклад відомого механізму біологічної боротьби можна навести використання мікроорганізмів, які борються з кореневою гниллю шляхом витіснення грибів із конкуренції за простір на поверхні кореня, або мікроорганізмів, які або інгібують ріст патогенна, або вбивають його. "Рослиною-хазяїном" у контексті біологічної боротьби є рослина, сприйнятлива до хвороби, яка викликається даним патогеном. "Рослиною-хазяїном" у контексті виділення організму, що належить до виду грибів, від його природного середовища є така рослина, яка підтримує ріст гриба, тобто, наприклад, рослина виду, для якого гриб є ендоефітом.

40 Термін "зерновий" в даному описі означає будь-який зерновий вид, який може бути сприйнятливим до фузаріозу. До таких сприйнятливих зернових культур належать пшениця, ячмінь, овес і тритикале; при цьому пшениця та ячмінь є двома культурами, для яких дана хвороба є особливо значною економічною проблемою.

45 Термін "ефективна кількість" означає кількість, достатню для отримання корисних або цільових результатів. У тому, що стосується боротьби з хворобою, лікувальної обробки, інгібування хвороби або захисту від неї, ефективною є кількість, достатня для пригнічення, стабілізації, повернення ходу хвороби назад, уповільнення або затримання розвитку інфекції-мішені чи хворого стану. Таким чином вираз "ефективна кількість" в даному описі означає таку кількість антагоністичної обробки, яка є необхідною для зниження рівня розвитку патогену і/або рівня викликаного патогеном хвороби порівняно з рівнем, який спостерігається у необробленого контролю. Як правило, ефективна кількість даної антагоністичної обробки дає зниження щонайменше на: 20 %; як правило, від 30 до 40 % і більше; як правило, від 50 до 60 % і більше; як правило, від 70 до 80 % і більше; або, як правило, від 90 до 95 % порівняно з рівнем хвороби і/або рівнем розвитку патогену, що спостерігається у необробленого контролю у відповідних умовах лікувальної обробки. Ефективна кількість може постачатися за один або більше прийомів. Фактична швидкість постачання рідкого препарату зазвичай знаходиться у межах приблизно від мінімум  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{10}$  життєздатних клітин/мл і переважно – приблизно від  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^9$  життєздатних клітин/мл. У більшості станів антагоністичні мікробні штами згідно

з винаходом, описані у Прикладах нижче, будуть оптимально ефективними при швидкості постачання в інтервалі приблизно від  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^9$  життєздатних клітин/мл, якщо при постачанні забезпечується практично однорідний контакт щонайменше приблизно 50 % тканин рослини. Якщо антагоністи постачаються у формі твердого препарату, то швидкість постачання повинна регулюватися так, щоб забезпечувати кількість життєздатних клітин на одиницю площі поверхні тканини рослини, порівняну з отримуваним при вищезгаданих величинах швидкості обробки рідиною. Як правило, засоби біологічної боротьби згідно з винаходом є біологічно ефективними, якщо вони постачаються в концентрації вище  $10^6$  КУО/г (колонієутворювальних одиниць на грам), переважно, якщо вище  $10^7$  КУО/г, ще переважніше, якщо вище  $10^8$  КУО/г, і найпреважніше, якщо в концентрації  $10^9$  КУО/г.

Вираз "ефективний мікробний антагоніст", який використовується відносно мікроорганізму, означає, що даний мікробний штам демонструє ступінь інгібування фузаріозу, який на статистично значущому рівні перевищує ступінь інгібування, що спостерігається у необробленого контролю. Як правило, ефективний мікробний антагоніст має здатність давати зниження щонайменше на: 20 % і більше; як правило, від 30 до 40 % і більше; як правило, від 50 до 60 % і більше; як правило, від 70 до 80 % і більше; як правило, від 90 до 95 % відносно рівня хвороби і/або рівня розвитку патогену, що відбувається в необробленому контролі за відповідних умов лікувальної обробки.

Композиція А термін "композиція" означає комбінацію активного агента щонайменше з іншою сполукою, носієм або композицією, інертною(-им) (наприклад, детекційним агентом або міткою, рідким носієм і т. п.), або активним агентом, наприклад, пестицидом.

Виділений мікробний штам, виділена культура, біологічно чиста культура і збагачена культура: використовуваний в даному описі термін "виділений" стосовно мікроорганізму (наприклад, бактерії або мікрогриба) означає мікроорганізм, який був виділений і/або очищений від середовища, де він природно виникає. Аналогічно до цього, термін "виділений штам" мікроба означає штам, який був виділений і/або очищений від свого природного середовища. Таким чином термін "виділений мікроорганізм" не включає в своє значення мікроорганізм, що перебуває в середовищі, в якому він природним чином виникає. Крім того, термін "виділений" не обов'язково відображає ступінь, до якого даний мікроб був очищений. Термін "по суті чиста культура" мікробного штаму означає культуру, яка по суті не містить інших мікробів, окрім цільового мікробного штаму або штамів. Інакше кажучи, "по суті чиста культура" мікробного штаму по суті не містить забруднень, які можуть включати мікробні забруднення, а також небажані хімічні забруднення. Крім того, використовуваний тут термін "біологічно чистий" штам означає штам, виділений з матеріалів, з якими він асоціюється в природних умовах. Варто зауважити, що штам, асоційований з іншими штамми або сполуками, або матеріалами, які в природних умовах, зазвичай, не зустрічаються, також визначається як "біологічно чистий". Цілком зрозуміло, що монокультура того чи іншого штаму є "біологічно чистою". Використовуваний тут термін "збагачена культура" виділеного мікробного штаму означає мікробну культуру, яка містить більше 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % або 95 % виділеного штаму.

Використовуваний тут термін "ендофіт" означає ендосимбіонт, який живе в рослині впродовж щонайменше частини свого життя, не викликаючи очевидної хвороби. Трансмісія ендофітів може відбуватися або по вертикалі (безпосередньо від батьків до потомків) або по горизонталі (від індивіда до неспорідненого індивіда). Передані по вертикалі грибні ендофіти є, як правило, безстатевими і переносяться від материнської рослини до потомства шляхом проникнення в насінини хазяїна через грибні гіфи. Бактеріальні ендофіти можуть переноситися по вертикалі також від насінин до саджанців (Ferreira et al., 2008). На противагу цьому, ендофіти, які передаються по горизонталі, як правило, мають статі і переносяться спорами вітром і/або комахами-переносниками. Ендофіти зернових культур привернули до себе велику увагу у зв'язку з їхньою здатністю боротися як з хворобою, так і з зараженням комахою, а також активувати ріст рослин.

Функціонально порівнянний протеїн: використовуваний тут термін "функціонально порівнянний протеїн" стосується протеїнів, які мають щонайменше одну спільну характеристику. Такими характеристиками можуть бути подібність одна одній послідовностей, біохімічна активність, подібність одна одній схем транскрипції і фенотипова активність. Як правило, функціонально порівнянні протеїни мають деяку подібність між собою послідовностей або є подібними щонайменше за однією біохімічною ознакою. У межах цього визначення функціонально порівнянними вважаються гомологи, ортологи, паралоги та аналоги. Крім того, функціонально порівнянні протеїни у загальному випадку мають схожу щонайменше одну біохімічну і/або фенотипову активність. Функціонально порівнянні протеїни надають одній і тій самій характеристиці подібність, але не обов'язково в однаковому ступені. Як правило, у

функціонально порівнянних протеїнів одні і ті ж характеристики в кількісному вимірі у одного із порівнюваних протеїнів складають щонайменше 20 % від таких у іншого, частіше від 30 до 40 %, ще частіше від 50 до 60 %, ще частіше від 70 до 80 %, ще частіше від 90 до 95 % і, як правило, від 98 до 100 % від таких у іншого.

5 Фунгіцидний: використовуваний тут термін "фунгіцидний" означає здатність композиції або субстанції знижувати швидкість росту грибів або збільшувати смертність грибів.

Гриб *Fusarium*: у контексті даного винаходу термін "гриб *Fusarium*" включає у себе як статеву (телеоморфну) фазу цього організму, так і безстатеву (анаморфну) його фазу, які називаються також фазами, відповідно, досконалих і недосконалих грибів. Наприклад, анаморфною фазою гриба *Fusarium graminearum* є *Gibberella zeae*, тобто збудник фузаріозу. Ця хвороба, як правило, виникає, коли квітка або сім'яна шапка інокулюється конідіями, які випускаються недосконалою формою, або аскоспорами, що випускаються досконалою формою цього гриба.

15 Мутант: використовуваний тут термін "мутант" або "варіант" стосовно мікроорганізму означає модифікацію батьківського штаму, в якому цільова біологічна активність є подібною до активності, що демонструється батьківським штамом. Наприклад, у випадку *Microbacterium* "батьківським штамом" зветься оригінальний штам *Microbacterium* до мутагенезу. Мутанти або варіанти можуть виникати в природі без втручання людини. Вони можуть отримуватися також шляхом обробки одним способом або багатьма способами і складами, відомими фахівцям в даній галузі. Наприклад, батьківський штам може бути оброблений хімікатом, таким, як N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанід, етилметансульфон, або ж гамма-, рентгенівським або ультрафіолетовим випромінюванням, або будь-якими іншими засобами, добре відомими фахівцям у даній галузі.

25 Нематоцидний: термін "нематоцидний" в даному описі означає здатність субстанції або композиції збільшити смертність або інгібувати швидкість росту нематодів.

Патоген: термін "патоген" в даному описі означає організм, такий, як водорість, павукоподібне, бактерія, гриб, комаха, нематода, рослина-паразит, дріжджі, найпростіша тварина або вірус, здатний продукувати хворобу у рослини або тварини. Термін "фітопатоген" в даному описі означає патогенний організм, який інфікує рослину.

30 Відсоток ідентичності: "відсоток ідентичності послідовності" відповідно до даного опису визначають шляхом локального зіставлення двох оптимально вирівняних послідовностей на ділянці вирівнювання, який визначається довжиною локального вирівнювання двох послідовностей. При оптимальному вирівнюванні двох послідовностей дана амінокислотна послідовність на ділянці вирівнювання може містити добавки або делеції (наприклад, пробіли або оверхенги) порівняно з еталонною послідовністю (яка не містить добавок або делецій). Локальне вирівнювання двох послідовностей може проводитися тільки за тими сегментами кожної послідовності, які за припущенням є достатньо подібними за певним критерієм, що вибирається відповідно до алгоритму, використовуваному для вирівнювання (наприклад, програми BLAST). Відсоток ідентичності обчислюють шляхом визначення кількості збігів позицій, в яких в обох послідовностях розміщуються ідентичні основи нуклеїнових кислот або залишки амінокислот, ділення отриманої кількості збігів на загальну кількість позицій на даній ділянці вирівнювання і множення одержаного результату на 100. Оптимальне вирівнювання послідовностей може здійснюватися за допомогою алгоритму локальної гомології Сміта-Ватермана (Smith and Waterman, Add. APL. Math. 2:482, 1981) або алгоритму глобальної гомології Нідлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970), методом дослідження подібності Пірсона-Ліпмана (Pearson and Lipman, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85: 2444, 1988), евристичної імплементації цих алгоритмів (NCBI BLAST, WU-BLAST, BLAT, SIM, BLASTZ) або шляхом візуальних досліджень. Якщо дві послідовності були вибрані для вирівнювання, то для проведення їх оптимального вирівнювання бажано використовувати алгоритми GAP і BESTFIT. Як правило, за умовчанням задають величини 5.00 для ваги пробілів і 0.30 для довжини ваги пробілів. Термін "суттєва ідентичність послідовностей" між полінуклеотидними або поліпептидними послідовностями стосується полінуклеотиду або поліпептиду, який містить послідовність, що має щонайменше 50 % ідентичність, переважно щонайменше 70 %, переважно щонайменше 80 %, ще переважніше щонайменше 85 %, більш переважно щонайменше 90 %, ще більш переважно щонайменше 95 %, і найпереважніше щонайменше 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність порівняно з еталонною ідентичністю, визначену за допомогою комп'ютерної програми.

60 Аналіз нуклеїно кислотних і амінокислотних послідовностей може проводитися шляхом зіставлення їх з відповідними нуклеїно кислотними або амінокислотними послідовностями, що зберігаються в публічних або приватних базах даних. Такі дослідження можуть проводитися за



допомогою програми (NCBI BLAST v 2.18) Національного центру інформації з біотехнології (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool). Програма NCBI BLAST є доступною в мережі Інтернет за адресою [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (National Center for Biotechnology Information). У програмі NCBI BLAST можуть використовуватися, як правило, такі параметри: Опції фільтрів встановлюють на "За умовчанням" (default), Матрицю вирівнювання (Comparison Matrix) встановлюють на "BLOSUM62", Витрати на пробіли (Gap Costs) встановлюють на "Existence: 11, Extension: 1", Розмір слова (Word Size) встановлюють на 3, Попіг очікування Expect (E threshold) встановлюють на  $1e-3$ , а мінімальну довжину локального вирівнювання встановлюють на 50 % довжини послідовності, що аналізується. Ідентичність і подібність послідовності можуть визначатися також за допомогою програми GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. USA).

Термін "пестицидний" в даному описі означає здатність даної субстанції або композиції знижувати швидкість росту організму-шкідника, тобто небажаного організму, або збільшувати смертність організму-шкідника.

Під виразом "супресорна активність" агента біологічної боротьби з даним фітопатогеном розуміють здатність даного агента пригнічувати, інгібувати, стабілізувати, повертати хід хвороби назад, уповільнювати або затримувати розвиток самого патогену або прогресування інфекції або хворого стану, викликаного даним патогеном.

Варіант: термін "варіант", використовуваний в даному описі стосовно мікроорганізму, означає штам, який має ідентифікаційні ознаки біологічного виду, до якого він належить, і при цьому щонайменше одну варіацію нуклеотидної послідовності або розпізнавальну особливість, що ідентифікується та належить до батьківського штаму і є такою, що генетично успадковується. Наприклад, штам SGI-SGI-014-C06 виду *Microbacterium*, який має фунгіцидну активність і має такі особливості, що ідентифікуються: 1) здатність пригнічувати ріст гриба *Fusarium graminearum* і його телеоморфу *Gibberella zeae*, 2) здатність пригнічувати розвиток фузаріозу, 3) наявність обов'язкових генів з ідентичністю більше 95 %, більше 96 %, більше 97 %, більше 98 % або більше 99 % до обов'язкових генів SGI-014-C06 виду *Microbacterium*, може використовуватися для підтвердження того, що варіантом, який аналізується, є SGI-014-C06 виду *Microbacterium*.

У застосуванні до нуклеїнових кислот і поліпептидів термін "варіант" має значення поліпептидної, протеїнової або полінуклеотидної молекули з деякими відмінностями, створеними штучно або природним шляхом в їх амінокислотних або нуклеїнокислотних послідовностях, від еталонних поліпептидів або полінуклеотидів, відповідно. Цими відмінностями можуть бути, наприклад, заміни, інсерції, делеції або будь-які цільові комбінації таких змін в еталонному поліпептиді або полінуклеотиді. Поліпептидні і протеїнові варіанти можуть, крім того, складатися зі змін в заряді і/або посттрансляційних модифікацій (наприклад, глікозилювання, метилювання, фосфорилювання та ін.)

Всі публікації і патентні заявки, згадані в даному описі, включені тут шляхом посилання так, ніби кожна із публікацій або патентних заявок була індивідуально включена шляхом посилання.

Посилання не означають визнання їх відомим рівнем техніки або прототипом. Обговоренням посилань констатується, що їхні автори декларують, а заявники мають право заперечувати точність і релевантність цитованих документів. Абсолютно зрозуміло, що, хоча тут зроблені посилання на численні публікації відомого рівня техніки, ці посилання не означають визнання того, що будь-який із цих документів створює собою частину загальновідомих знань у даній галузі.

#### Методи таксономічної ідентифікації

Мікроорганізми часто можна розрізнати шляхом прямих мікроскопічних досліджень (адже всі клітини у зразку під мікроскопом мають різний вигляд), за характеристиками забарвлення, шляхом простого молекулярного аналізу (наприклад, просто шляхом визначення поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ)) і т. д. В додаток до ілюстративних прикладів таких методів таксономічного аналізу, описаних нижче, в Прикладах 2-3, у таксономічній ідентифікації того чи іншого мікроорганізму може використовуватися до кількох різноманітних рівнів аналізу і кожний аналіз може ґрунтуватися на відмінних від інших характеристиках даного організму. До таких різновидів таксономічного аналізу можуть входити аналіз на основі нуклеїнових кислот (наприклад, аналіз індивідуальних специфічних генів за рівнем їх наявності або за їхньою точною послідовністю, або за експресією конкретного гена чи родини генів), протеїновий аналіз (наприклад, на функціональному рівні за допомогою прямого або непрямого ферментного аналізу, або на структурному рівні за допомогою методів імунодетектування) і т. д.

а. Аналіз за посередництвом нуклеїнових кислот. Фахівцям в даній галузі добре відомо, що в таксономічній ідентифікації того чи іншого мікроорганізму можуть використовуватися

найрізноманітніші методи нуклеїнокислотного аналізу. Ці методи можуть використовуватися для ідентифікації клітин за нуклеотидною послідовністю гена, або для ідентифікації клітини, яка має конкретні гени або родини генів. Придатними для таксономічних досліджень загальними родинними генів можуть бути родина генів 16S, родина актинових генів і родина генів рекомбінази A (recA). До цих методів, як правило, входять ампліфікація і секвенування генів із дуже малих кількостей клітин, що часто дозволяє подолати проблеми, пов'язані з концентруванням клітин та їхніх ДНК із розбавлених суспензій. Термін "ампліфікація нуклеїнових кислот", у загальному випадку, стосується методів збільшення кількості копій нуклеїнокислотної молекули у зразку або препараті. Техніка ампліфікації нуклеїнових кислот є добре відомою. Ампліфікацію нуклеїнових кислот можна здійснювати, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), у якій взятий у суб'єкта біологічний зразок приводять у контакт з парою олігонуклеотидних праймерів в умовах, які дозволяють здійснювати гібридизацію праймерів з нуклеїнокислотою матрицею в даному зразку. Праймери в придатних умовах подовжуються, відокремлюються від матриці, а потім відпалюються, подовжуються і відокремлюються, збільшуючи кількість копій нуклеїнових кислот. Ампліфікація *in vitro* може проводитися також методом зсуву ниток, ізотермічним методом без транскрипції, методом ампліфікації з реакцією репарації ланцюгів, методом лігазної ланцюгової реакції, методом лігазної ланцюгової реакції із заповненням розривів, спареним методом лігазної детекції і ПЛР, і методом ампліфікації без транскрипції РНК.

Окрім праймерів, наведених в ілюстративних Прикладах 2-3 і доданому Переліку послідовностей, авторами під час лабораторних експериментів були сконструйовані також інші праймери і, крім того, проводиться подальше конструювання нових праймерів для індивідуальних біологічних видів і філогенетичних груп мікроорганізмів. Такі вузькоспрямовані праймери можуть знаходити застосування в описаних тут способах для відбору і/або специфічної ідентифікації конкретних, цільових мікроорганізмів.

Методи готування і використання нуклеїнокислотних праймерів описані, наприклад, у [Sambrook et al. (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1989), Ausubel et al. (ed.) (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1998)]. Пари праймерів для ампліфікації можуть бути отримані із відомої послідовності, наприклад, за допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Primer", розробленої Інститутом фузаріозу, м. Кембридж, шт. Массачусетс, США (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Mass.). Фахівцям в даній галузі добре відомо, що специфічність зонда або праймера зростає з його довжиною. Так, наприклад, праймер, який містить 30 послідовних нуклеотидів його рРНК-кодуючої нуклеотидної або фланкувальної ділянки, буде відпалюватися до цільової послідовності з більш високою специфічністю, ніж відповідний праймер, який складається тільки із 15 нуклеотидів. Таким чином для отримання більшої специфічності можна відбирати зонди і праймери, які містять, щонайменше, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 або більше послідовних нуклеотидів цільової нуклеотидної послідовності, такі, як 16S рРНК.

Нуклеїнові кислоти, придатні для нуклеїнокислотних маніпуляцій (наприклад, ПЛР), можна отримувати за допомогою таких загальновідомих технологій, як екстрагування фенол-хлороформом, або за допомогою одного із численних комерційних комплектів екстрагування ДНК. Альтернативним шляхом ампліфікації ДНК може бути присаджування клітин безпосередньо в реакційну суміш для ампліфікації нуклеїнових кислот і проведення решти маніпуляцій на стадії денатурації з лізисом клітин і відокремленням ДНК.

Одержаний продукт реакцій ампліфікації нуклеїнових кислот аналізують за допомогою стандартних методів, включаючи електрофорез, картини розщеплення рестрикційною ендонуклеазою, гібридизацію або лігування олігонуклеотидів і/або секвенування нуклеїнових кислот. Якщо методи гібридизації використовуються для всіх цілей ідентифікації клітин, то придатними для цього можуть бути найрізноманітніші способи мічення зондів, включаючи флуоресцентне мічення, радіоактивне мічення і нерадіоактивне мічення. У випадку використання методів секвенування нуклеїнових кислот може проводитися дослідження гомології нуклеотидних послідовностей ампліфікованих нуклеїнокислотних молекул за допомогою різноманітних баз даних відомих послідовностей, включаючи, наприклад, бази даних DDBJ/GenBank/EMBL.

б. Протеїн-опосередкований аналіз. В додаток до аналізу нуклеїнових кислот, мікроорганізми можуть характеризуватися за допомогою таксономії та ідентифікуватися безпосередньо за наявністю (або відсутністю) специфічних протеїнів. В такому аналізі за основу може братися активність певного протеїну, наприклад, у ферментному аналізі, або відповідь спільно вирощуваних організмів, або ж просто наявність специфікованого протеїну (яка може визначатися, наприклад, за допомогою імунологічних методів, таких, як імунофлуоресцентне

забарвлення антитілами *in situ*).

Ферментні аналізи: для проведення такого аналізу в поживне середовище (наприклад, культури на мікротитрувальному планшеті) включають флуоресцентні або хромогенні аналоги субстрату, а потім проводять інкубацію і скринінг за продуктами реакції, ідентифікуючи таким чином культури за їхньою ферментативною активністю.

Відповідь при спільній культивуванні. В деяких варіантах здійснення даного винаходу активність ферменту, утримуваного мікробним ізолятом, можна визначати за відповіддю (або ступенем відповіді) спільно вирощуваного організму (наприклад, організму-репортера).

Для ідентифікації мікроорганізмів, вибраних і виділених з навколишнього середовища-джерела шляхом зв'язування щонайменше одного антитіла або однієї молекули, отриманої із антитіла, з певною молекулою, а точніше – з епітопом молекули, мікроорганізму, також можуть застосовуватися найрізноманітніші способи.

Антитіла до протеїнів мікроорганізмів можуть бути отримані за допомогою стандартних методик, описаних в багатьох літературних джерелах, наприклад (Harlow and Lane, (Antibodies, A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1988)). Визначити те, чи зв'язується даний агент по суті тільки з протеїном цільового мікроорганізму, можна легко за допомогою звичайних або адаптованих методик. Однією з таких методик, придатних для аналізу *in vitro*, є процедура вестерн-блотінгу, описана в багатьох відомих працях, включаючи (Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1988).

Більш короткі фрагменти антитіл (молекул, одержаних із антитіл, наприклад, FAbs, Fvs та одноланцюгові Fvs (SCFvs)) також можуть слугувати специфічно зв'язувальними агентами. Способи готування таких фрагментів є широко відомими.

Детекція антитіл, які зв'язуються з клітинами відповідно до даного винаходу, може здійснюватися за допомогою стандартних методів, наприклад, імуно-ферментного аналізу (ІФА), які дозволяють отримувати детекційний, наприклад, флуоресцентний або люмінесцентний, сигнал.

Виділені культури згідно з винаходом

Як більш детально описано в розділі ПРИКЛАДИ, авторами було виявлено декілька корисних для сільського господарства нових мікроорганізмів, здатних, наприклад, ефективно пригнічувати фузаріоз. Зазначені нові антагоністичні мікроорганізми, зокрема, є ефективним засобом для зменшення тяжкості захворювання фузаріозом і для інгібування росту гриба *Fusarium graminearum*, головного збудника фузаріозу у пшениці. Ці мікробні антагоністи були ідентифіковані із пулу, що складав приблизно 5000 мікробних штамів, одержаних зі зразків диких рослин, зібраних у кількох місцях на території Сполучених Штатів. Начальний відбір антагоністичного мікроорганізму проводився за здатністю мікроорганізмів пригнічувати розвиток патогену *F. graminearum* і його телеоморфу *Gibberella zeae* у випробуваннях *in vitro* на антагонізм. Відібрані мікробні антагоністи піддавалися біологічним випробуванням у теплиці на сіянцях пшениці, де проводилася інокуляція сіянців мікробними штамми, а потім – повторні інокуляції спор *F. graminearum*, на здатність цих мікробних штамів зменшувати тяжкість інфікування грибом і на їхню здатність зберігати вихід насіння. Відібрані таким чином антагоністичні мікроорганізми продемонстрували в тепличних випробуваннях свою ефективність у зменшенні тяжкості фузаріозу.

Крім того, таксономічний аналіз показав, що кожний із описаних тут антагоністичних мікроорганізмів має близьке споріднення або з бактеріальним родом *Microbacterium*, бактеріальним родом *Bacillus*, бактеріальним родом *Variovorax*, або з родом грибів *Mycosphaerella*.

Рід *Microbacterium*, типовий рід родини *Microbacteriaceae*, у загальному випадку належить до здатних пристосовуватися, грампозитивних, неспортивних, паличкоподібних бактерій, які первинно, на ранніх стадіях досліджень, були виділені на бактеріях, що продукують молочну кислоту. Члени роду *Microbacterium* спочатку широко характеризувалися своєю помітною теплостійкістю, наявністю в молочних продуктах і продукуванням невеликих кількостей L(+) молочної кислоти із глюкози. На противагу цим родам родини *Microbacteriaceae*, види якої відрізняються когерентним пептидоглікановим типом, вид *Microbacterium* має орнітин або лізин або у міжпептидному містку, або в позиції 3 пептидоглікану B-типу. В інших хемотаксономічних властивостях, таких, як ізопреноїдні хінони (МК-11, МК-12, МК-13), полярні ліпіди, жирні кислоти й основний склад ДНК, члени цієї родини демонструють звичайний діапазон різноманітності, що спостерігається в інших родах *Microbacteriaceae*. За результатами деяких таксономічних досліджень два бактеріальні роди *Microbacterium* і *Aureobacterium* можуть бути об'єднані. Сьогодні рід *Microbacterium* включає у себе щонайменше 33 види, які були виділені із широкого діапазону місць проживання, включаючи ґрунт, молочні продукти, рослинні гали, комах, і клінічні

зразки. Різноманітні аспекти їхньої екології, філогенії, таксономії, культивування й умов довготривалого зберігання нещодавно були підсумовані Євтушенко і Takeuchi (Evtushenko і Takeuchi, 2006). Абсолютно зрозуміло, що мікроорганізм роду *Microbacterium* може бути повністю надійно ідентифікований будь-якими таксономічними методами, описаними вище, включаючи хемотаксономічний аналіз пептидогліканів клітинної стінки та аналіз послідовностей методом вирівнювання з 16S рДНК, як описано в (Evtushenko і Takeuchi, 2006) і цитованих ними посиланнях, а також у посиланнях, цитованих в Прикладах 2-3 даного опису. Як більш детально розглянуто нижче, раніше повідомлялося про виявлення антагоністичної активності проти фузаріозу у декількох мікроорганізмів природного походження. Але про те, що таку антагоністичну активність має мікроорганізм роду *Mycobacterium*, до появи даного винаходу повідомлень не було. Крім того, до того часу авторам винаходу не були відомі способи і процеси використання бактеріального штаму роду *Mycobacterium* як агента біоборотьби для запобігання, інгібування або обробки проти розвитку патогену, який викликає фузаріоз.

*Bacillus* є родом грампозитивних варіабельних, споротвірних паличкоподібних бактерій. Аналогічно до інших родів, що асоціюються з ранньою історією розвитку мікробіології, таким, як *Pseudomonas* або *Vibrio*, близько 266 видових членів роду *Bacillus* спостерігаються всюди, і він широко визнаний як один із родів з найбільшим різноманіттям 16S і навколишнього середовища. Види *Bacillus* можуть бути обов'язковими аеробами або факультативними анаеробами, і давати позитивний тест на каталазу. Убіквіст за своєю природою, рід *Bacillus* включає у себе як вільноіснуючі, так і патогенні види. В тяжких навколишніх умовах ці клітини продукують овальні ендоспори, які тривалий час можуть перебувати у стані спокою. Ці характеристики були первинно притаманними даному роду. Але не всі такі види мають близьке споріднення, і багато з них перейшли до інших родів. Фактично було зроблено декілька спроб реконструювати філогенію цього роду. *Bacillus*-специфічні дослідження з найбільшим різноманіттям були проведені в роботі (Xu and Cote, Intl. J. of Syst. Evol. Microbiol. 53 (3): 695-704; 2003) з використанням 16S і ділянки ITS (внутрішнього транскрибованого спейсера), де автори поділили рід на 10 груп, які включають гніздові роди *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Marinibacillus* і *Virgibacillus*. Але згідно з більш пізнім дослідженням рід *Bacillus* містить дуже велику кількість гніздових таксонів і, особливо як в 16S, так і в 23S, він вважається парафілетичним до *Lactobacillales* (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* та ін.) завдяки *Bacillus coahuilensis* та ін., наприклад (Yarda et al, Syst. Appl. Microbiol. 31 (4): 241-250, 2008; Yarda et al, Syst. Appl. Microbiol. 33 (6): 291-299, 2010). Одна із клад, утворена видами *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* і *B. weihenstephanensis* відповідно до сучасних стандартів класифікації, повинна бути одиничного виду (з 97 % 16S ідентичністю), але з медичних міркувань їх вважають окремими видами. В додаток до методів таксономічного аналізу, описаних у Прикладах 2-3, філогенетичний і таксономічний аналізи видів *Bacillus* можуть проводитися за допомогою низки різноманітних методів, включаючи детально описані в роботі (Xu and Cote, 2003; Yarda et al., 2008; Yarda et al., 2010).

Рід *Variovorax* первинно був створений рекласифікацією роду *Alcaligenes paradoxus* на *Variovorax paradoxus* (Willems et al., 1991), який вважається типовим видом цього роду. *V. paradoxus* був широко досліджений як модель для нових біодеградаційних агентів, а також взаємодій мікроб-мікроб і мікроб-рослина. Іншими видами цього роду є *V. dokdonensis*, *V. soli* (Kim et al., 2006), і *V. boronicumulans* (Miwa et al., 2008). Види *Variovorax* дуже різняться з боку катаболізму і вступають у взаємовигідні взаємодії з іншими бактеріальними видами в багатьох процесах біологічного розкладання і, отже, є екологічно значущими і мають високий потенціал практичного застосування. Наприклад, ґрунтовий метанотроф тільки при спільному культивуванні зі штамом *V. paradoxus* демонструє високу афінність до метану (потужному тепличному газу) – особливість, яка зазвичай не спостерігається у лабораторних культур. Подібним способом було виявлено, що його близький родич *Variovorax* є центральним, нефотосинтетичним партнером в рамках фототрофної консорції "*Chlorochromatium aggregatum*". Деякі види роду *Variovorax* мають також здатність втручатися в комунікацію інших бактерій. Крім того, деякі види роду *Variovorax* можуть тісно взаємодіяти з другою біотою (наприклад, рослинами) в різноманітних екосистемах. Більше того, деякі види *Variovorax*, перебуваючи на площі за межами коріння рослини і/або усередині рослини, виявляли здатність активувати ріст рослини шляхом зниження рівнів етилену, репресії патогенезу, регульованого відчуттям кворуму, і підвищення стійкості до важких металів, що дуже корисно для фітореMediaції. В додаток до методів аналізу таксономії, описаних у Прикладах 2-3, філогенетичний і таксономічний аналізи виду *Variovorax* можуть проводитися всілякими методами, включаючи детально розглянуті в даному описі.

*Mycosphaerella* є дуже великим родом грибів з більш ніж 2000 найменуваннями видів і

щонайменше 500 видами, асоційованими з більш ніж 40 анаморфними родами (зокрема, *Cercospora*, *Pseudocercospora*, *Septoria*, *Ramularia* та ін.). Крім того, декілька тисяч анаморфів не мають телеморфів. Рід *Mycosphaerella* включає види, які є патогенами, сапробами, ендofітами, або мутуалістичними асоціаціями. Різноманітні аспекти їхньої екології, походження, таксономії, методів культивування й умов довготривалого зберігання нещодавно були описані в роботі (Crous et al., *Persoonia*, 23:119-146, 2009). Таксономічна ідентифікація мікроорганізмів роду *Mycosphaerella* може проводитися будь-яким із вищеописаних відповідних методів або їх комбінацією. Найбільш загальними із таких методів є аналіз послідовностей шляхом вирівнювання з послідовностями 16S рДНК і ділянками внутрішніх транскрибованих спейсерів, як описано, наприклад, в роботах (Crous et al., *Studies in Mycology*, 55:235-253, 2006; Crous et al., 2009, *supra*; Goodwin et al., *Phytopathology* 91: 648-658, 2001), а також методи, описані у Прикладах 2-3 нижче.

Депозити біологічних матеріалів

Очищені культури мікробних штамів, які згідно з їх ідентифікацією мають супресорну активність проти фузаріозу, були депоновані в колекцію агрокультур для досліджень (Agricultural Research Service Culture Collection, розміщену за адресою 1815 N. University Street, Peoria, IL 61604, USA (NRRL)) відповідно до "Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури" і нормативними положеннями, які з нього випливають (Budapest Treaty). Ці депозити розміщені під такими номерами:

Таблиця 1

Ідентифікація SGI штаму	Номер депозиту	Попередня таксономія видів
SGI-005-G08	NRRL -	<i>Microbacterium</i>
SGI-010-H11	NRRL 50471	<i>Mycosphaerella</i>
SGI-014-C06	NRRL B-50470	<i>Microbacterium</i>
SGI-014-G01	NRRL B-50469	<i>Variovorax</i>
SGI-015-F03	NRRL B-50760	<i>Bacillus</i>
SGI-015-H06	NRRL B-50761	<i>Bacillus</i>

Дані мікробні штами були депоновані з умовою забезпечення доступу до культури протягом перебування даної заявки в процесі розгляду і прийняття рішення щодо неї керівником Патентного відомства США згідно з 37 C.F.R. §1.14 і 35 U.S.C. §122. Ці депозити являють собою по суті чисті культури депонованих штамів. Доступ до депозитів забезпечується відповідно до патентних законодавств країн, де зареєстровані протилежні сторони даної заявки або їхні спадкоємці. Цілком зрозуміло, що доступ до депозитів не означає надання дозволу на практичне застосування предмета винаходу в порушення патентних прав, гарантованих державою.

Переважаючі мікроорганізми згідно з винаходом мають всі ідентифікаційні характеристики депонованих штамів і, зокрема, ідентифікаційні характеристики стосовно здатності пригнічувати розвиток фузаріозу, як указано в даному описі, і здатності пригнічувати розвиток патогену *Fusarium graminearum* та його телеоморфу *Gibberella zeae*. Зокрема, переважними мікроорганізмами згідно з винаходом є такі, які указані в депозитах мікроорганізмів, описаних вище, або є їх мутантами.

Мікробіологічні композиції

Мікробіологічні композиції згідно з винаходом, які містять виділені мікробні штами або їх культури, можуть мати найрізноманітніші форми, включаючи, зокрема, форми стаціонарної культури, суцільної культури, клітинного штаму, що зберігається, міцелію і/або гіфи (особливо, маточних гліцеринових розчинів), агарових стрічок, агарових комплексів у водно-гліцериновій суміші, висушених виморожуванням маточних розчинів і висушених маточних розчинів, таких, як ліофілізати або міцелії, висушені на фільтрувальному папері або на посівному зерні. Відповідно до визначення в даному описі, термін "виділена культура" або його граматичні еквіваленти означають, що дана культура являє собою поживну рідину, гранулу, зскрібок, висушений зразок, ліофілат або зріз (наприклад, гіфи чи міцелію), або основу, контейнер чи середовище, наприклад, планшет, папір, фільтр, матрицю, соломку, піпетку або вістря піпетки, волокно, голку, гель, тампон, пробірку, флакончик, частку та ін., і містить один тип організму. В даному винаході виділеною культурою мікробного антагоніста є поживна рідина або зскрібок, гранула, висушений препарат, ліофілат або зріз мікроорганізму, або основа, контейнер, або середовище, що містить мікроорганізм за відсутності інших організмів.

Даним винаходом пропонуються також композиції, які містять щонайменше один виділений

мікробний штам або його культуру згідно з винаходом і носій. Носієм може бути будь-який один носій або багато носіїв, що відповідає(-ють) різноманітним властивостям, таким, як підвищена стійкість, змочувальність, диспергованість та ін. Композиція згідно з винаходом може включати змочувальні агенти, такі, як природні або штучні поверхнево-активні речовини, якими можуть  
 5 бути неіонні або іонні поверхнево-активні речовини або їх комбінації. До складу композиції можуть входити також емульсії типу вода-в-маслі, які містять щонайменше один виділений мікроорганізм згідно з винаходом (U.S. Patent No. 7,485,451), включений тут шляхом посилання. Потрібні препарати можуть бути приготовані зі змочуваних порошків, гранул, гелів, агарових смужок або гранул, загусників і т. п., вміщених у мікрокапсули частинок і т. п., рідин, таких, як  
 10 водні плинні середовища, водні суспензії, емульсії типу вода-в-маслі та ін. Препарат може містити зернові або бобові продукти (наприклад, здрібнене зерно або боби, бульйон або муку, приготовані із зерна або бобів), крохмаль, цукор або олію. Носієм може бути сільськогосподарський носій. В деяких переважних варіантах здійснення винаходу носієм є насінина, а композиція може наноситися на цю насінину або покривати чи просочувати її.

15 В деяких варіантах здійснення винаходу сільськогосподарським носієм може бути ґрунт або середовище для вирощування рослин. Іншими придатними сільськогосподарськими носіями є вода, добрива, олії, зволожувачі та їх комбінації. В альтернативному варіанті сільськогосподарським носієм може бути твердий матеріал, такий, як інфузорна земля, суглинок, кремнезем, альгінат, глина, бентоніт, вермікуліт, насінневі капсули, інші рослинні і  
 20 тваринні продукти або їх комбінації, включаючи гранули, котуни і суспензії. Носіями можуть слугувати також суміші будь-яких вищезазначених інгредієнтів, такі, як, наприклад, песта (pesta: борошно і каолінова глина), агарові або борошняні гранули в суглинку, піску або глині та ін. Препарати можуть містити харчові джерела для культивованих організмів, такі, як ячмінь, рис або інші біологічні матеріали, наприклад, насіння, частини рослин, багаса цукрової тростини, лузга або черешки від обробки зерна, подрібнений рослинний матеріал (наприклад, "відходи від зберігання у сховищах") або деревина із будівельних відходів, тирса або дрібні волокна від повторної переробки паперу, тканих матеріалів або деревини. Фахівцям у даній галузі можуть  
 25 бути відомі також інші придатні матеріали для цих цілей.

В рідкій формі, наприклад, розчинів або суспензій, мікроорганізми можуть змішуватися або  
 30 суспендуватися у воді або у водних розчинах. Придатними рідкими розріджувачами або носіями при цьому є вода, водні розчини, нафтові дистилати й інші рідкі матеріали.

Тверді композиції можуть готуватися шляхом диспергування антагоністичних мікроорганізмів у відповідним чином розподіленому твердому носію або на ньому, тобто такому, як торф, пшениця, висівки, вермікуліт, глина, тальк, бентоніт, інфузорна земля, сукновальна глина,  
 35 пастеризований ґрунт і т. п. Якщо такі препарати використовуються у формі змочуваних порошків, то можуть застосовуватися біологічно сумісні диспергатори, такі, як неіонні, аніонні, амфотерні або катіонні диспергатори та емульсифікатори.

У переважному варіанті здійснення винаходу запропоновані композиції запобігають ураженню фузаріозом рослин і особливо зернових, таких, як пшениця, ячмінь, овес і кукурудза,  
 40 а при використанні їх в достатніх кількостях діють як мікробні антагоністи. Подібно до інших засобів біологічної боротьби ці композиції мають високий поріг безпеки, оскільки вони, як правило, не опалюють і не пошкоджують рослину.

Як детально показано в даному описі, боротьба з фузаріозом може здійснюватися шляхом нанесення однієї або більше мікробіологічних композицій згідно з винаходом на рослину-хазяїна  
 45 або на її частини. Ці композиції можуть наноситися в кількості, ефективній для зниження рівня фузаріозу порівняно з його рівнем у необробленому контролі. Активні компоненти при цьому використовуються в концентрації, достатній для інгібування розвитку цільового фітопатогену, коли вони прикладені до зернової культури. Для фахівця повинно бути очевидним, що ефективні концентрації можуть бути різними і залежати від таких факторів: (а) типу рослини або  
 50 сільськогосподарського продукту; (b) фізіологічного стану рослини або сільськогосподарського продукту; (c) концентрації патогенів, які вражають рослину або сільськогосподарський продукт; (d) типу хвороби, що вражає рослину або сільськогосподарський продукт; (e) погодних умов (наприклад, температури, вологості); і (f) стадії розвитку хвороби рослини. Згідно з винаходом типові величини концентрації знаходяться вище рівня  $1 \times 10^2$  КУО/мл носію. Переважні рівні  
 55 концентрації знаходяться в інтервалі приблизно від  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^9$  КУО/мл, а ще переважніше – в інтервалі від  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  КУО/мл. Більш переважним є інтервал концентрації приблизно від 35 до 150 мг сухої мікробної маси на грам носію (сухого препарату) або на мілілітр носію (рідка композиція). У твердих препаратах швидкість постачання повинна регулюватися так, щоб отримувати кількість життєздатних клітин на одиницю площі поверхні  
 60 тканини рослини, порівняну з отримуваним від застосування вищезазначених концентрацій

рідкої обробки. Як правило, агенти біологічного методу боротьби згідно з винаходом є біологічно ефективними, коли вони постачаються в концентрації вище  $10^6$  КУО/г (колонієутворювальних одиниць на грам), переважно – вище  $10^7$  КУО/г, ще переважніше – в концентрації  $10^8$  КУО/г, і найпреважніше – в концентрації  $10^9$  КУО/г.

В деяких варіантах здійснення винаходу кількість одного або більше агентів біологічної боротьби в мікробній композиції згідно з винаходом може варіювати залежно від кінцевого препарату, а також розмірів і типу рослини або використовуваного насіння. В переважному варіанті один або більше агентів біологічної боротьби в мікробній композиції використовується в кількості приблизно від 2 % (мас.) до 80 % (мас.) від всієї кількості препарату. В переважному варіанті один або більше агентів біологічної боротьби в мікробній композиції використовується в кількості приблизно від 5 % (мас.) до 65 % (мас.), а в найбільш переважному – приблизно від 10 % (мас.) до 60 % (мас.) від всієї кількості препарату.

Мікробіологічні композиції згідно з винаходом можуть наноситися на пшеницю або іншу зернову культуру за допомогою найрізноманітніших, добре відомих фахівцям способів, таких, як опилання, створення покриття, вливання, втирання, катання, протруювання зануренням, розпилення, обтирання щіткою та інші придатні способи, які не викликають суттєвих ушкоджень у пшениці або інших зернових культур при їх обробці. Особливо прийнятним є спосіб розпилення.

Композиції згідно з винаходом, як правило, є хімічно інертними. Тому вони є сумісними по суті з будь-якими іншими компонентами схеми розпилення. Вони можуть використовуватися також у сполученні з біологічно сумісними пестицидними активними агентами, наприклад, з гербіцидами, нематоцидами, фунгіцидами, інсектицидами і т. п. Вони можуть використовуватися також у сполученні з субстанціями регуляції росту рослин, такими, як добрива, регулятори росту рослин і т. п., якщо тільки такі сполуки або субстанції є біологічно сумісними.

Якщо пестициди або фунгіциди використовуються в їх комерційних препаратах і в формах, приготованих із цих препаратів, то активні мікробні антагоністи і композиції відповідно до даного винаходу можуть, тим більше, використовуватися разом з ними у формі синергічної суміші. Компоненти такої суміші, будучи синергістами, підвищують ефективність активної композиції без необхідності додавати в суміш спеціальні синергісти.

Використовувані як пестициди в їх комерційних препаратах і в формах, приготованих із цих препаратів, активні мікробні антагоністи і композиції відповідно до даного винаходу можуть, тим більше, використовуватися разом з ними у формі суміші з інгібіторами, які зменшують деградацію активних композицій після їх застосування в місці росту рослини, на поверхні частин рослини або в її тканинах.

Активні мікробні антагоністи і композиції згідно з винаходом, у своєму маточному стані або в препаратах, можуть використовуватися також у формі суміші з відомими акарицидами, бактерицидами, фунгіцидами, інсектицидами, мікробіцидами, нематоцидами, пестицидами або їх комбінаціями, наприклад, з метою розширення їхнього спектра дії або для запобігання розвитку стійкості цим шляхом. У багатьох випадках синергетика дає позитивний результат, тобто активність такої суміші може перевищувати активність її індивідуальних компонентів. Суміш з іншими відомими активними сполуками, такими, як добрива, регулятори росту, захисні агенти і/або хімікалії сигналізації, також охоплюються об'ємом винаходу.

У переважному варіанті здійснення винаходу композиції можуть містити також щонайменше один хімічний або біологічний пестицид. Кількість щонайменше одного хімічного або біологічного пестициду, використовуваного в даній композиції, може варіювати залежно від кінцевого препарату, а також розмірів оброблюваної рослини і насіння. В переважному варіанті кількість щонайменше одного використовуваного хімічного або біологічного пестициду складає приблизно від 0,1 % (мас.) до 80 % (мас.) від всієї кількості препарату. У ще переважнішому варіанті кількість щонайменше одного використовуваного хімічного або біологічного пестициду складає приблизно від 1 % (мас.) до 60 % (мас.), а в найбільш переважному – приблизно від 10 % (мас.) до 50 % (мас.).

У даному винаході можуть використовуватися будь-які пестициди, відомі фахівцям у даній галузі. Це можуть бути, наприклад, хімічні пестициди, які належать до класів карбаматів, органофосфатів, хлорорганічних сполук і піретроїдів. Винаходом передбачені також хімічні агенти біоборотьби, такі, як, наприклад: беноміл; боракс; каптафол; каптан; хлорталоніл; мідевмісні препарати; препарати, які містять дихлон, дихлоран, йод, цинк; фунгіциди, що інгібують біосинтез ергостеролу, такі, як, наприклад, бластидин, цимоксаніл, фенаримол, флузилазол, фолпет, імазаліл, іпордіон, манеб, манокцеб, металаксил, оксикарбоксин, міклобутаніл, окситетрациклін, ПХНБ (пентахлорнітробензол), пентахлорфенол, прохлораз, пропіконазол, хінометіонат, арсеніт натрію, натрій DNOC (динітроокрезол), натрій гіпохлорит,

натрій фенолфенат, стрептоміцин, сірка, тебуконазол, тербутразол, тіабендозол, тіофанат-метил, триадимефон, трициклазол, трифорин, валідиміцин, винклозолін, цинеб і цирам. В композиціях згідно з винаходом можуть використовуватися найрізноманітніші інсектицидні сполуки, включаючи, наприклад, зазначені в заявці (U.S. Pat. Appl. No. 20110033432A1).

Мікробіологічні композиції згідно з винаходом в переважному варіанті містять щонайменше один біологічний пестицид. Типовими біологічними пестицидами, які є придатними для використання згідно з винаходом і можуть входити в мікробіологічну композицію згідно з винаходом для запобігання фітопатогенній хворобі, є мікроби, тварини, бактерії, гриби, генетичний матеріал, рослина і природні продукти живих організмів. У цих композиціях мікроорганізм згідно з винаходом виділяється перед готуванням препарату додатковим організмом. У композиції з антагоністичними мікроорганізмами згідно з винаходом можуть використовуватися мікроби, наприклад, видів *Ampelomyces*, *Aureobasidium*, *Bacillus*, *Beauveria*, *Candida*, *Chaetomium*, *Cordyceps*, *Cryptococcus*, *Dabaryomyces*, *Erwinia*, *Exophila*, *Gliocladium*, *Mariannaea*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pichia*, *Pseudomonas*, *Sporobolomyces*, *Talaromyces* і *Trichoderma*, де особливо переважними є грибні штами роду *Muscodor*. Особливо прийнятним є також використання мікробіологічних композицій відповідно до даного винаходу в комбінації з мікробними антагоністами, описаними в (US Patent No. 7,518,040; US Patent No. 7,601,346; US Patent No. 6,312,940).

Як приклади грибів, які можуть використовуватися в комбінаціях з мікробними антагоністами і композиціями згідно з винаходом, можна назвати види *Muscodor*, *Aschersonia aleyrodis*, *Beauveria bassiana* ("білий мускарин"), *Beauveria brongniartii*, *Chladosporium herbarum*, *Cordyceps clavulata*, *Cordyceps entomorrhiza*, *Cordyceps fads*, *Cordyceps gracilis*, *Cordyceps melolanthae*, *Cordyceps militaris*, *Cordyceps myrmecophila*, *Cordyceps ravenelii*, *Cordyceps sinensis*, *Cordycepshecocephala*, *Cordyceps subsessilis*, *Cordyceps unilateralis*, *Cordyceps variabilis*, *Cordyceps washingtonensis*, *Culicinomyces clavosporus*, *Entomophaga grylli*, *Entomophaga maimaiga*, *Entomophaga muscae*, *Entomophaga praxibulli*, *Entomophthora plutettiae*, *Fusarium lateritium*, *Hirsutella citriformis*, *Hirsutella thompsoni*, *Metarhizium anisopliae* ("зелений мускарин"), *Metarhizium flaviride*, *Muscodor albus*, *Neozygitesfloridana*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Pandora neoaphidis*, *Tolypocladium cylindrosporum*, *Verticillium lecanii*, *Zoophtora radicans*, і мікоризні види грибів, наприклад, *Laccaria bicolor*. Придатними можуть бути також інші мікопестицидні види, відомі фахівцям у даній галузі.

Даним винаходом пропонуються також способи лікувальної обробки рослини шляхом нанесення будь-якого зі звичайних препаратів в ефективній кількості або на ґрунт (тобто, в борозни), на частини рослини (тобто обприскуванням) або на насінини до їх посадки (тобто нанесенням покриття або протруюванням). Звичайними препаратами можуть бути розчини, концентрат, який емульсифікується, змочувані порошки, суспензійний концентрат, розчинні порошки, гранули, суспензійно-емульсійний концентрат, природні і штучні матеріали, просочені активною сполукою, і дуже дрібні полімерні капсули з керованим вивільненням. У деяких варіантах здійснення винаходу композиції для біологічної боротьби готують у порошках, які надходять у продаж або в препаратах, готових до вживання, або змішуються один з одним під час їх вживання. В обох випадках порошок може додаватися в ґрунт перед посадкою або під час посадки. В альтернативному варіанті агент біоборотьби і агент боротьби з комахою можуть бути обидва, або один із них, рідкими препаратами і змішуватися один з одним під час лікувальної обробки. Для фахівця зрозуміло, що ефективна кількість композиції згідно з винаходом залежить від кінцевого препарату композиції, а також від розмірів оброблюваних рослин або насіння.

Залежно від кінцевого препарату і способу його нанесення композиція згідно з винаходом може містити у собі одну або більше придатних добавок. Такими добавками в даній композиції можуть бути, наприклад, адгезиви, такі, як карбоксиметилцелюлоза і природні або штучні полімери у формі порошків, гранул або латексів, такі, як гуміарабік, хітин, полівініловий спирт і полівінілацетат, а також природні фосфоліпіди, такі, як цефаліни і лектицини, і штучні фосфоліпіди.

В одному із переважних варіантів здійснення винаходу мікробіологічні композиції готують в єдиному стабільному розчині, емульсії або суспензії. Для готування розчинів активні хімічні сполуки (тобто агенти біоборотьби з шкідниками) перед додаванням агента біоборотьби, як правило, розчиняють у розчинниках. Придатними рідкими розчинниками можуть бути, наприклад, ароматичні речовини із нафти, такі, як ксилол, толуол або алкілнафталіни, аліфатичні вуглеводні, такі, як циклогексан або парафіни, наприклад, нафтові фракції, мінеральні масла і рослинні олії, спирти, такі, як бутанол або гліколь, а також їхні прості і складні ефіри, каетони, такі, як метилетилкетон, метилізобутилкетон або циклогексанон, сильні



полярні розчинники, такі, як диметилформамід і диметилсульфоксид. Рідким середовищем для емульсії або суспензії є вода. В одному із варіантів здійснення винаходу агент хімічної боротьби й агент біологічної боротьби суспендуються в рідинах окремо один від одного і змішуються під час вживання. У переважному варіанті готування суспензії агент боротьби з комахами і біологічний агент об'єднуються у препараті, готовому до вживання, з терміном зберігання щонайменше два роки. При вживанні рідина може розпилятися або наноситися у формі плівки за допомогою розпилювача, або в борозну під час посіву культури. Рідка композиція може вводиться в ґрунт перед проростанням насіння або безпосередньо в ґрунт у контакт з корінням за допомогою різноманітних засобів і методів, добре відомих в даній галузі, включаючи, наприклад, крапельне зрошення, розбризкування, інжекцію в ґрунт або просочування ґрунту.

У разі потреби можуть додаватися стабілізатори і буфери, включаючи солі лужних і лужноземельних металів та органічні кислоти, такі, як лимонна кислота й аскорбінова кислота, неорганічні кислоти, такі, як соляна кислота або сірчана кислота. Можуть додаватися також біоциди, наприклад, формальдегіди або агенти, які виділяють формальдегід, і похідні бензойної кислоти, такі, як п-гідроксибензойна кислота.

Препарати для нанесення покриття на насіння

В деяких особливо переважних варіантах здійснення винаходу склад композиції для біоборотьби згідно з винаходом розраховують для лікувальної обробки насіння. Композиція для лікувальної обробки насіння містить щонайменше один агент боротьби з комахами і щонайменше один агент біологічної боротьби. Передбачається, що насіння можуть по суті рівномірно покриватися одним або більше шарами описаних тут композицій для біоборотьби, використовуючи для цього звичайні методи змішування і розпилення або їх комбінації і спеціально сконструйовані і виготовлені пристрої для створення покриття, які забезпечують необхідні точність, безпеку й ефективність нанесення продуктів обробки на насіння. В таких пристроях використовуються різноманітні технології створення покриття, наприклад, роторного типу, барабанного типу, методи псевдозрідженого шару, фонтануючого шару, роторного розпилення або їх комбінації. Рідка обробка насіння відповідно до даного винаходу може здійснюватися за допомогою або центрифугального дискового "розпилювача", або спрею, що забезпечує рівномірний розподіл покриття на насіннях в умовах їх руху через профіль розпилення. Після цього насіння в переважному варіанті перемішують або ворують протягом деякого часу з метою додаткового вирівнювання розподілу і сушать. Перед нанесенням покриття із композиції згідно з винаходом насіння може піддаватися праймуванню (стимуляції проростання) для підвищення рівномірності проростання і випускання сходів. В альтернативному варіанті сухий порошковий препарат може подаватися в певних дозах на насіння у процесі перемішування і перемішуватися з ними до отримання однорідного розподілу.

В іншому аспекті згідно з винаходом пропонується насіння, оброблене мікробіологічними композиціями згідно з винаходом. В одному із варіантів щонайменше частина поверхні насіння є покритою мікробіологічною композицією згідно з винаходом. В одному зі специфічних варіантів оброблені мікроорганізмами насіння мають концентрацію спор або мікробних клітин приблизно від  $10^6$  до  $10^9$  на одну насінину. Насіння можуть мати також більшу кількість спор або мікробних клітин, наприклад,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  або  $10^{12}$  спор на насінину. Мікробні спори і/або клітини можуть покривати насіння у вільному стані або, переважно, наноситися на них у попередньо приготіваній рідкій або твердій композиції. Тверда композиція, яка містить мікроорганізми, може готуватися шляхом перемішування твердого носія з суспензією спор доти, поки тверді носії не будуть просочені цією споровою або клітинною суспензією. Після цього суміш просушують, отримуючи в результаті потрібні частки.

В деяких інших варіантах здійснення винаходу передбачається, що тверді або рідкі композиції для біоборотьби, крім того, містять функціональні агенти, здатні захищати насіння від шкідливої дії селективних гербіцидів, таких, як активоване вугілля, поживні речовини (добрива) й інші агенти, здатні покращувати проростання і якість продукту.

Відомі способи і композиції для нанесення покриття на насіння можуть бути особливо корисними, коли вони модифікуються шляхом додавання відповідно до одного із варіантів здійснення даного винаходу. Такі придатні для застосування способи і пристрої для нанесення покриття описані, наприклад, в (U.S. Pat Nos. 5,918,413; 5,554,445; 5,389,399; 4,759,945; 4,465,017). Всілякі композиції для створення покриття на насіннях описані, наприклад, в (U.S. Pat. Appl. Nos. US20110033432, US20100154299, U.S. Pat. Nos. 5,939,356; 5,876,739, 5,849,320; 5,791,084, 5,661,103; 5,580,544, 5,328,942; 4,735,015; 4,634,587; 4,372,080, 4,339,456; і 4,245,432).

У препарати для обробки насіння, які містять композиції згідно з винаходом, можуть вводитися найрізноманітніші добавки. Такими добавками можуть бути, наприклад, сполучні

матеріали, які складаються із адгезивного полімеру, що може бути природним або штучним і не повинен чинити фітотоксичної дії на оброблюване покриттям насіння. Сполучний матеріал може вибиратися серед: полівінілацетатів; співполімерів полівінілацетатів; співполімерів етиленвінілацетату (ЕВА); полівінілового спирту; співполімерів полівінілового спирту; целюлози, включаючи етилцелюлозу, метилцелюлозу, гідроксиметилцелюлозу, гідроксипропілцелюлозу і карбоксиметилцелюлозу; полівінілпіролідонів; полісахаридів, включаючи крохмаль, модифікований крохмаль, декстрини, мальтодекстрини, альгінат і хітозани; жирів; рослинних олій; протеїнів, включаючи желатин і зеїни; гуміарабіків; шелаків; вініліденхлориду і співполімерів вініліденхлориду; лігносульфонатів кальцію; акрилових співполімерів; полівінілакрилатів; поліетиленоксиду; акриламідних полімерів і співполімерів; полігідроксіетилакрилату, метилакриламідних мономерів; і поліхлоропрену.

Можуть використовуватися будь-які барвники, включаючи органічні хромофори, які належать до класу нітросо; нітро; азо, включаючи моназо, бізазо і поліазо; акридин, антрахінон, азин, дифенілметан, індамін, індофенол, метин, оксазин, фталоціанін, тіазин, тіазол, триарилметан, ксантен. Серед інших припустимих добавок можна назвати слідові поживні добавки, такі, як солі заліза, марганцю, бору, міді, кобальту, молібдену і цинку. Для утримування цих речовин на поверхні насіння можуть додаватися полімерні або інші пілоподібні засоби.

В деяких специфічних варіантах здійснення винаходу нанесене покриття, окрім мікробних клітин або спор, може містити також шари адгезиву. Адгезив повинен бути нетоксичним, біорозкладаним і клейким. Придатними для нього матеріалами є, наприклад: полівінілацетати; співполімери полівінілацетатів; полівінілові спирти; співполімери полівінілових спиртів; целюлози, такі, як метилцелюлоза, гідроксиметилцелюлоза і гідроксиметилпропілцелюлоза; декстрини; альгірати; цукри; меляси; полівінілпіролідони; полісахариди; протеїни; жири; олії; гуміарабіки; желатини; сиропи; і крохмалі. Придатними можуть бути також матеріали, описані в (U.S. Pat. No. 7,213,367 і U.S. Pat. Appln. No. US20100189693).

До препарату для обробки насіння також можуть входити різноманітні добавки, такі, як адгезиви, диспергатори, поверхнево-активні речовини, поживні і буферні інгредієнти. Звичайними добавками у препарат для обробки насіння є, наприклад, агенти для нанесення покриття, змочувальні агенти, буферні агенти і полісахариди, а також щонайменше один придатний для сільськогосподарства носій, такий, як вода, тверді тіла або сухі порошки. Сухі порошки можна готувати із різноманітних матеріалів, таких, як карбонат кальцію, гіпс, вермікуліт, тальк, гумус, активоване вугілля і всілякі сполуки фосфору.

В одному із варіантів здійснення винаходу композиція для створення покриття на насінні може містити щонайменше один наповнювач, який є органічним або неорганічним, природним або штучним компонентом, з яким об'єднуються активні компоненти для полегшення їх нанесення на насіння. При цьому бажано, щоб наповнювач був інертним, твердим матеріалом, таким, як глина, природний або штучний силікат, кремнезем, смола, віск, тверде добриво (наприклад, сіль амонію), природний або штучний мінералом, таким, як каолін, глина, тальк, вапно, кварц, атапульгіт, монтморилоніт, бентоніт або інфузорна земля, або штучним мінералом, таким, як кремнезем, глинозем або силікат, із яких особливо придатними є силікати алюмінію або магнію.

Препарат для обробки насіння може містити, крім того, один або більше таких інгредієнтів: інші пестициди, включаючи сполуки, що діють тільки під землею; фунгіциди, такі, як каптан, тирам, метаксил, флудіоксоніл, оксацил і ізомери кожного із цих матеріалів, і т. п.; гербіциди, включаючи сполуки, вибрані серед гліфосфату, карбаматів, тіокарбаматів, ацетамідів, триазинів, динітроанілінів, гліцеринових ефірів, піридазинонів, урацилів, фенокси, сечовин і бензойних кислот; гербіцидні захисні агенти, такі, як бензоксазин, похідні бензгідролу, N, N-діалілдіхлорацетамід, різноманітні сполуки дигалоацилів, оксазолідинілів і тіазолідинілів, етанон, сполуки нафталевих ангідридів і похідні оксимів; добрива; та агенти біобороти – інші природні або рекомбінантні бактерії і гриби родів *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Glomus*, *Gliocladium* і мікоризні гриби. Ці інгредієнти можуть додаватися у формі окремого шару на насінні або, в альтернативному варіанті, як частини композиції для покриття насіння згідно з винаходом.

У переважному варіанті кількість нової композиції або інших інгредієнтів, використовуваних для обробки насіння, не повинна інгібувати проростання насіння або викликати у них фітотоксичні ушкодження.

Оброблені мікроорганізмами насіння можуть бути додатково покриті плівкою поверх нанесеного на них покриття для захисту останнього. Такі поверхневі покриття є добре відомими і можуть наноситися методами псевдозрілого шару і барабану, що обертається.

У принципі будь-яку насіння, здатну проростати й утворювати рослину, сприйнятливую до дії

нематодів і/або патогенних грибів, можна піддавати обробці відповідно до даного винаходу. Придатними для цього є насіння зернових культур, кава, капустяних культур, волокнистих культур, квітів, фруктів, бобових, олійних культур, дерев, бульбоплодів, овочів, а також інших рослин однодольних і дводольних видів. Переважним для нанесення на нього покриття є насіння, наприклад, бобових, моркви, кукурудзи, бавовни, трав, салату, арахісу, перцю, картоплі, рапсу, рису, жита, сорго, сої, цукрового буряку, соняшнику, тютюну і томатів. Найбільш придатними для покриття композиціями згідно з винаходом є насіння ячменю та пшениці (ярової або озимої пшениці).

В іншому аспекті даного винаходу пропонується нова зернова рослина, створена шляхом штучного введення мікробного ендосфиту згідно з винаходом у зернову рослину, що не містить ендосфитних мікроорганізмів. В деяких варіантах здійснення даного аспекту мікробним ендосфитом, уведеним в зернову рослину, може бути ендосфитний антагоніст, який має супресорну активність проти фузаріозу або збудника фузаріозу. Крім того, ендосфитним антагоністом, уведеним у зернову рослину, може бути грибний штам SGI-010-H11. Відомо багато способів, які продемонстрували свою ефективність у введенні мікробного ендосфиту в зернові трави. Приклади таких способів можна знайти в (U.S. Pat. Appl. No. 20030195117A1, U.S. Pat. Appl. No. 20010032343A1, U.S. Pat. No. 7,084,331). Для фахівця в даній галузі цілком зрозуміло, що в культивуванні нової зернової рослини згідно з винаходом можуть використовуватися багато із вищезгаданих способів.

Після штучної інфікації бажано ДНК виділеного ендосфитного антагоніста ампліфікувати за допомогою ПЛР-реакції, і підтвердити його антагоністичність шляхом проведення досліджень гомології для ампліфікованої ДНК. Далі бажано у вищезгаданий ендосфитний антагоніст ввести чужорідний ген, що експресує засіб, який ідентифікується, і підтвердити наявність колонізації даного ендосфитного антагоніста, що інфікує рослину, вищезгаданим засобом, що ідентифікується, використовуючи цей чужорідний ген.

Приготування композиції для біоборотби відповідно до даного винаходу

Культури мікробних антагоністів можуть бути приготовані для використання в композиціях біоборотби згідно з винаходом за допомогою відомих методів стандартної статичної сушки і рідкої ферментації. Культивування, як завжди, проводять у біореакторі.

Біореактором називається будь-який пристрій, що забезпечує умови біологічно активного навколишнього середовища. У контексті даного опису біореактором є посудина, в якій можна вирощувати мікроорганізми, включаючи мікробні антагоністи згідно з винаходом. Біореактор може мати будь-яку форму і розміри, придатні для культивування мікроорганізмів. Біореактор може мати розміри від 10 мл до літрів і кубічних метрів. Він може бути виконаний із нержавіючої сталі або будь-якого іншого придатного матеріалу. Біореактор може бути періодичної дії або безперервної дії (наприклад, з безперервним перемішуванням). За своїм типом біореактор може належати до хемостатів, які використовуються в мікробіології для вирощування і збору бактерій. Серед придатних комерційних біореакторів можна назвати, наприклад, апарати фірми Bioreactor System Design, Asenjo & Merchuk, CRC Press, 1995.

Для незначних потреб, наприклад, для тестування і розробки нових процесів і процесів, які не можуть бути перетворені на безперервні, можна використовувати біореактор періодичної дії.

Мікроорганізми, вирощувані в біореакторі, можна суспендувати або іммобілізувати. Культивування в біореакторі у загальному випадку здійснюється в аеробних умовах при відповідних температурах і рН. Для отримання організмів згідно з винаходом культивування клітин здійснюють при температурах в інтервалі 5-37 °C, в якому переважними є температури в інтервалах 15-30 °C, 15-28 °C, 20-30 °C і 15-25 °C. Величина рН поживного середовища може варіювати від 4,0 до 9,0, але переважним є робочий інтервал від трохи кислого до нейтрального з рН 4,0 – 7,0, або 4,5 – 6,5, або рН 5,0-6,0. Як правило, максимальний клітинний вихід отримують в період 20-72 годин після інокуляції.

Абсолютно зрозуміло, що оптимальні умови культивування антагоністів згідно з винаходом залежать від конкретного штаму. Але, головні інгредієнти та умови живлення можна буде визначити, виходячи із умов, використовуваних у процесі селекції, і загальних вимог для більшості мікроорганізмів. Мікробні антагоністи, як правило, повинні вирощуватися в аеробних рідких культурах на середовищі, що містить джерела вуглецю, азоту і неорганічних солей, які можуть асимілюватися мікроорганізмом і сприяти ефективному росту клітин. Переважними джерелами вуглецю є гексози, такі, як глюкоза. Але їх можуть замінити інші джерела, що легко асимілюються, такі, як амінокислоти. Джерелами азоту в процесі вирощування можуть слугувати різноманітні неорганічні і білкові матеріали. Переважними джерелами азоту є амінокислоти і сечовини, але можуть використовуватися також газоподібний аміак, неорганічні нітрати і солі амонію, вітаміни, чисті поживні речовини, піримідини, дріжджовий екстракт,

м'ясний екстракт, протеоз пептону, соєве борошно, гідролізати казеїну, фільтрат барди і т. п. Серед неорганічних мінералів, які можуть уводитися в поживне середовище, можна назвати звичайні солі, здатні постачати іони кальцію, цинку, заліза, марганцю, магнію, міді, кобальту, калію, натрію, молібдату, фосфату, сульфату, хлориду, борату та ін. Переважним поживним середовищем для грибних антагоністів є рідка картопляна декстроза, а для бактеріальних штамів – бульйон премікс R2A.

В даному описі указані і включені шляхом посилань різноманітні

Джерела інформації, серед яких, наприклад, статті із наукових журналів, патентні документи, навчальні посібники та адреси інтернет-сторінок. Посилання на ці джерела слугують виключно для висвітлення загального рівня техніки на час подачі заявки. Поряд з тим, що вміст та ідеї, висловлені в усіх і кожному із цих джерел, можуть стати основою і використовуватися для реалізації і застосування варіантів здійснення винаходу на практиці, жодні із обговорень і коментаріїв в тому чи іншому джерелі інформації не можуть вважатися визнанням того, що вони в широкому сенсі приймаються тут як загальноприйнятий погляд в даній галузі.

Поданий тут опис загальних способів має виключно ілюстративне спрямування. Абсолютно очевидними можуть бути інші альтернативні способи і варіанти здійснення винаходу, які випливають із цього опису і також лежать в межах ідеї і сфери застосування даної заявки.

Нижче наведені приклади, які також слугують лише для ілюстрації даного винаходу і не мають жодних його обмежень.

## ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1. Опис антагоністичних мікроорганізмів, здатних пригнічувати розвиток *Fusarium graminearum* і *Gibberella zeae*, які є збудниками фузаріозу

У даному прикладі описаний високопродуктивний процес збору і скринінгу мікроорганізмів-кандидатів, розроблений фірмою Synthetic Genomics, Inc. для виділення штамів мікроорганізмів, які мають супресорну активність проти збудників фузаріозу і, зокрема, проти *Fusarium graminearum*. Нові мікробні антагоністичні штами були виділені зі зразків рослинних тканин, зібраних у кількох місцях на території Сполучених Штатів. Із тканин коріння рослин, зібраних у заповіднику Eagle Peak Preserve поблизу селища Julian, шт. Каліфорнія (США), були виділені бактеріальні штами SGI-014-C06, SGI-014-G01, SGI-015-F03 і SGI-015-H06. Із тканин стеблин двох зразків різноманітних рослин, зібраних в San Elijo Lagoon, Encinitas, CA, були виділені грибний штам SGI-010-H11 і бактеріальний штам SGI-005-G08.

Виділення цих мікроорганізмів проводили таким способом. Спочатку для виділення бактеріального штаму кореневої тканини рослини опромінювали ультразвуком і потім розбавляли на планшетах з 2xYT (дріжджовим екстрактом з триптоном) і з безазотистим агаровим середовищем. Після цього за морфологічними характеристиками відбиралися індивідуальні колонії, які кожен окремо культивували в рідкому бульйонному середовищі. Для виділення грибів рослинну тканину спочатку піддавали поверхневій стерилізації шляхом занурення в 70 % етанол і короткотермінової обробки у полум'ї. Потім тканину розсікали і поміщали на картопляно-декстрозний агар (КДА), після чого її інкубували при кімнатній температурі. Коли починав спостерігатися ріст міцелію, сегмент міцеліальної культури переносили на другий КДА-планшет. Штами мікроорганізмів виділяли, очищували і зберігали при -80 °C у 15 % гліцерині для бактеріальних штамів і на висушеному насінні ячменю для грибних штамів.

У виділених штамів мікроорганізмів визначали здатність пригнічувати ріст міцелію *F. graminearum* у випробуваннях на антагонізм *in vitro*, які проводили на агарових планшетах із картопляно-декстрозним агаровим (КДА) поживним середовищем відповідно до методики високоєфективного скринінгу з невеликими модифікаціями, описаної в заявці (U.S. Pat. Appl. No. US20120107915A1), включеної тут шляхом посилання. Коротко, виділені штами мікроорганізмів вирощували на трипсин-соєвому бульйонному агарі (ТСБА/5) з однією п'ятою від нормальної концентрацією протягом 24 год. перед вживанням. Конідіальний інокулят *F. graminearum* NRRL-5883 продукували шляхом гіфального прищеплювання грибної колонії, яка активно росла, і перенесення гіфальних ниток у КДА агарове середовище. Після інкубування планшетів протягом 7 днів при 25 °C з 12 год./день фотоперіодом конідії відмивали від КДА-планшетів за допомогою слабого фосфатного буферу (0,004 % фосфатний буфер, pH 7,2 з 0,019 %  $MgCl_2$ ). Потім суспензію конідій *F. graminearum* в слабкому фосфатному буфері ( $1 \times 10^5$  конідій/мл) одразу розподіляли по поверхні агару, і потім планшети інкубували при 25 °C протягом 48-72 год. Для ініціації тесту на антагонізм, клітини виділених мікробних штамів точковим способом інокулювали на однакових відстанях усередині периметра планшета. Через п'ять днів штами визначали як антибіоз-позитивні, коли за периметром мікробних колоній візуально спостерігалася світла ділянка, на якій був відсутній міцеліальний ріст.

За допомогою вищеописаної методики було виділено і проаналізовано більше 4000 мікробних штамів. Серед них шість штамів виявляли здатність суттєво пригнічувати міцеліальний ріст *F. graminearum* NRRL-5883 на КДА-середовищі. Ці нові мікробні антагоністи отримали такі найменування: SGI-005-G08, SGI-010-H11, SGI-014-C06, SGI-014-G01, SGI-015-F03 і SGI-015-H06.

Вищезазначені нові мікробні антагоністи піддавалися також тестуванню на антагонізм за їхньою здатністю пригнічувати ріст грибного патогену *Gibberella zeae*, який є телеоморфним видом гриба *Fusarium graminearum*. Всі використовувані при цьому методики були ідентичними вищеописаним, за винятком того, що тестованим таким способом патогенним штамом був штам гриба *Gibberella zeae*. Серед цих шести мікробних антагоністів чотири штами SGI-010-H11, SGI-014-C06, SGI-015-F03 і SGI-015-H06 продемонстрували здатність суттєво пригнічувати міцеліальний ріст гриба *Gibberella zeae*.

#### ПРИКЛАД 2. Екстрагування ДНК. Секвенування і таксономія

Лізис грибних клітин та отримання інформації щодо послідовності ITS-5.8S рДНК

Грибну біомасу переносили на 96-лунковий ПЛР-мікропланшет, який містив 50 мкл 2 х буферу для лізису (100 мМ Tris HCL, pH 8,0, 2 мМ EDTA, pH 8,0, 1 % SDS, 400 мкг/мл протеїнази K). Лізис проводили в таких умовах: 55 °C протягом 60 хвилин, 94 °C протягом 4 хвилин. Аліквоту лізисного продукту використовували як джерело матричної ДНК для ПЛР-ампліфікації. Послідовність ITS-5.8S рДНК ампліфікували за допомогою ПЛР-реакції з двома праймерами M13-ITS1 (SEQ ID NO:15) і ITS4 M13-хвіст (SEQ ID NO:16).

Для ампліфікації ділянки ITS-5.8S рДНК кожену ПЛР-суміш готували в реакційній суміші з кінцевим об'ємом 20 мкл, що містила 4 мкл із реакційної суміші грибного лізису, 0,2 мМ кожного праймера (ITS1/ITS4), 6 % Tween-20 і 10 мкл 2x ImmoMix (Bioline USA Inc, Taunton, MA). ПЛР проводили в таких умовах: 94 °C протягом 10 хвилин; 94 °C протягом 30 секунд, 52 °C протягом 30 секунд, 72 °C протягом 75 секунд протягом 30 циклів; 72 °C протягом 10 хвилин. 2-мкл аліквоту ПЛР-продукту поміщали на 1,0 % агарозний гель для підтвердження одинарної смужки очікуваного розміру. Позитивні смужки спрямовували на секвенування за Сенгером в прямому та зворотному напрямках за допомогою M13 праймерів. Послідовність 5.8S міжгенної ділянки (ITS) грибного штаму SGI-010-H11 представлена в Переліку послідовностей під номером SEQ ID NO:11. Дослідження гомології для певної нуклеотидної послідовності 5.8 S міжгенної ділянки (ITS) проводили за допомогою бази даних DDBJ/GenBank/EMBL. Після цього за допомогою програми ClustalW побудови філогенетичного дерева був проаналізований філогенетичний взаємозв'язок нуклеотидної послідовності 5.8S міжгенної ділянки (ITS) у групі, до якої ввійшли описаний тут виділений грибний антагоніст SGI-010-H11, мікроорганізми родів і видів, які демонструють високі гомології послідовностей з виділеним грибним антагоністом SGI-010-H11, та інші різноманітні роди і види мікроорганізмів. Грибний штам SGI-010-H11 вважається спорідненим з родиною *Mycosphaerellaceae*, якщо брати за критерій ~97 % подібність його послідовності ITS-5.8S рДНК такий у *Mycosphaerellapunctiformis* (GenBank EU343182) і *Ramulariapratisensis* (GenBank EU019284), 5.8S ITS послідовності яких демонструють очевидне споріднення з *Mycosphaerellaceae*.

Лізис бактеріальних клітин та отримання інформації щодо послідовності 16S рПНК

20 мкл аліквоту клітинної суспензії переносили на 96-лунковий ПЛР-планшет, що містив 20 мкл 2х буферу для лізису (100 мМ Tris HCL, pH 8,0, 2 мМ EDTA, pH 8,0, 1 % SDS, 400 мкг/мл протеїнази K). Лізис проводили в таких умовах: 55 °C протягом 30 хвилин, 94 °C протягом 4 хвилин. Аліквоту лізисного продукту використовували як джерело матричної ДНК для ПЛР-ампліфікації. Послідовність 16S рПНК ампліфікували за допомогою ПЛР-реакції з праймерами M13-27F (SEQ ID NO:17) і 1492R M13-хвіст (SEQ ID NO:18).

Для ампліфікації ділянки 16S рПНК кожену ПЛР-суміш готували в реакційній суміші з кінцевим об'ємом 20 мкл, що містила 4 мкл із реакційної суміші бактеріального лізису, 2 мМ кожного праймера (27F/1492R), 6 % Tween-20 і 10 мкл 2x ImmoMix (Bioline USA Inc, Taunton, MA). ПЛР-реакцію проводили в таких умовах: 94 °C протягом 10 хвилин; 94 °C протягом 30 секунд, 52 °C протягом 30 секунд, 72 °C протягом 75 секунд протягом 30 циклів; 72 °C протягом 10 хвилин. 2-мкл аліквоту ПЛР-продукту поміщали на 1,0 % агарозний гель для підтвердження одиничної смужки очікуваного розміру. Позитивні смужки спрямовували на секвенування за Сенгером у прямому і зворотному напрямках з M13 праймерами. Послідовності 16S рПНК бактеріальних штамів SGI-014-C06, SGI-005-G08, SGI-014-G01, SGI-015-F03 і SGI-015-H06 мали довжину приблизно 1,4 Kb і представлені в Переліку послідовностей під номерами SEQ ID NO:1, 10, 12, 13 і 14 відповідно. Дослідження гомології для певних нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою бази даних DDBJ/GenBank/EMBL. Після цього за допомогою програми ClustalW побудови філогенетичного дерева аналізували філогенетичний взаємозв'язок нуклеотидної

послідовності 16 рРНК генів у групі, що складається із описаних тут виділених бактеріальних антагоністів, бактерій родів і видів, які демонструють великі гомології послідовностей з виділеними бактеріальними антагоністами, та інших різноманітних бактеріальних родів і видів. Ідентичність послідовностей і подібність визначали також за допомогою програми  
 5 GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. USA). Результати аналізу послідовностей показали, що бактеріальний ізолят SGI-014-G01 може вважатися спорідненим з родом *Variovorax* на основі ~99 % подібності його 16S рРНК послідовності з такими у декількох видів *Variovorax*, включаючи *Variovorax* R-21938 (GenBank AJ786799) і *Variovorax paradoxus* (GenBank GU186109), 16S рРНК послідовності яких демонструють очевидну спорідненість з видом  
 10 *Variovorax*. Крім того, результати аналізу послідовностей показали, що два бактеріальні ізоляти SGI-015-F03 і SGI-015-H06 можуть вважатися спорідненими з родиною *Bacillaceae* на основі >99 % подібності їхніх відповідних 16S послідовностей таким у декількох видів *Bacillus*.

Результати аналізу послідовностей показали, що два бактеріальні ізоляти SGI-014-C06 і SGI-055-G08 можуть вважатися спорідненими з родиною *Microbacteriaceae* на основі >99 %  
 15 подібності їхніх відповідних 16S послідовностей таким у декількох видів *Microbacterium*. А саме 1430 нт послідовність 16S рРНК гена SGI-014-C06 (SEQ ID NO:1) є ідентичною 16S рРНК гена штаму DSM 20578 *Microbacterium oxydans* і декількох інших штамів *Microbacterium* (наприклад, послідовностям Y17227.1, FJ200406, EU086800 і EU714335 із GenBank) на всій 1430 нт довжині.

Зокрема, серед тисяч мікробних штамів, які були виділені і протестовані на здатність  
 20 пригнічувати розвиток *Fusarium* в аналізі на антагонізм, як описано у Прикладі 1, вісімдесят вісім штамів були надалі ідентифіковані як вид *Microbacterium* на основі подібності їх 16S послідовностей таким у відомих видів *Microbacterium*. Але авторами було встановлено, що супресорну активність проти *Fusarium graminearum* мали тільки два штами – SGI-014-C06 і SGI-055-G08 *Microbacterium*. Як зазначалося вище, сьогодні є повідомлення про існування декількох  
 25 родів мікробів природного походження, які мають антагоністичну активність проти фузаріозу. Але до появи даного винаходу не було повідомлень про мікроорганізми роду *Мусобактеріум*, які мають антагоністичну активність. Крім того, до появи даного винаходу його авторам не були відомі способи або процеси, в яких би використовувався бактеріальний штам роду *Мусобактеріум* як агент біоборотьби для запобігання, інгібування або лікувальної обробки проти  
 30 розвитку патогену, що є збудником фузаріозу.

ПРИКЛАД 3. Аналіз послідовностей обов'язкових генів з ізоляту SGI-014-C06

Нещодавно в роботі (Richert et al. Syst. Appl. Microbiol. 30:102-108, 2007) повідомлялося про філогенетичні дослідження декількох обов'язкових генів із 27 видів роду *Microbacterium*. В цих дослідженнях був зроблений висновок про те, що хоча можливості, які надає аналіз 16S рРНК  
 35 послідовностей для систематичної таксономії, є неперевершеними, фокусування уваги лише на одному таксономічному параметрі не приведе до систематичних висновків. Як зазначалося вище, нуклеотидна послідовність 16S рРНК гена штаму SGI-014-C06 (SEQ ID NO:1) є ідентичною 16S рРНК гена декількох штамів *Microbacterium*, включаючи нуклеотидну послідовність 16S рРНК гена штаму DSM 20578 *Microbacterium oxydans*, який був включений у дослідження (Richert et al. (2007) (GenBank Accession Y17227.1)). Автори винаходу поширили  
 40 філогенетичний аналіз ще на чотири обов'язкові гени ізоляту SGI-014-C06, якими є субодинаця В ДНК-гірази (*gyrB*), субодинаця В РНК-полімерази (*rpoE*), рекомбіназа А (*recA*) і поліфосфаткіназа (*prp*). В напрямку цього кінця весь геном ізоляту SGI-014-C06 був секвенований методом "шотган", зібраний та анотований відповідно до методик, описаних у заявці (PCT Patent Application No. WO2010115156A2). Геномна ДНК була приготована зі свіжої культури SGI-014-C06. Для екстрагування високомолекулярної ДНК використовувались клітинна гранула і комплект для відокремлення ДНК UltraClean® Mega Soil DNA Isolation Kit (Cat. No 12900-10) виробництва фірми MO BIO Laboratories, Inc. згідно з протоколом, рекомендованим виробником.  
 45 Після цього була приготована геномна ДНК із SGI-014-C06 для "шотган" 454-піросеквенування. Геномна ДНК (7,5 мкг) використовувалася для конструювання бібліотеки відповідно до рекомендованого протоколу (454 Life Sciences) для поодиноких довгих ридів. Послідовності були генеровані за два послідовні проходи секвенування GS FLX Titanium.

Отримані послідовності чотирьох обов'язкових генів *gyrB*, *rpoB*, *recA*, and *prp* ізоляту SGI-014-C06 наведені в Переліку послідовностей. Дослідження гомології для певних нуклеотидних  
 55 послідовностей проводилися за допомогою бази даних DDBJ/GenBank/EMBL. Ідентичність послідовностей і подібність також визначались за допомогою програми GenomeQuest™ (Gene-IT, Worcester Mass. USA). Нижче більш детально показано, що результат секвенування обов'язкових генів виявив новизну описаного тут ізоляту SGI-014-C06, який є новим бактеріальним штамом і може вважатися спорідненим із родиною *Microbacteriaceae*.

60 Полінуклеотидна послідовність гена *gyrB* штаму SGI-014-C06 має найбільшу ідентичність з

послідовністю гена *gyrB* штаму *Microbacterium testaceum* з номером доступу AP012052 в GenBank (82,69 % за вирівнюванням 936/2172 нуклеотидів). Порівняно з геном *gyrB* штаму DSM 20578 *Microbacterium oxydans* (GenBank AM181583; Richert et al., 2007), гомології послідовностей між цими двома генами були на ~62 % ідентичними на нуклеотидному рівні і на ~37 % ідентичними на амінокислотному рівні.

Полінуклеотидна послідовність гена *groB* штаму SGI-014-C06 має найбільшу ідентичність з послідовністю гена *groB* штаму *Microbacterium maritimum* з номером доступу AM181582 в GeneBank (96,98 % за вирівнюванням 1093/3504 нуклеотидів). Порівняно з геном *groB* штаму DSM 20578 *Microbacterium oxydans* (GenBank AM181583; Richert et al., 2007), гомології послідовностей між цими двома генами були на ~96 % ідентичними на нуклеотидному рівні і на 99 % ідентичними на амінокислотному рівні.

Полінуклеотидна послідовність гена *recA* штаму SGI-014-C06 має найбільшу ідентичність із послідовністю гена *recA* штаму *Microbacterium testaceum* з номером доступу AP012052 в GeneBank (85,45 % за вирівнюванням 962/1188 нуклеотидів). Порівняно з геном *recA* штаму DSM 20578 *Microbacterium oxydans* (GenBank AM181527; Richert et al., 2007) гомології послідовностей між цими двома генами були на ~92 % ідентичними на нуклеотидному рівні і на 100 % ідентичними на амінокислотному рівні.

Полінуклеотидна послідовність гена *ppk* штаму SGI-014-C06 має найбільшу ідентичність із послідовністю гена *ppk* штаму *Microbacterium luteolum* з номером доступу AM181554 в GenBank (91,38 % за вирівнюванням 1380/2175 нуклеотидів). Порівняно з геном *ppk* штаму DSM 20578 *Microbacterium oxydans* (GenBank AM181556; Richert et al., 2007) гомології послідовностей між цими двома генами були на ~91 % ідентичними на нуклеотидному рівні і на ~98 % ідентичними на амінокислотному рівні.

**ПРИКЛАД 4.** Захист пшениці від інфекції *Fusarium graminearum* за допомогою мікробних антагоністів *Microbacterium*. (NRRL B-50470) *Mycophaeella*. (NRRL 50471) і *Variovorax*. (NRRL B-50469)

Описані у Прикладі 1 мікробні штами, які продемонстрували позитивну пробу на антибіоз у скринінгу за антагонізмом, були піддані біовипробуванням на рослинах, в яких клітини мікробних штамів наносилися безпосередньо на насінини сприйнятливої зернової культури з наступною інокуляцією конідіальними спорами гриба *F. graminearum*. Мікробні штами вирощувались до достатньої мутності і розбавлялися у воді. Два грами насіння пшениці сприйнятливого сорту (Hank; WestBred LLC, Bozeman, MT) висівали в однолітрові горщики з пастеризованим ґрунтовим середовищем. Після висівання поверх насінин розподіляли 20 мл розчину мікробної культури. Насінини пшениці витримували в тепличних умовах для пророщування під флуоресцентним освітленням протягом 14 год. фотоперіоду. На початку цвітіння колос пшениці піддавали зараженню шляхом розпилення конідіальних спор NRRL 5883 *F. graminearum*. Конідіальні спори збирали з КДА-планшетів п'ятиденного віку шляхом виливання на планшети води з 0,01 % Tween 20 і зскрібання спор у суспензію. Після розпилення спор пшеничні рослини переносили в туманну камеру з 100 % вологістю і витримували в ній протягом трьох днів для інфікування. Таким чином готували такі зразки:

1. Необроблені зразки: без обробки мікробним або хімічним фунгіцидом + зараження *Fusarium*.
2. Неінфіковані зразки: без обробки мікробним або хімічним фунгіцидом, без зараження *Fusarium*.
3. SGI-010-H11: грибна обробка + зараження *Fusarium*.
4. SGI-014-G01: бактеріальна обробка + зараження *Fusarium*.
5. SGI-014-C06: бактеріальна обробка + зараження *Fusarium*.

Через двадцять днів після інфікування зрошення припиняли, і пшеничним рослинам давали висохнути протягом трьох тижнів перед збором врожаю. Потім кожний колос пшениці зрізали і збирали індивідуально. Тяжкість хвороби визначали для кожного колоса, що мав симптоми фузаріозу. У числовому вираженні тяжкість хвороби визначали шляхом ділення числа уражених колосків на загальне число колосків, що припадало на один колос. Одержані результати (Табл. 2) показали, що пшениця, оброблена будь-яким із трьох мікробних антагоністів SGI-014-C06 (NRRL B-50470), SGI-010-H11 (NRRL 50471) і SGI-014-G01 (NRRL B-50469), мала значно менші тяжкість хвороби і кількість заражень *Fusarium graminearum*, ніж "необроблений" контроль, вирощуваний в тих же умовах ( $P < 0,05$ ).

Насінини з кожного колоса збирали вручну і зважували. Визначали середню вагу насінин на горщик і в кожному режимі обробки. Як показано в Табл. 3, всі мікробні антагоністи дали значне зниження втрат врожаю, зумовлених інфікуванням фузаріозом.

Таблиця 2

Ефективність мікробних антагоністів  
у зниженні кількості випадків захворювання пшениці фузаріозом.

Обробка	Тяжкість захворювання, %	Стандартне відхилення	Величина Р
Неінфікований	1,30	0,0025	< 0,0001
Необроблений	15,46	0,0364	Не визначена
SIG-010-H11	7,42	0,0219	0,0005
SIG-014-G01	6,59	0,0315	0,0001
SIG-014-C06	7,21	0,0225	0,0004

Таблиця 3

Ефективність мікробних антагоністів у  
збереженні виходу насіння в пшениці, зараженій фузаріозом.

Обробка	Маса насінини, г	Величина Р
Неінфікований	0,8438±0,1633	0,0191
Необроблений	0,4669±0,1209	Не визначена
SIG-010-H11	0,6200±0,1844	0,7025
SIG-014-G01	0,7963±0,2032	0,5277
SIG-014-C06	0,6744±0,0948	0,0551

ПРИКЛАД 5. Інгибування росту *Fusarium graminearum* мікробними антагоністами на сіянцях пшениці

Мікробні штами, які продемонстрували супресорну активність проти *F. graminearum* в лабораторному тесті на антагонізм, були досліджені також на їх здатність знижувати захворюваність насінин пшениці фузаріозом. Насінини сприйнятливого сорту пшениці (Hank; WestBred LLC, Bozeman, MT) висівали в однілітрові пластмасові горщики діаметром 20 см з пастеризованим ґрунтовим середовищем. Мікробні клітинні суспензії готували таким чином. 2YT або інше подібне поживне середовище інокулювали бульйонними культурами із матричних гліцеринових розчинів ізолятів або штрихових планшетів. Як правило, культури ініціювались за 48-72 год. до поміщення їх в камеру для культивування, теплицю або на поле, де вони досягали пізньої експоненціальної фази росту. Ізоляти з більшим часом подвоєння ініціювались, крім того, заздалегідь. Культури інкубували при 30 °C на роторному шейкері при 200 об./хв. Після культивування, клітини формувались у гранули 10000 x г протягом 15 хв. при 4 °C і ресуспендувались в 10 mM MgSO<sub>4</sub> буфері (pH 7,0). Густина клітин нормували для кожного ізоляту в одиницях КУО/мл (клітиноутворювальні одиниці на мілілітр). Як правило, готували ~10<sup>9</sup> КУО/мл суспензії для кожного ізоляту, яку доставляли до місця інокуляції на льоду. Інокуляцію проводили шляхом розбавлення цих клітинних суспензій у співвідношенні 1/20 в іригаційній воді до кінцевої густини 5 × 10<sup>7</sup> КУО/мл. У дослідях з однілітровими горщиками, 20 мл цієї розбавленої клітинної суспензії рівномірно розподіляли по культиваційній поверхні кожного горщика. В експериментах в мікрогорщиках клітинні суспензії не розбавлялися, і 1 мл кожної 10<sup>9</sup> КУО/мл суспензії поміщали за допомогою піпетки на культиваційну поверхню кожного горщика подібно до обприскування зверху занурених насінин. Насінини і рослини витримувались у теплиці при кімнатній температурі з 14 год. фотоперіодом освітлення.

Міцелій штаму NRRL-5883 виду *Fusarium graminearum* вирощували на КДА-планшетах протягом 5 днів при безперервному освітленні. Гіфи і конідії збирали шляхом виливання декількох мілілітрів стерильної води (0,01 % Tween 20) на планшети і зскрібання поверхні агару стерильним шпателем. Концентрація спор в інокуляті складала приблизно 2 × 10<sup>5</sup> спор/мл, але концентрація гіфального фрагмента не визначалася.

Інокуляцію видом *F. graminearum* починали після виходу коротких пагонів із насінин і повторювали кожний другий вечір упродовж 10 днів. Інокулят *F. graminearum* наносили шляхом розприскування в кількості приблизно 30 мл на горщик. Одразу після інокуляції рослини кожний раз обприскували зверху за допомогою туманоутворювача. Коли використовували хімічний фунгіцид, його готували шляхом розбавлення 2 мл фунгіцидного маточного розчину (Banner Maxx, Syngenta) в 1 л дистильованої води і наносили за допомогою розприскувача в кількості



приблизно 30 мл на горщик.

Фузаріозне ураження оцінювали ступенем інфікування *Fusarium*, який визначали числом колонієутворювальних одиниць *Fusarium* на грам (КУО/г) рослинних тканин. Всі операції обробки виконувались в чотирьох блоках по чотири горщика в кожному блоці. Проводились такі види обробки:

1. Необроблений: без обробки мікробним або хімічним фунгіцидом + зараження *Fusarium*.

2. Неінфікований: без обробки мікробним або хімічним фунгіцидом і без зараження *Fusarium*.

3. Фунгіцид: обробка хімічним фунгіцидом + зараження *Fusarium*.

4. SGI-010-H11: грибна обробка + зараження *Fusarium*.

5. SGI-014-G01: бактеріальна обробка + зараження *Fusarium*.

6. SGI-014-C06: бактеріальна обробка + зараження *Fusarium*.

Одержані результати, які подані в Табл. 4, показали, що всі три мікробні обробки дали значне зниження тяжкості фузаріозу порівняно з неінфікованим контролем. Зокрема, два мікробні антагоністи, SGI-014-C06 і SGI-010-H11, значно знизили інфікування пшениці видом *Fusarium graminearum* порівняно з необробленим контролем, вирощуваним в таких же умовах. Захист пшениці від *Fusarium*-інфікування, здійснюваний будь-яким із двох мікроорганізмів — SGI-014-C06 або SGI-010-H11, — був статистично порівняним із захистом комерційним хімічним фунгіцидом. У випадку використання мікроорганізму SGI-014-G01 захист пшениці від *Fusarium*-інфікування був набагато менш помітним, а його ефективність суттєво змінювалася від одного культивацийного горщика до другого.

Таблиця 4

Дія мікробних антагоністів на інфікування грибом *Fusarium*.

Обробка	ОЕ/г	Величина Р
Необроблений	1487±600	Не визначена
Неінфікований	0±0	0,0001
Хімічний фунгіцид	290±146	< 0,0001
SGI-010-H11	671±450	0,0077
SGI-014-G01	1246±465	0,8387
SGI-014-C06	367±234	0,0001

#### ПРИКЛАД 6. Культивування і зберігання мікробних антагоністів

Вид *Mycosphaerella*. Для зберігання виділеного гриба як чистої культури використовували декілька способів, в одному із яких застосовували фільтрувальний папір. В іншому випадку після культивування гриба на КДА його розрізали на маленькі квадрати, які поміщали у флакончики з 15 % розчином гліцерину і зберігали в них при -70 °С. В аналогічному досліді цей грибок зберігали при 4 °С, але не в гліцерині, а в дистильованій воді. Проте, одним із переважних способів було зберігання на інфікованому стерильному насінні ячменю при -80 °С.

Види *Bacillus*, *Microbacterium* і *Variovorax*. Виділені бактерії зберігались як чиста культура. Бактеріальну колонію переносили у флакончик із рідким бульйонним середовищем R2A (Тескнова) і культивували в ньому при 30 °С на шейкері при швидкості 250 об./хв. протягом двох днів. Після цього культуру переносили у флакончики з 15 % розчином гліцерину і зберігали в них при -80 °С.

#### ПРИКЛАД 7. Обробка для продукування спор і нанесення покриття на насіння

Продукування спор. Відповідно до типової методики продукування спор один літр поживного середовища 2xYT (16 г/л триптон, 10 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl) інокулювали стартерною культурою в кількості 5 мл або зскрібком чашки Петрі та інкубували протягом ночі при 30 °С в ротаційному шейкері при швидкості 225 об./хв. Бактеріальні клітини гранулювали шляхом центрифугування і промивали 1x ЗФР буфером (8 г/л NaCl; 0,2 г/л KCl; 1,44 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4). Клітини ресуспендували у середовищі CDSM (Hageman et al, J. Bacteriol., 438-441, 1984) і культивували ще протягом чотирьох ночей при 30 °С в ротаційному шейкері. Спорують в бактеріальній культурі контролювали щоденно за допомогою фазоконтрастного мікроскопа доти, поки не утворювалась вся культура із вільно плаваючих спор. Період такого інкубування, як правило, не перевищує чотирьох днів або ж триває більше шести днів, залежно від вирощуваного виду. Під фазоконтрастним мікроскопом ендоспори видно усередині клітин у вигляді яскраво-білих сплюснених сфероїдів. Бактеріальні спори гранулювали шляхом центрифугування в режимі 10000 x г протягом 15 хвилин, двічі промивали

стерильною dH<sub>2</sub>O і, в разі потреби, концентрували до 50 мл. Приготовані таким способом спори могли або одразу використовуватися, або охолоджуватися для майбутнього використання. Концентрацію спор вимірювали згідно з методикою OD<sub>600</sub>. Ця методика, як правило, давала щонайменше 2000 OD бактеріальних спор.

Зокрема, було встановлено, що декілька бактеріальних штамів відповідно до даного винаходу, наприклад, SGI-015-F03 виду *Bacillus*, можуть продукувати великі кількості спор після 4 днів інкубації з простою інокуляцією великою стартерною культурою (~15 мл), що росла протягом ночі, в 1 л 2х SG поживного середовища з наступною 4-денною інкубацією при відповідній температурі в ротаційному шейкері в режимі 225 об./хв. У досліді використовувалося поживне середовище 2 х SG такого складу: 16 г/л поживний бульйон; 0,25 г/л MgSO<sub>4</sub>; 2,0 г/л KCl; 0,15 г/л CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,025 г/л MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,28 мг/л FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,0 г/л декстрази.

Нанесення покриття на насіння пшениці і кукурудзи. Проводили невеликий експеримент з обробки насіння згідно з мінімально модифікованою методикою, описаною в (Sudisha et al., 2009). В експерименті готували маточний розчин біополімеру шляхом додавання 6 г порошку гуміарабіку (MP Biomedical) в 36 мл води в 50 мл пробірці Falcon і наступного перемішування до досягнення гомогенності за допомогою колісного міксера. Для перемішування великих кількостей оброблюваного насіння, де необхідно, використовували змішувальну плиту.

У тих випадках, коли використовували рослинні клітини, мутні культури мікробних клітин, що активно росли, промивали ЗФР (забуферним фосфатом фізіологічним розчином) і доводили до OD<sub>600</sub> ~5,0. В альтернативному варіанті мікробні спорові суспензії готували так, як описано вище. Бактеріальні спори і/або рослинні клітини ретельно ресуспендували в ~32 мл гуміарабік-біополімерного маточного розчину, приготованого так, як описано вище, і одержану суспензію ретельно перемішували в 1 л пляшці. У пляшку додавали приблизно 400 г насіння (пшениці або кукурудзи) та інтенсивно перемішували на шейкері або вихровому струшувальному пристрої до досягнення рівномірного розподілу гумі/клітинної суспензії. Потім покриті насінини розподіляли на пластмасових блюдцях для сушіння в ламінарному потоці до усунення липкості, у загальному випадку, протягом 3-6 год. з періодичним перемішуванням. В деяких випадках, покриті спорами насіння можна сушити протягом ночі. Але насіння, покриті вегетативними культурами, як правило, відправлялося на зберігання до того, як воно повністю зневоднювалося. Тест на життєздатність, якому періодично піддавалися мікроби, використовувані в препаратах покриття на насінні, показав, що ці мікроби зберігали життєздатність протягом, щонайменше, трьох місяців. Швидкість проростання покритих насінин була практично ідентичною швидкості проростання непокритих контрольних насінин.

ПРИКЛАД 8. Вплив мікробної обробки насіння на розвиток фузаріозу в пшениці

Насінини сприйнятливо до фузаріозу сорту (RB07) пшениці покривалися мікроорганізмами SGI-014-C06, або SGI-015-F03, або SGI-015-H06 згідно з методикою, описаною у Прикладі 8. Покриті насіння висівали в 1 л горщики з пастеризованим ґрунтовим середовищем [(Metromix-Mix 200; Scotts-Sierra Horticultural Products, Marysville, OH; і 3 грами добрива 14-14-14 (N-P-K)]. Горщики засівалися по 7-8 рослин в кожному, після чого у фазу росту 3-го листа їх засівання зменшували до 5 рослин на горщик. Горщики об'єднували у рандомізовані блоки по 5 горщиків на обробку. Далі покриті насінини ставили для проростання в тепличні умови з флуоресцентним освітленням протягом 16 год. на добу. Коли почалось квітіння пшениці, її шляхом розприскування на колос заражали макроконідіальними спорами штаму NRRL 5883 виду *F. graminearum* в концентрації 100000 спор/мл. Після розприскування спор пшеницю поміщали в кліматичну камеру з 100 % вологістю й утворюванням роси, і витримували в цих сприятливих для інфікування умовах протягом трьох днів. Проводили такі види обробки зразків:

1. Необроблений: без мікробної або хімічної фунгіцидної обробки + зараження *Fusarium*.
2. SGI-014-C06: бактеріальна обробка насінин + зараження *Fusarium*.
3. SGI-015-F03: бактеріальна обробка насінин + зараження *Fusarium*.
4. SGI-015-H06: бактеріальна обробка насінин + зараження *Fusarium*.

Тяжкість фузаріозу оцінювали візуально на десятий день і двадцять перший день після інфікування. Ступінь інфікування визначали для кожного колоска, що виявляв симптоми фузаріозу, й обчислювали відсоток симптоматичних колосків, тобто помножене на 100 число колосків, які демонстрували симптоми фузаріозу, ділили на загальне число колосків. Одержані результати (Табл. 5) показали, що насінини пшениці, покриті будь-яким із трьох тестованих мікробних антагоністів — SGI-014-C06, SGI-015-F03, SGI-015-H06, — мали значно знижений ступінь інфікування грибом *Fusarium graminearum* порівняно з "необробленим" контролем, вирощуваним в таких же умовах ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 5

Розвиток симптомів фузаріозу в  
пшениці після обробки насінин антагоністичними мікроорганізмами

Обробка	Ступінь інфікування, %	
	На 10 день після інфікування	На 21 день після інфікування
Необроблений контроль	49,31	66,10
SGL-014-C06	2,08	7,74
SGL-015-F03	23,12	31,53
SGL-015-H06	9,42	19,81

#### ПРИКЛАД 9. Біоборотьба з фузаріозом пшениці в тепличних випробуваннях

Кожний із мікроорганізмів SGL-014-C06, SGL-015-F03 і SGL-015-H06 тестували в тепличних випробуваннях більшого масштабу. Випробування проводили в "теплиці для культивування рослин" (PGCR: plant growth containment room) при фірмі Synthetic Genomics, Inc. і включали такі види лікувальної обробки: інфікований контроль, неінфікований контроль, а також обробку промисловими фунгіцидами чотирьох марок. Серед них були: хімічні фунгіциди марок Banner MAXX® (Syngenta) з концентрацією 2 мл/л і Prosaro® (Bayer CropScience) з концентрацією 3 мл/л, які наносились шляхом розпилення на листя відповідно до рекомендацій виробника, і біологічні фунгіциди марок Actinovate® (Natural Industries) і RhizoVital® (ABiTEP GmbH), які наносились шляхом обприскування ґрунту також відповідно до рекомендацій виробника.

Препарат для мікробної обробки наносили або шляхом обприскування ґрунту, або шляхом покриття насінин. Коли мікробну обробку проводили шляхом обприскування ґрунту, клітинні суспензії кожного мікроорганізму індивідуально наносили на насінини перед покриттям їх великою кількістю поживного середовища. Для цього свіжоприготовані культури гранулювали, видаляючи з них поживні речовини, і повторно суспендували в 10 мМ сульфат-магнієвого (MgSO<sub>4</sub>) буферу. Після цього клітинні суспензії додавали методом піпетування і рівномірного розподілу 20 мілілітрів суспензії по насінинах при загальній кількості ~10<sup>9</sup> клітин на горщик. У випадку мікробної обробки шляхом нанесення покриття на насіння, мікроорганізми (клітини/спори) готували по суті так, як описано вище, у Прикладі 8. Покриття на насінини наносили шляхом введення в клітинну суспензію розчину гуміарабіку і таким чином створення липкої суміші для наступного нанесення її на насіння. Після цього мікробне покриття насінин просували, в результаті чого утворювався твердий, але водорозчинний біополімер, що захоплював мікроорганізми (клітини/спори). Мета цих маніпуляцій полягала в тому, щоб забезпечити титр клітин щонайменше 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> життєздатних клітин/насінину. В цьому тепличному експерименті покриття на насінини наносили за день до посіву.

Для кожного виду обробки було передбачено чотири однакові комплекти зразків, розміщених за рандомізованою повноблочною схемою проведення експерименту (RCBD: Randomized Complete Block Design) на трирівневих полицях, розташованих двома рядами уздовж бічних стін теплиці. Полички були обладнані флуоресцентною системою освітлення (Agrosun, 5850K), яка забезпечувала освітленість в середньому 800 мкмоль, вимірювану на поверхні горщика. Кожний комплект зразків складався із чотирьох нерухомо установлених 1 л горщиків. Горщики наповнювали штучним поживним середовищем, що складалося із поживного середовища Arabidopsis Growth Medium AIS (від фірми Lehle Seeds) на основі трав'янистої рослини Arabidopsis і грубого промитого піску в об'ємному співвідношенні 3:1. В усіх горщиках за поверхні поживного середовища розподіляли по два грами насінин ярової пшениці (Hank, WestBred). Горщики мали донну подачу води з підтриманням ~2 см рівня води і візуально контролювалися на проростання і ріст.

У фазу цвітіння (за системою ідентифікації росту і розвитку зернових культур Feekes 10.5.1) колос пшениці інфікували розпилюванням суспензії конідіальних спор *Fusarium graminearum*. Для цього тепличного експерименту спори грибів готували шляхом посадки гомогенізованого міцелію штаму NRRL 5883 *F. graminearum* на великі КДА-планшети і наступної п'ятиденної інкубації в умовах безперервного освітлення при кімнатній температурі. Після цього грибні спори збирали шляхом заливки планшетів магній-сульфатним буфером (10 мМ MgSO<sub>4</sub>; 0,01 % Tween 20) і зскрібання поверхні агару стерильним шпателем. Після регулювання концентрації спор їх в кількості приблизно 50000 конідіальних спор на один колос наносили на рослини за допомогою ручного розпилювача. Відносну вологість у теплиці підвищували до 90 % і

витримували протягом трьох днів для інфікування, а потім повертали на нормальний рівень. Після того, як насінини пшениці зав'язувались, подачу води припиняли і колоскам давали можливість повністю висохнути. Потім колосся пшениці по одному збирали. Тяжкість захворювання визначали для кожного колоса, який мав симптоми фузаріозу, шляхом підрахування кількості уражених колосків і ділення її на загальну кількість колосків, що припадала на один колос. Одержані результати (Табл. 6) показали, що пшениця, оброблена будь-яким із трьох тестованих мікробних антагоністів, SGI-014-C06, SGI-015-F03, SGI-015-H06, мала значно меншу тяжкість і кількість інфікацій *Fusarium graminearum* порівняно з "необробленим" контролем, вирощуваним в таких же умовах ( $P < 0,05$ ).

Таблиця 6

Ефективність мікробних антагоністів у зменшенні захворюваності пшениці фузаріозом.

Обробка	Ступінь інфікування, %	Захист від інфекції, %
Неінфікований	2,1±2,9	Не визначений
Інфікований	37,2±9,8	0,00
Prosario®	4,6±2,8	93,00
Banner-MAXX®	12,5±5,8	70,00
Actinovate®	38,9±12,1	-5,00
Rhizo Vital®	28,0±5,4	26,00
SGI-014-C06	18,4±9,1	30,00
SGI-015-F03	25,4±6,9	54,00
SGI-015-H06	26,6±7,4	34,00

Для визначення виходу насіння кожний колос пшениці зрізали вручну, насінини збирали й очищували від лузги та інших детритів, підраховували і зважували. Загальний вихід насіння визначали як загальну масу насіння, одержаного від рослин в 16 горщиках для кожного виду обробки. Як показано в Табл. 7, всі три тестовані мікробні антагоністи продемонстрували суттєве збереження виходу насіння, тобто втрати насіння, зумовлені фузаріозною інфікацією, були значно знижені.

Таблиця 7

Ефективність мікробних антагоністів у збереженні виходу насіння пшениці, ураженої фузаріозом.

Обробка	Загальний вихід насіння, г	Захист виходу насіння, %
Неінфікований	14,36	Не визначено
Необроблений	11,05	0,00
Prosario®	13,44	72,00
Banner-MAXX®	14,41	102,00
Actinovate®	11,99	28,00
RhizoVital®	12,65	48,00
SGI-014-C06	14,70	110,00
SGI-015-F03	15,03	120,00
SGI-015-H06	14,14	93,00

Таким чином, обробка пшениці будь-яким із розглянутих мікроорганізмів дозволила помітно запобігти втратам виходу насіння, які спричиняються інфікуванням грибом *Fusarium*. Зокрема, пшениця, оброблена будь-яким із штамів SGI-014-C06 або SGI-015-F03, продемонструвала суттєве покращення загального виходу насіння, тобто 110 % і 120 % відповідно порівняно з неінфікованим контролем. На противагу цьому, комерційні фунгіциди марок Actinovate®, RhizoVital® і Prosario® не показали суттєвого захисту врожаю обробленої ними пшениці від втрат, зумовлених інфікацією грибом *Fusarium*.

ПРИКЛАД 10. Біоборотьба з фузаріозом пшениці в польових умовах

Антагоністичні мікроорганізми, які виявили свою супресорну активність проти патогену *F. graminearum* і фузаріозу в аналізі на антагонізм *in vitro* і в тепличних дослідженнях, описаних у Прикладах 4-9, досліджуються і далі в серії польових випробувань у різних місцях Сполучених

Штатів. Деякі експерименти проводяться на сільськогосподарських площах, які використовуються для мікробіологічної боротьби з фузаріозом пшениці в умовах природного інфікування цим захворюванням. В цих випробуваннях використовуються сорти пшениці, чутливі до зараження грибом *F. graminearum*. При цьому пшеницю, оброблену різноманітними методами, висівають на невеликих ділянках у 12 рядків завдовжки приблизно 3 метри. Проміжок між рядками становить приблизно 20 см. Оброблені ділянки в кожному експерименті виносяться в рандомізовану блочну схему. Оцінюється також ефективність різноманітних композицій зі змочуваних порошків, які містять мікробні антагоністи згідно з винаходом, у зниженні тяжкості і кількості випадків інфікування фузаріозом. В цих експериментах мікробні антагоністи оцінюються як індивідуально, так і в комбінаціях.

Крім того, проводиться оцінка антагоністичних мікроорганізмів у різноманітних покриттях на насінині і/або в польових умовах, де мікробні суспензії наносять безпосередньо на пшеничне колосся у фазу цвітіння. В кожному із цих експериментів мікроорганізми оцінюються на ідентичних ділянках. При цьому можуть використовуватися антагоністи, патогени і методи аграрного виробництва, описані у Прикладах 4-9.

Нанесення покриття на насіння. Окрім способів нанесення покриття на насіння, описаних вище у Прикладі 7, можуть застосовуватися найрізноманітніші відомі технології і препарати для обробки насіння пшениці мікробними антагоністами, наприклад, описані в роботах (Fernando et al, 2002; Bello et al., 2002; Kim et al, 1997). У загальному випадку насіння пшениці спочатку зволожують і витримують при кімнатній температурі для ініціації проростання. Перед висіванням пророслі насіння можна занурювати в мікробні суспензії. Інокулювання патогенних спор можна проводити до бактеріальної інокуляції або після неї. Способи готування антагоністів, патогенів і рослин для такої обробки насіння можуть бути такими, як описано у Прикладах 4 і 5.

Оцінка тяжкості захворювання і виходу насіння. Антагоністи піддаються подальшим оцінкам в тепличних умовах на їх супресорну активність проти фузаріозу на пшениці та ячмені у фазу цвітіння за допомогою найрізноманітніших способів і методик, включаючи описані, наприклад, в (Schisler, Plant Disease, Vol 86(12), 1350-1356, 2002; Schisler et al. Biological Control, 39:497-506, 2006; and Khan and Doohan, Biological Control, 48:42-47, 2009). В одному із таких експериментів інокуляти штаму *G. zeae* готують на стерильній, жовтозерновій кукурудзі, як описано в (Khan et al. Biological Control, 29:245-255, 2004). Повністю колонізовані ліпідні культури (48-години культивування) мікробних штамів розбавляють до однієї четвертої концентрації фосфатним буфером. Кінцеве число КУО на мілілітр для антагоністичної обробки складає від  $1 \times 10^9$  КУО/мл до  $6 \times 10^9$  КУО/мл. Після цього до квітучого колосся пшениці застосовують обробку суспензіями за допомогою CO<sub>2</sub> ручного розпилювача. Обробку, як правило, проводять після заходу сонця для зниження до мінімуму можливу УФ-деградацію антагоністичних клітин. Готують 5 реплікатів (груп зразків-копій) на одну обробку, які вносять у рандомізовану блок-схему. Першим контролем обробки є рослини, оброблені буферним розчином. Другим контролем обробки є необроблені рослини. Оцінку тяжкості інфікування і захворюваності фузаріозом в польових умовах проводять шляхом підрахунку 60 колосів на реплікат (тобто 300 колосів на обробку), де розвиток рослини відбувається від фази середньо-молочної стиглості і до фази м'якої воскової стиглості. Коли зерна досягають повної зрілості, колосся пшениці збирають вручну й обмолочують за допомогою молотарки марки Алмасо для одиничних рослин і колосів (Алмасо, ІА). Зразки зерен, одержані із кожного рядка реплікатів, оцінюють за вагою 100 зернівок. Дані стосовно тяжкості захворювання, захворюваності і маси 100 зернівок аналізують методом однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA).

Композиції, які містять мікробні антагоністи згідно з винаходом, індивідуально або в комбінації, демонструють значне зниження захворюваності. Ці результати є свідченням того, що біологічний метод боротьби за допомогою даних активних мікробних агентів може грати важливу роль у боротьбі з фузаріозом зернових рослин, таких, як пшениця.

**ПРИКЛАД 11.** Розробка культиварів неприродного походження і програм їх селекціонування

Ендофітні мікроорганізми згідно з винаходом вводяться в культурні рослини, включаючи зернові культури, різноманітних генотипів і географічного походження. Але ще немає подібних їм ендофітних мікроорганізмів, з якими би можна було створювати рослинно-ендофітні комбінації з поліпшеними агрономічними характеристиками за допомогою методик, аналогічних методикам, відомим у даній галузі, включаючи ті, що описані в (U.S. Pat Appl. No. 20030195117A1; U.S. Pat. Appl. No. 20010032343A1; і U.S. Pat. No. 7,084,331). Таким чином, потрібні штучні рослинно-ендофітні комбінації можуть створюватися і селекціонуватися за програмою селекції і розробки культиварів на базі їхньої здатності утворювати і підтримувати мутуалістичну комбінацію, яка у підсумку дає агрономічний ефект. У такій селекційній програмі

може використовуватися також рейтинг агрономічних характеристик даної комбінації. До цих характеристик можуть входити, наприклад, засухостійкість, акумулювання біомаси, стійкість до інфікування комахами, поїдання худобою (наприклад, трав'яними), легкість репродукції, вихід насіння та ін. Такі комбінації можуть розрізнятися за рівнем акумулювання мікробних метаболітів, що є токсичними для сільськогосподарських шкідників і бур'яну, включаючи рівні ергот-алкалоїдів, рівні лоліну, рівні пераміну або рівні лолітрему, і демонструвати при цьому потрібні агрономічні характеристики вирощуваних рослин, включаючи стійкість до інфікування або до поїдання комахами, стійкість до абіотичного стресу, поїдання худобою, акумулювання біомаси, легкість розмноження і вихід насіння тощо.

У даному описі розглянуто численні варіанти здійснення винаходу. Проте, абсолютно зрозуміло, що елементи цих варіантів можуть об'єднуватися в комбінації, утворюючи нові варіанти здійснення винаходу і його різноманітні модифікації, які залишаються в межах ідеї та обсягом даного винаходу. Отже, всі інші варіанти здійснення винаходу, його альтернативи й еквіваленти охоплюються обсягом винаходу відповідно до даного Опису і Формули винаходу.

Назва заявки дана виключно для полегшення сприйняття вмісту і жодним чином не обмежує обсягу винаходу та варіантів його здійснення.

Всі публікації і патентні заявки, згадані в даному описі, включені тут шляхом посилання такою ж мірою, як ніби кожна публікація або патентна заявка індивідуально зазначалася включеною шляхом посилання.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> SYNTHETIC GENOMICS, INC.  
 GRANDLIC, CHRISTOPHER J.  
 GREEN, WAYNE A.  
 KEROVUO, JANNE S.  
 MCCANN, RYAN T.

<120> КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ ДЛЯ ВОРОТЬБИ З ФУЗАРІОЗОМ

<130> SGI1520-1WO

<150> US 61/511,467  
 <151> 2011-07-25

<160> 18

<170> Патент у версії 3.5

<210> 1  
 <211> 1430  
 <212> ДНК  
 <213> Вид Microbacterium

<220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

<220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> кодує 16S рибосомну РНК

<400> 1  
 acgtcggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgaacgggtga acacggagct tgctctgtgg  
 60  
 gatcagtggc gaacgggtga gtaacacgtg agcaacctgc cctgactct gggataagcg  
 120  
 ctggaaacgg cgtctaatac tggatatgtg acgtgaccgc atggctctgcg tctggaaaga  
 180  
 atttcggttg gggatgggct cgcggcctat cagcttggtg gtgaggtaat ggctcaccaa  
 240  
 ggcgtcgacg ggtagccggc ctgagagggt gaccggccac actgggactg agacacggcc  
 300  
 cagactccta cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggcgcaag cctgatgcag  
 360  
 caacgcgcg tgagggacga cggccttcgg gttgtaaacc tcttttagca gggagaagc  
 420  
 gaaagtgcg gtacctgcag aaaaagcgcc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat  
 480  
 acgtagggcg caagcgttat ccggaattat tgggcgtaaa gagctcgtag gcggtttgtc  
 540  
 gcgtctgctg tgaaatccgg aggotcaacc tcggcctgc agtgggtaag gccagactag

```

600
    agtgcggtag gggagattgg aattcctggt gtagcgtgg aatgcgcaga tatcaggagg
660
    aacaccgatg gcgaaggcag atctctgggc cgtaactgac gctgaggagc gaaaggggtg
720
    ggagcaaaca ggcttagata ccctggtagt ccaccccgta aacgttggga actagttgtg
780
    ggggtccattc cacggattcc gtgacgcagc taacgcatta agttccccgc ctggggagta
840
    cggccgcaag gctaaaactc aaaggaattg acggggaacc gcacaagcgg cggagcatgc
900
    ggattaattc gatgcaacgc gaagaacctt accaaggctt gacatatacg agaacgggcc
960
    agaaatggtc aactcttttg aactcgttaa acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt
1020
    gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagegcaacc ctcgttctat gttgccagca
1080
    cgtaatggtg ggaactcatg ggatactgcc ggggtcaact cggaggaagg tggggatgac
1140
    gtcaaatcat catgcccctt atgtcttggg cttcacgcac gctacaatgg ccggtacaaa
1200
    gggctgcaat accgcgaggt ggagcgaatc ccaaaaagcc ggtcccagtt cggattgagg
1260
    tctgcaactc gacctcatga agtcggagtc gctagtaatc gcagatcagc aacgctgcgg
1320
    tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcaagt catgaaagtc ggtaacacct
1380
    gaagccggtg gcctaaccct tgtggaggga gccgtcgaag gtgggatcgg
1430

```

```

<210> 2
<211> 2172
<212> ДНК
<213> Вид Microbacterium

<220>
<221> пізнавальні ознаки
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

<220>
<221> пізнавальні ознаки
<223> SGI Ген ID SGIMICG850682

<220>
<221> пізнавальні ознаки
<223> кодує пептидну послідовність SED ID NO 3

```



```

<400> 2
60  gtgtctgcgg cgggagagcg gctgtcgaga atagactcgg agattgtgaa tgccgagtat
120  tccgcccatc atctccaggt gcttgagggg ctggaagctg tccgcaagcg cccgggcatg
180  tacatcgggg cgaacggctc gcggggcctc atgcaactgc ttggggagat catcgacaac
240  tctgtcgacg aggcgggtggc aggcaacggc acgaagatcg acatcatcct gcaactccgac
300  ggcagcgctg aggtgcacga ccgcggctgc ggcatccctg togacgtcga gccgcgcacc
360  ggtctcaccg gtgtcgaggt cgtctacacc aagctgcacg ccggaggaaa gttcggcggc
420  ggctcgtacg cggcatccgg tggactgcac ggtgtcggcg cctccgtcgt gaacgcgctc
480  tccgagcgcc tcgacgtcga ggtcgaccgc gggggcaaga cctacgcgat gtcgttccat
540  cgcggtgagc ccggcatctt cacggactcc ggcgagaagc ggccggacgc cccgttcacg
600  ccgttcgagg agaacagcga gctgcgcgtc atcggcaagg cgcgcgtgg cgtgaccggc
660  acccgggtgc gctactgggc cgaccggcag atcttcacca aggatgcggc gttccagctc
720  tcggagctcg agaccgcgc acgcagacg gcgttcctcg ttcccggtct cgagatcgtc
780  gtcaaggacg cacgggcggc cggtcaggtc atccccgtcc cggactccga cggcgagacg
840  accgtcgtcg ggaccgatga gacctcgtac ctctacgagg gcggcatctc cgagttcgtc
900  gagtacctcg ccatcgacct tcccgtgacc gacacctggc gtatccaggg cgagggcatg
960  ttcaaggaga ccgtgcccg tctgcaggca gacggccaca tggtcgccac cgaggtggag
1020  cgtgtgtgcg ccgtcgacat cgcgctgcgc tgggggacgg gctacgacac ccgtgtgcgc
1080  tccttcgtga acatcatcgc gacgccaag ggcggaacct accagcaggg cttcgagcag
1140  gagctcctga aggtgctgcg ctcccaggtc gagcagaacg cccgcggtct gaaggtcggc
1200  aacgacaagc tggagaagga cgacgtctc gccggcctca ccgcggtgct cacggtcaac

```

```

1260      gtgccgggagc cgcagttcga gggccagacc aaggaagtgc tcggcacccc cgcggtgcgg
1320      cagatcgtgg cgcaggtgat ccgtaaggat ctggcgcagc gcttcagctc gaccaagcgc
1380      gacgacaaga accaggccac acagctgctc gacaagatcg tctccgagat gaaggcccggt
1440      gtctcggcgc gcgccacaa ggagacgcag cgcgcgaaga acgcgctgga gtcgtcgacg
1500      ctgccgacca agctcgtcga ctgccgcacg aacgaggtcg agcgcagcga gctcttcac
1560      gtggagggcg actcggctct cggcaccgcc aagaacgcgc gcaacagcga gttccaggcg
1620      ctgctcccga tccgagggaa gatcctcaac gtgcagaagg cctctgtcgg cgacatgctg
1680      tcgaacaccg agtgcgcgtc gatcatccag gtgatcggcg ccggatccgg acgcacctc
1740      gacatcgatg cggcgcgcta cggcaagggtg atcctgatga gcgacgccga tgtcgacggc
1800      gcgcacatcc gtaccctgct gctcacgtg ttcttcgct acatgcgacc gctgatcgag
1860      caccggcggtg tgttcgcgcg ggtgcgcgcg ttgcaccggg tgatcgtgat gaaccggggg
1920      tccaagccga acgagacgat ctacacctac agcgagcagg agatgcacgc gctgctggcg
1980      aagctccgca aggcgggcaa gogctggcac gagccgatcc agcgctacaa gggctctcgt
2040      gagatggacg cggaacagct cgcgaacacc accatggacc gctccggccg tctgctgcgc
2100      cgtgtgcgca tggaagacgc cgaggccgcc ggtcgcgtgt tcgagctgct gatgggcaac
2160      gaggtcgcgc cgcgcgcgca gttcatcatc gactcctccg accggttgtc gcgcgagtc
2172      atcgacgcct

```

ga

```

<210> 3
<211> 723
<212> ПРОТЕЇН
<213> Вид Microbacterium

<220>
<221> різноманітні ознаки
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

```

<220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> SGI пептид ID SG1M1CT850682

<220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> субодиниця гіпази В

<400> 3

Met Ser Ala Ala Gly Glu Arg Leu Ser Arg Ile Asp Ser Glu Ile Val  
 1 5 10 15

Asn Ala Glu Tyr Ser Ala His His Leu Gln Val Leu Glu Gly Leu Glu  
 20 25 30

Ala Val Arg Lys Arg Pro Gly Met Tyr Ile Gly Ser Asn Gly Ser Pro  
 35 40 45

Gly Leu Met His Cys Leu Trp Glu Ile Ile Asp Asn Ser Val Asp Glu  
 50 55 60

Ala Val Ala Gly Asn Gly Thr Lys Ile Asp Ile Ile Leu His Ser Asp  
 65 70 75 80

Gly Ser Val Glu Val His Asp Arg Gly Arg Gly Ile Pro Val Asp Val  
 85 90 95

Glu Pro Arg Thr Gly Leu Thr Gly Val Glu Val Val Tyr Thr Lys Leu  
 100 105 110

His Ala Gly Gly Lys Phe Gly Gly Gly Ser Tyr Ala Ala Ser Gly Gly  
 115 120 125

Leu His Gly Val Gly Ala Ser Val Val Asn Ala Leu Ser Glu Arg Leu  
 130 135 140

Asp Val Glu Val Asp Arg Gly Gly Lys Thr Tyr Ala Met Ser Phe His  
 145 150 155 160

Arg Gly Glu Pro Gly Ile Phe Thr Asp Ser Gly Glu Lys Arg Pro Asp  
 165 170 175

Ala Pro Phe Thr Pro Phe Glu Glu Asn Ser Glu Leu Arg Val Ile Gly  
 180 185 190

Lys Ala Pro Arg Gly Val Thr Gly Thr Arg Val Arg Tyr Trp Ala Asp  
 195 200 205

Arg Gln Ile Phe Thr Lys Asp Ala Ala Phe Gln Leu Ser Glu Leu Glu  
210 215 220

Thr Arg Ala Arg Gln Thr Ala Phe Leu Val Pro Gly Leu Glu Ile Val  
225 230 235 240

Val Lys Asp Ala Arg Ala Ala Gly Gln Val Ile Pro Val Pro Asp Ser  
245 250 255

Asp Gly Glu Thr Thr Val Val Gly Thr Asp Glu Thr Ser Tyr Leu Tyr  
260 265 270

Glu Gly Gly Ile Ser Glu Phe Val Glu Tyr Leu Ala Ile Asp Pro Pro  
275 280 285

Val Thr Asp Thr Trp Arg Ile Gln Gly Glu Gly Met Phe Lys Glu Thr  
290 295 300

Val Pro Val Leu Gln Ala Asp Gly His Met Val Ala Thr Glu Val Glu  
305 310 315 320

Arg Val Cys Ala Val Asp Ile Ala Leu Arg Trp Gly Thr Gly Tyr Asp  
325 330 335

Thr Arg Val Arg Ser Phe Val Asn Ile Ile Ala Thr Pro Lys Gly Gly  
340 345 350

Thr His Gln Gln Gly Phe Glu Gln Glu Leu Leu Lys Val Leu Arg Ser  
355 360 365

Gln Val Glu Gln Asn Ala Arg Arg Leu Lys Val Gly Asn Asp Lys Leu  
370 375 380

Glu Lys Asp Asp Val Leu Ala Gly Leu Thr Ala Val Leu Thr Val Asn  
385 390 395 400

Val Pro Glu Pro Gln Phe Glu Gly Gln Thr Lys Glu Val Leu Gly Thr  
405 410 415

Pro Ala Val Arg Gln Ile Val Ala Gln Val Ile Arg Lys Asp Leu Ala  
420 425 430

Gln Arg Phe Ser Ser Thr Lys Arg Asp Asp Lys Asn Gln Ala Thr Gln  
435 440 445

Leu Leu Asp Lys Ile Val Ser Glu Met Lys Ala Arg Val Ser Ala Arg  
 450 455 460  
 Ala His Lys Glu Thr Gln Arg Arg Lys Asn Ala Leu Glu Ser Ser Thr  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Thr Lys Leu Val Asp Cys Arg Thr Asn Glu Val Glu Arg Ser  
 485 490 495  
 Glu Leu Phe Ile Val Glu Gly Asp Ser Ala Leu Gly Thr Ala Lys Asn  
 500 505 510  
 Ala Arg Asn Ser Glu Phe Gln Ala Leu Leu Pro Ile Arg Gly Lys Ile  
 515 520 525  
 Leu Asn Val Gln Lys Ala Ser Val Gly Asp Met Leu Ser Asn Thr Glu  
 530 535 540  
 Cys Ala Ser Ile Ile Gln Val Ile Gly Ala Gly Ser Gly Arg Thr Phe  
 545 550 555 560  
 Asp Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Val Ile Leu Met Ser Asp Ala  
 565 570 575  
 Asp Val Asp Gly Ala His Ile Arg Thr Leu Leu Leu Thr Leu Phe Phe  
 580 585 590  
 Arg Tyr Met Arg Pro Leu Ile Glu His Gly Arg Val Phe Ala Ala Val  
 595 600 605  
 Pro Pro Leu His Arg Val Ile Val Met Asn Pro Gly Ser Lys Pro Asn  
 610 615 620  
 Glu Thr Ile Tyr Thr Tyr Ser Glu Gln Glu Met His Ala Leu Leu Ala  
 625 630 635 640  
 Lys Leu Arg Lys Ala Gly Lys Arg Trp His Glu Pro Ile Gln Arg Tyr  
 645 650 655  
 Lys Gly Leu Gly Glu Met Asp Ala Glu Gln Leu Ala Asn Thr Thr Met  
 660 665 670  
 Asp Arg Ser Gly Arg Leu Leu Arg Arg Val Arg Met Glu Asp Ala Glu  
 675 680 685

Ala Ala Gly Arg Val Phe Glu Leu Leu Met Gly Asn Glu Val Ala Pro  
690 695 700

Arg Arg Glu Phe Ile Ile Asp Ser Ser Asp Arg Leu Ser Arg Glu Ser  
705 710 715 720

Ile Asp Ala

<210> 4  
<211> 3504  
<212> ДНК  
<213> Вид Microbacterium

<220>  
<221> різноманітні ознаки  
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

<220>  
<221> різноманітні ознаки  
<223> SGI Ген ID SG1MICG850290

<220>  
<221> різноманітні ознаки  
<223> кодує пептидну послідовність SEQ ID NO 5

<400> 4  
60 ttggctgctg ctcgcaacgc atccacatcc accaccacca agaacggacg cggagcttcc  
120 cgtctttcgt tcgccaagat ctccgacacg ctgacgggcc ctgaccttct cgccctgcag  
180 accgaatcct tcggttggct ggtcggcaac gacgcctgga aggcgcgcgt ggccgaggcc  
240 aagaagcagg ggcgcaccga cgtcaacgag aacagcggtc tgggcgagat cttcgaggag  
300 atctctccga tcgaggacct cggcgagacg atgcagctgt cgttcacgaa cccctacctc  
360 gagccggaga agtactccat cgaggagtgc aaggagcgtg gcaagacctc cgccgctccg  
420 ctgtacgtcg aggcggagtt catgaaccac ctcaagggtg agatcaagac ccagacggtc  
480 ttcattggcg acttcccgtc gcagaccgac aagggaacgt tcatcatcaa cggctccgag  
540 cgcgtcgtcg tctcgcagct ggtgcgttcg ccgggtgtct acttcgacaa gaccccgac  
600 aagacgtccg acaaggacat cgtctcggca cgcgtcatcc cgagccgtgg tgcttggtc  
660 gaggtcgaga tcgacaagcg cgaccaggtc ggcgtgcgcg tcgaccgcaa gcgcaagcag

```

720   tcggtcacgg  ttttcctcaa  ggcgctgggc  atgaccagcg  aggagatcct  cgccgagttc
      gccggctaca  cctcgatcga  ggagacgctc  gcgaaggaca  cgatcgtcac  gaaggaagat
780   gcgctccgcg  acatctaccg  caagctccgt  ccgggcgagc  aggtcgccgc  cgaggccgcc
      cgcgcgctcc  tggacaactt  ctacttcaac  ccgaagcgct  acgacctggc  caaggtcggc
900   cgctacaaga  tcaaccacaa  gctgggcctg  gaccagccgc  tgaactcgtc  ggtcctgacc
      gtogaagaca  tcgtggccac  gatcaagtac  ctggtgcgtc  tgcacgccgg  caccgaggag
1020  accttcacgg  gcatccgcgg  tggtaagaag  gcgagatcc  gtctcgcgac  cgacgacatc
      gacaacttcg  gcaaccgtcg  catccgcgcg  gtcggcgagc  tgatccagaa  ccaggtccgc
1140  accggtctct  ccgcgatgga  gcgcgtcgtc  ccgagcgca  tgaccacgca  ggacatcgag
      gcgatcacgc  cgcagaccct  gatcaacgtg  cgcgccgctg  tcgcgcgat  caaggagttc
1260  ttoggaacgt  cgcagctgtc  gcagttcatg  gaccagaaca  acccgctcgc  gggctctgac
      aacaagcgtc  gtctgtctgc  gctcgcccc  ggtggtctct  cgcgagaccg  cgccggcgtc
1380  gaggtccgtg  acgtccaccc  ctgcgaactac  ggccgcgatg  gcccgatcga  gactccggaa
      ggccgaaca  tcggtctgat  cgggtctctc  gcgaccttcg  cgcgcaccaa  ctggttcgga
1500  ttcacgcaga  ccccgtagcg  caaggtcgtc  gacggtgtcg  tgaccgacca  gatcgactac
      ctgacggctt  ccgaagaggt  cgacttcaac  atcggcgagg  ccaacgcccc  gctcgatgcc
1620  aagggtcgct  tccgcgagag  ccacgtcctg  gcccgcccca  aggggtggcag  cggcgaggtc
      gacctgttcg  tccccgagga  gatcggttac  atcgacgtct  ccccgcgcca  gatggtgtcg
1740  gtgcgcacct  cgctcgtgcc  cttcctcgag  cacgacgacg  cacagcgcg  cctcatgggt
      gccaacatgc  agcgtcaggc  tgtgccgtg  ctgcgcagcg  actcgccgct  cgtcggaacc
1860

```

1920 ggtatggagg gctacacggc catcgacgcc ggtgacgtgc tcaccgccga gaaggccggg  
 1980 gtctgtctcc aggtctccgc agaccgcgtc gtctgtcatgc tcgacgaggg cggaacgcag  
 2040 gagtaccacc tgcgcaagtt cgaccgctcc aaccagggca cgtcgtacaa ccagaaggtc  
 2100 gtctgtcacg ccggtgagcg cgtcgaggtc ggagaggcca tcgccgatgg ccccgccacc  
 2160 gagaacggcg agctggccct cggaaagaac ctctctgtcg cgttcattgac gtgggagggc  
 2220 tacaacttcg aggacgcgat catcttgagc caggacctgg tgaaggacga caccctctcc  
 2280 tcgatccaca tcgaggagta cgaggtcgat gctcgcgaca ccaagctcgg caaggaggag  
 2340 atcacgcgtg acctcccaaa cgtcagcccg gagctgctga aggacctcga cgagcggggc  
 2400 atcatccgca tcggtgccga ggtccgccct ggcgacatcc tcgtcggcaa ggtcacgccg  
 2460 aagggtgaga ccgagctgtc ggccgaggag cgctgtctcc gcgcgatctt caacgagaag  
 2520 agccgcgaag tccgtgacac ctcgctgaag gtgcccacg gtgagcaggg cacgatcatc  
 2580 gccgtcaagg agttcaacgc tgaggacggc gacgacgagc tcggctccgg cgtcaaccgc  
 2640 cgcgtcgtgg tctacatcgc ccagaagcgc aagatcaccg agggtgacaa gctcgcgggc  
 2700 cgtcacggca acaagggtgt catcggaag atcctccga tcgaggacat gccgttcctt  
 2760 tcggacggta ccccggtcga catcgtgtcg aaccgcctcg gtatccccgg tcgaatgaac  
 2820 ttccgtcagg tcctggagac ccacctcggg tggatcgga agcagggctg gaaggtcgag  
 2880 ggcaaccgg agtgggctgt gaagctcccg aaggacgcat tcgaggccgc ccccggaacg  
 2940 aaggctcgca ccccggtgtt cgacggtgcg agcgaggagg agatcgctgg tctctcgac  
 3000 gcgaccaccc cgacccgtga cggcgtccgc ctgatcgact cgagcggcaa gacgcagctg  
 3060 ttcgacggtc gttcgggtga gccgttcccg gcgcgatct ccgtgggcta catgtacatc  
 ctgaagctgc accacctggt cgacgacaag atccacgcac gttccacggg tccgtactcg



3120  
 3180 atgatcacc agcagccgct cgggtgtaag gcgcagttcg gtggacagcg cttcggtgag  
 3240 atggagggtgt gggccctcga ggcctacggc gccgcatacg cgctccagga gctcctcacg  
 3300 atcaagtccg acgacatcct cggccgcgtc aagggtgtacg aggcgatcgt caagggcgag  
 3360 aacatccagg agcccgcat ccccgagtcg ttcaagggtgc tcatgaagga gatgcagtcg  
 3420 ctctgcctga acgtcgaggt cctctcggcc gacggcacgc tggtaaacct ccgcgacaco  
 3480 gacgacgagg cgttcgcgac gcggaagag ctcggtatca acatctccag ccgcttcgag  
 3504 gccgcctcga tcgacgagat ctaa

<210> 5  
 <211> 1167  
 <212> ПРОТЕЇН  
 <213> Вид Microbacterium

<220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

<220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> SGI пептид ID SG1M1CT850290

<220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> Субодиниця В РНК-полімерази

<400> 5

Met Ala Ala Ala Arg Asn Ala Ser Thr Ser Thr Thr Thr Lys Asn Gly  
 1 5 10 15

Arg Gly Ala Ser Arg Leu Ser Phe Ala Lys Ile Ser Asp Thr Leu Thr  
 20 25 30

Val Pro Asp Leu Leu Ala Leu Gln Thr Glu Ser Phe Gly Trp Leu Val  
 35 40 45

Gly Asn Asp Ala Trp Lys Ala Arg Val Ala Glu Ala Lys Lys Gln Gly  
 50 55 60

Arg Thr Asp Val Asn Glu Asn Ser Gly Leu Gly Glu Ile Phe Glu Glu  
 65 70 75 80

Ile	Ser	Pro	Ile	Glu	Asp	Leu	Gly	Glu	Thr	Met	Gln	Leu	Ser	Phe	Thr	85	90	95	
Asn	Pro	Tyr	Leu	Glu	Pro	Glu	Lys	Tyr	Ser	Ile	Glu	Glu	Cys	Lys	Glu	100	105	110	
Arg	Gly	Lys	Thr	Tyr	Ala	Ala	Pro	Leu	Tyr	Val	Glu	Ala	Glu	Phe	Met	115	120	125	
Asn	His	Leu	Thr	Gly	Glu	Ile	Lys	Thr	Gln	Thr	Val	Phe	Met	Gly	Asp	130	135	140	
Phe	Pro	Leu	Gln	Thr	Asp	Lys	Gly	Thr	Phe	Ile	Ile	Asn	Gly	Ser	Glu	145	150	155	160
Arg	Val	Val	Val	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Tyr	Phe	Asp	165	170	175	
Lys	Thr	Pro	Asp	Lys	Thr	Ser	Asp	Lys	Asp	Ile	Val	Ser	Ala	Arg	Val	180	185	190	
Ile	Pro	Ser	Arg	Gly	Ala	Trp	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Asp	Lys	Arg	Asp	195	200	205	
Gln	Val	Gly	Val	Arg	Val	Asp	Arg	Lys	Arg	Lys	Gln	Ser	Val	Thr	Val	210	215	220	
Phe	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Phe	225	230	235	240
Ala	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ile	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	Lys	Asp	Thr	Ile	Val	245	250	255	
Thr	Lys	Glu	Asp	Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Tyr	Arg	Lys	Leu	Arg	Pro	Gly	260	265	270	
Glu	Gln	Val	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Leu	Asp	Asn	Phe	Tyr	275	280	285	
Phe	Asn	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Gly	Arg	Tyr	Lys	Ile	290	295	300	
Asn	His	Lys	Leu	Gly	Leu	Asp	Gln	Pro	Leu	Asn	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	305	310	315	320

Val Glu Asp Ile Val Ala Thr Ile Lys Tyr Leu Val Arg Leu His Ala  
325 330 335

Gly Thr Glu Glu Thr Phe Thr Gly Ile Arg Gly Gly Lys Lys Ala Glu  
340 345 350

Ile Arg Leu Ala Thr Asp Asp Ile Asp Asn Phe Gly Asn Arg Arg Ile  
355 360 365

Arg Ala Val Gly Glu Leu Ile Gln Asn Gln Val Arg Thr Gly Leu Ser  
370 375 380

Arg Met Glu Arg Val Val Arg Glu Arg Met Thr Thr Gln Asp Ile Glu  
385 390 395 400

Ala Ile Thr Pro Gln Thr Leu Ile Asn Val Arg Pro Val Val Ala Ala  
405 410 415

Ile Lys Glu Phe Phe Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe Met Asp Gln  
420 425 430

Asn Asn Pro Leu Ala Gly Leu Thr Asn Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu  
435 440 445

Gly Pro Gly Gly Leu Ser Arg Asp Arg Ala Gly Val Glu Val Arg Asp  
450 455 460

Val His Pro Ser His Tyr Gly Arg Met Cys Pro Ile Glu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gly Pro Asn Ile Gly Leu Ile Gly Ala Leu Ala Thr Phe Ala Arg Ile  
485 490 495

Asn Ser Phe Gly Phe Ile Glu Thr Pro Tyr Arg Lys Val Val Asp Gly  
500 505 510

Val Val Thr Asp Gln Ile Asp Tyr Leu Thr Ala Ser Glu Glu Val Asp  
515 520 525

Phe Asn Ile Ala Gln Ala Asn Ala Pro Leu Asp Ala Lys Gly Arg Phe  
530 535 540

Arg Glu Ser His Val Leu Ala Arg Pro Lys Gly Gly Ser Gly Glu Val  
545 550 555 560

Asp Leu Phe Val Pro Glu Glu Ile Gly Tyr Ile Asp Val Ser Pro Arg  
 565 570 575  
 Gln Met Val Ser Val Ala Thr Ser Leu Val Pro Phe Leu Glu His Asp  
 580 585 590  
 Asp Ala Gln Arg Ala Leu Met Gly Ala Asn Met Gln Arg Gln Ala Val  
 595 600 605  
 Pro Leu Leu Arg Ser Asp Ser Pro Leu Val Gly Thr Gly Met Glu Gly  
 610 615 620  
 Tyr Thr Ala Ile Asp Ala Gly Asp Val Leu Thr Ala Glu Lys Ala Gly  
 625 630 635 640  
 Val Val Ser Glu Val Ser Ala Asp Arg Val Val Val Met Leu Asp Glu  
 645 650 655  
 Gly Gly Thr Gln Glu Tyr His Leu Arg Lys Phe Asp Arg Ser Asn Gln  
 660 665 670  
 Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Val Val Val Thr Ala Gly Glu Arg Val  
 675 680 685  
 Glu Val Gly Glu Val Ile Ala Asp Gly Pro Ala Thr Glu Asn Gly Glu  
 690 695 700  
 Leu Ala Leu Gly Lys Asn Leu Leu Val Ala Phe Met Thr Trp Glu Gly  
 705 710 715 720  
 Tyr Asn Phe Glu Asp Ala Ile Ile Leu Ser Gln Asp Leu Val Lys Asp  
 725 730 735  
 Asp Thr Leu Ser Ser Ile His Ile Glu Glu Tyr Glu Val Asp Ala Arg  
 740 745 750  
 Asp Thr Lys Leu Gly Lys Glu Glu Ile Thr Arg Asp Leu Pro Asn Val  
 755 760 765  
 Ser Pro Glu Leu Leu Lys Asp Leu Asp Glu Arg Gly Ile Ile Arg Ile  
 770 775 780  
 Gly Ala Glu Val Arg Pro Gly Asp Ile Leu Val Gly Lys Val Thr Pro  
 785 790 795 800  
 Lys Gly Glu Thr Glu Leu Ser Ala Glu Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ile

[illegible]

Gly Gly Gln Arg Phe Gly Glu Met Glu Val Trp Ala Leu Glu Ala  
1055 1060 1065

Tyr Gly Ala Ala Tyr Ala Leu Gln Glu Leu Leu Thr Ile Lys Ser  
1070 1075 1080

Asp Asp Ile Leu Gly Arg Val Lys Val Tyr Glu Ala Ile Val Lys  
1085 1090 1095

Gly Glu Asn Ile Gln Glu Pro Gly Ile Pro Glu Ser Phe Lys Val  
1100 1105 1110

Leu Met Lys Glu Met Gln Ser Leu Cys Leu Asn Val Glu Val Leu  
1115 1120 1125

Ser Ala Asp Gly Thr Leu Val Asn Leu Arg Asp Thr Asp Asp Glu  
1130 1135 1140

Ala Phe Arg Ala Ala Glu Glu Leu Gly Ile Asn Ile Ser Ser Arg  
1145 1150 1155

Phe Glu Ala Ala Ser Ile Asp Glu Ile  
1160 1165

<210> 6  
<211> 1188  
<212> ДНК  
<213> Вид Microbacterium

<220>  
<221> пізнаманітні ознаки  
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

<220>  
<221> пізнаманітні ознаки  
<223> SGI Ген ID SG1MICG851004

<220>  
<221> пізнаманітні ознаки  
<223> кодує пептидну послідовність SEQ ID NO 7

<400> 6  
ttgccgactc gatgtcgggtg gcctctccta cgggtggaaaa caagccgaag agccattacg

60

ccttgtcgga gagttgctcc caaccgggag cgcgcgcaca gcctacaggc ggcaccacgc

120

gcgcagaagg agcacatcat gccatcaccc gccgaccgcg agaagtcctt cgagaccgcc

180

```

240   ctgccccaga tgcaccgcca gttcggaaag ggctcgggtca tgcggctggg cagcgatgag
300   cgcgcccccg tggccgtcat cccacccggc tccatcgccc tcgacgtcgc cctcggcgtc
360   ggaggactcc cgcgtgggtc catcgtcgag atctacggac cggagtccct cggtaagacg
420   acgctcacc ctcacgcgat cgcgaacgca cagcgtgccg gtggcatcgc ggcgttcac
480   gacgcgagc acgcgctcga ccccgactac gccgccaagc tcggcgtcga catcgatcgc
540   ctctgggtct cgcagcccca caccgggtgag caggcgctcg agatcgccga catgctcgtg
600   cgcctcgggtg ccatcgacct catcgtcacc gactccgtcg cggccctcgt gccgcgcgcc
660   gagatcgagg gcgagatggg tgactcgacc gtgggtctgc aggctcgcct catgtcgcag
720   gcgctgcgaa agctcaccgg tggcttgaac cagacgaaca ccacgatgat ctccatcaac
780   cagctccgcg agaagatcgg tgtcttcttc ggttcgccgg agaccactgc cggcggtaag
840   gcgctcaagt tctacgctc ggtccgcatg gacatccgtc gtatcgagac gctcaaggac
900   ggtactgacg ctgtcggtaa ccgcaccagg gtcaaggctg tcaagaacaa gatggctccg
960   cctttcaagc aggcgagtt cgacatcctc tacggcgctg gcatctcgcg cgagggaagc
1020  ctgatcgact tcggtgtcga gcatgcgac gtcaagaagt ccggttcctg gtatacgta
1080  gacggtgacc agctgggtca gggcaaggag aacgcgcgga cgttcctgct caacaacccc
1140  gacatcgcg ctcgcatcga gacgcagatc aagcagaagc tcggcatcgg cggtcgccgc
1188  ggggcgcctg ctgcggcaga cgagctcgt gagcgtcgtc cggcctga

```

```

<210> 7
<211> 395
<212> ПРОТЕЇН
<213> Вид Microbacterium

<220>
<221> різноманітні ознаки
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

```

```

<220>
<221>  пізнаманітні ознаки
<223>  SGI пептид ID SG1MICT851004

<220>
<221>  пізнаманітні ознаки
<223>  рекомбіназа A

<400>  7

Met Pro Thr Arg Cys Arg Trp Pro Leu Leu Arg Trp Lys Thr Ser Arg
1          5          10          15

Arg Ala Ile Thr Pro Cys Arg Arg Val Ala Pro Asn Arg Glu Arg Arg
20          25          30

Asp Ser Leu Gln Ala Ala Pro Arg Ala Gln Lys Glu His Ile Met Pro
35          40          45

Ser Pro Ala Asp Arg Glu Lys Ser Leu Glu Thr Ala Leu Ala Gln Ile
50          55          60

Asp Arg Gln Phe Gly Lys Gly Ser Val Met Arg Leu Gly Ser Asp Glu
65          70          75          80

Arg Ala Pro Val Ala Val Ile Pro Thr Gly Ser Ile Ala Leu Asp Val
85          90          95

Ala Leu Gly Val Gly Gly Leu Pro Arg Gly Arg Ile Val Glu Ile Tyr
100         105         110

Gly Pro Glu Ser Ser Gly Lys Thr Thr Leu Thr Leu His Ala Ile Ala
115         120         125

Asn Ala Gln Arg Ala Gly Gly Ile Ala Ala Phe Ile Asp Ala Glu His
130         135         140

Ala Leu Asp Pro Asp Tyr Ala Ala Lys Leu Gly Val Asp Ile Asp Ala
145         150         155         160

Leu Leu Val Ser Gln Pro Asp Thr Gly Glu Gln Ala Leu Glu Ile Ala
165         170         175

Asp Met Leu Val Arg Ser Gly Ala Ile Asp Leu Ile Val Ile Asp Ser
180         185         190

Val Ala Ala Leu Val Pro Arg Ala Glu Ile Glu Gly Glu Met Gly Asp
195         200         205

```



Ser His Val Gly Leu Gln Ala Arg Leu Met Ser Gln Ala Leu Arg Lys  
210 215 220

Leu Thr Gly Gly Leu Asn Gln Thr Asn Thr Thr Met Ile Phe Ile Asn  
225 230 235 240

Gln Leu Arg Glu Lys Ile Gly Val Phe Phe Gly Ser Pro Glu Thr Thr  
245 250 255

Ala Gly Gly Lys Ala Leu Lys Phe Tyr Ala Ser Val Arg Met Asp Ile  
260 265 270

Arg Arg Ile Glu Thr Leu Lys Asp Gly Thr Asp Ala Val Gly Asn Arg  
275 280 285

Thr Arg Val Lys Val Val Lys Asn Lys Met Ala Pro Pro Phe Lys Gln  
290 295 300

Ala Glu Phe Asp Ile Leu Tyr Gly Val Gly Ile Ser Arg Glu Gly Ser  
305 310 315 320

Leu Ile Asp Phe Gly Val Glu His Ala Ile Val Lys Lys Ser Gly Ser  
325 330 335

Trp Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Gln Leu Gly Gln Gly Lys Glu Asn Ala  
340 345 350

Arg Thr Phe Leu Leu Asn Asn Pro Asp Ile Ala Leu Ala Ile Glu Thr  
355 360 365

Gln Ile Lys Gln Lys Leu Gly Ile Gly Gly Pro Ala Ala Ala Pro Ala  
370 375 380

Ala Ala Asp Glu Leu Ala Glu Arg Arg Pro Ala  
385 390 395

<210> 8  
<211> 2175  
<212> ДНК  
<213> Вид Microbacterium

<220>  
<221> різноманітні ознаки  
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

<220>  
<221> різноманітні ознаки  
<223> SGI Ген ID SG1MICG849768

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; різноманітні ознаки

&lt;223&gt; кодує пептидну послідовність SEQ ID NO 9

&lt;400&gt; 8

60 atgtacccca tgatcgatcc cgcactcgcc gacgccggcc tcggtgacgc cgaagacgac  
 120 gacttcgacg ccatcgagtc tcccgaactc cagctcccg accaccgcta cctggatcgc  
 180 gagctgagct ggctcgccct caaccagcgc gtaatggagc tcgccgagga tccgtcactg  
 240 cccgaactcg agcgggcgaa ctctctggcg atcttcgcca gcaacctcga cgagttcttc  
 300 atggtgccgc tcgccggcct caagcgcgcg atcatgaccg gcctggccgt gccgacgaac  
 360 atcggccgct ccccgctcga cgcgctcgcc gacatctccc gcgaagcgca cgcctgcag  
 420 ctgctgcacg ccgaggcctg gacctcgctc gtgcgccccg ccctggccga ctccggcctc  
 480 gagatcacgg actggtcgga gctgaccgac gacgagcgt ccggattgtc cgagtacttc  
 540 cagctccagg tcttcccggt gctgatgcg ctccgggtcg acccgcgca tccgttcccc  
 600 tacatctccg gcctgtcgt gaacctcgcg atccgcatcc gcaatgcccg caccgggcgc  
 660 caggagtctg cgcgcctcaa ggtgccggcc atgctcccc gcttcgtgga ggtgccgggc  
 720 ggcgcgagga tcaagcgctt cctgcgcctg gaggaactga tcgcgaacca cctcggcgac  
 780 ctgttccccg gcatggaggt gctcgaccac caccggttcc gcctcaccg caacgaagac  
 840 gtggagatcg aggaagacga gagcgagaac ctcatccagg cgctcgaggc cgagctgctg  
 900 cgcgctgat tcggcccgcc gatccgcctc gagatcacgg acgacatgga cgaggtcacg  
 960 atggacctgc tcgtcccgga gctcgacatc accgacctgg aggtctaccg cctccccggt  
 1020 ccgctcgacc tgccgggaact gttcgatctg tcccgcctcg accgtccga cctgcgctac  
 1080 ccgccgcacc tgcccaccac ggccgtggcc ttccagccc caggatcgag caaccgcgcc  
 gacatcttca aagcgatccg caagtccgat gtgctcgtgc accaccgta cgagtcgttc

```

1140
    acgaccagcg tgcaggcggtt octogaacag gcggcccgcg acccgcacgt gctcgccatc
1200
    aagcagaccc tgtaccgcac ctggggcgac agcccggtcg tgcaggcgct gatcgacgcg
1260
    gccgaagccg gcaagcaggt gctggccctc gtcgaggtga agggccgttt cgacgagggc
1320
    aacaacatcg tctgggcacg caagctcgag aaggccggcg tgcacgtggt ctacggtctc
1380
    gtgggactca agaccactg caagctcgcc ctggtcatcc gcgaggaaga ggggatgctg
1440
    cgccactact cgacgctcgg caccggcaac tacaaccca agaccagccg catctacgag
1500
    gacttcggtc tgttcaccgc agacgcgcag gtgggcaaag acctgacacg cctgttcaac
1560
    gagctcagcg gctacgcgat cgagaagaag ttcaagcgcc tgetggtcgc cccgctgcac
1620
    ctgcgcaagg gcctcatccg ccagatcgac gccgagcgca ggaacgccga gggggggatc
1680
    cccgcgcaca tccgcatcaa ggtgaactcg atggtcgatg aggagatcat cgacgcgctc
1740
    taccgcgcga gcgcggccgg ggtgaaggtc gacgtgtggg tgcgcggcat ctgcagcctg
1800
    cgcaccgacc tcgacggcat cagtgacaac atcacggtgc gcagcatcct cggccgctac
1860
    ctcgagcaact cccgcatttt cgcgttcgag aacgccggcg acccgcaggt gtacatcggc
1920
    agcgcgcaca tgatgcaccg caacctcgac cgtcgtgtgg aggcgctggt gcgcgtcacc
1980
    gacgcgcacc acctcaagga actgcaggcg ttcttcgacc tcgcgatgga cgacggaacc
2040
    tcgtcgtggc atctcggcgc cggcggcgtc tgggagcgcc acgcctgaa cggcgacggc
2100
    aagccgctga tcgacctgca ggataagacc atggggttga tccagcgcg cgcgcgcgcg
2160
    cgggcggttc
2175
    gatga

```

```

<210> 9
<211> 724
<212> ПРОТЕЇН
<213> Вид Microbacterium

```

<220>  
 <221> пізнаючі ознаки  
 <223> SGI бактеріальний ізолят SGI-014-C06

<220>  
 <221> пізнаючі ознаки  
 <223> SGI пептид ID SG1MICT849768

<220>  
 <221> пізнаючі ознаки  
 <223> поліфосфат кіназа

<400> 9

Met Tyr Pro Met Ile Asp Pro Ala Leu Ala Asp Ala Gly Leu Gly Asp  
 1 5 10 15

Ala Glu Asp Asp Asp Phe Asp Ala Ile Glu Ser Pro Asp Ser Gln Leu  
 20 25 30

Pro Asp His Arg Tyr Leu Asp Arg Glu Leu Ser Trp Leu Ala Phe Asn  
 35 40 45

Gln Arg Val Met Glu Leu Ala Glu Asp Pro Ser Leu Pro Glu Leu Glu  
 50 55 60

Arg Ala Asn Phe Leu Ala Ile Phe Ala Ser Asn Leu Asp Glu Phe Phe  
 65 70 75 80

Met Val Arg Val Ala Gly Leu Lys Arg Arg Ile Met Thr Gly Leu Ala  
 85 90 95

Val Pro Thr Asn Ile Gly Arg Ser Pro Val Asp Ala Leu Ala Asp Ile  
 100 105 110

Ser Arg Glu Ala His Ala Leu Gln Leu Arg His Ala Glu Ala Trp Thr  
 115 120 125

Ser Leu Val Arg Pro Ala Leu Ala Asp Ser Gly Ile Glu Ile Thr Asp  
 130 135 140

Trp Ser Glu Leu Thr Asp Asp Glu Arg Ser Gly Leu Ser Glu Tyr Phe  
 145 150 155 160

Gln Leu Gln Val Phe Pro Val Leu Met Pro Leu Ala Val Asp Pro Ala  
 165 170 175

His Pro Phe Pro Tyr Ile Ser Gly Leu Ser Leu Asn Leu Ala Ile Arg  
 180 185 190

```

Ile Arg Asn Ala Arg Thr Gly Arg Gln Glu Phe Ala Arg Leu Lys Val
    195                      200                      205

Pro Pro Met Leu Pro Arg Phe Val Glu Val Pro Gly Gly Gly Glu Ile
    210                      215                      220

Lys Arg Phe Leu Arg Leu Glu Glu Leu Ile Ala Asn His Leu Gly Asp
    225                      230                      235                      240

Leu Phe Pro Gly Met Glu Val Leu Asp His His Ala Phe Arg Leu Thr
                      245                      250                      255

Arg Asn Glu Asp Val Glu Ile Glu Glu Asp Glu Ser Glu Asn Leu Ile
                      260                      265                      270

Gln Ala Leu Glu Ala Glu Leu Leu Arg Arg Arg Phe Gly Pro Pro Ile
                      275                      280                      285

Arg Leu Glu Ile Thr Asp Asp Met Asp Glu Val Thr Met Asp Leu Leu
    290                      295                      300

Val Arg Glu Leu Asp Ile Thr Asp Leu Glu Val Tyr Arg Leu Pro Gly
    305                      310                      315                      320

Pro Leu Asp Leu Arg Gly Leu Phe Asp Leu Ser Arg Ile Asp Arg Pro
                      325                      330                      335

Asp Leu Arg Tyr Pro Pro His Leu Pro Thr Thr Ala Val Ala Phe Gln
                      340                      345                      350

Pro Ala Gly Ser Ser Asn Arg Ala Asp Ile Phe Lys Ala Ile Arg Lys
                      355                      360                      365

Ser Asp Val Leu Val His His Pro Tyr Glu Ser Phe Thr Thr Ser Val
    370                      375                      380

Gln Ala Phe Leu Glu Gln Ala Ala Arg Asp Pro His Val Leu Ala Ile
    385                      390                      395                      400

Lys Gln Thr Leu Tyr Arg Thr Ser Gly Asp Ser Pro Val Val Gln Ala
                      405                      410                      415

Leu Ile Asp Ala Ala Glu Ala Gly Lys Gln Val Leu Ala Leu Val Glu
                      420                      425                      430

```

Val Lys Ala Arg Phe Asp Glu Ala Asn Asn Ile Val Trp Ala Arg Lys  
435 440 445

Leu Glu Lys Ala Gly Val His Val Val Tyr Gly Leu Val Gly Leu Lys  
450 455 460

Thr His Cys Lys Leu Ala Leu Val Ile Arg Glu Glu Glu Gly Met Leu  
465 470 475 480

Arg His Tyr Ser His Val Gly Thr Gly Asn Tyr Asn Pro Lys Thr Ser  
485 490 495

Arg Ile Tyr Glu Asp Phe Gly Leu Phe Thr Ala Asp Ala Gln Val Gly  
500 505 510

Lys Asp Leu Thr Arg Leu Phe Asn Glu Leu Ser Gly Tyr Ala Ile Glu  
515 520 525

Lys Lys Phe Lys Arg Leu Leu Val Ala Pro Leu His Leu Arg Lys Gly  
530 535 540

Leu Ile Arg Gln Ile Asp Ala Glu Arg Arg Asn Ala Glu Ala Gly Ile  
545 550 555 560

Pro Ala His Ile Arg Ile Lys Val Asn Ser Met Val Asp Glu Glu Ile  
565 570 575

Ile Asp Ala Leu Tyr Arg Ala Ser Ala Ala Gly Val Lys Val Asp Val  
580 585 590

Trp Val Arg Gly Ile Cys Ser Leu Arg Thr Asp Leu Asp Gly Ile Ser  
595 600 605

Asp Asn Ile Thr Val Arg Ser Ile Leu Gly Arg Tyr Leu Glu His Ser  
610 615 620

Arg Ile Phe Ala Phe Glu Asn Ala Gly Asp Pro Gln Val Tyr Ile Gly  
625 630 635 640

Ser Ala Asp Met Met His Arg Asn Leu Asp Arg Arg Val Glu Ala Leu  
645 650 655

Val Arg Val Thr Asp Ala Asp His Leu Lys Glu Leu Gln Ala Phe Phe  
660 665 670

Asp Leu Ala Met Asp Asp Gly Thr Ser Ser Trp His Leu Gly Ala Gly  
675 680 685

Gly Val Trp Glu Arg His Ala Val Asn Ala Asp Gly Lys Pro Leu Ile  
690 695 700

Asp Leu Gln Asp Lys Thr Met Gly Leu Ile Gln Arg Arg Arg Arg Ala  
705 710 715 720

Arg Ala Val Arg

<210> 10  
<211> 1390  
<212> ДНК  
<213> Вид Microbacterium

<220>  
<221> пізнаманітні ознаки  
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-005-G08

<220>  
<221> пізнаманітні ознаки  
<223> кодує 16S рибосомну РНК

<220>  
<221> пізнаманітні ознаки  
<222> (29)..(36)  
<223> п е а, с, г, т та інші

<220>  
<221> пізнаманітні ознаки  
<222> (38)..(41)  
<223> п е а, с, г, т та інші

<400> 10  
aacgggtgaac acggagcttg ctctgtggnn nnnnnngnnn ncgggtgagt aacacgtgag  
60  
caacctgccc ctgactctgg gataagcgtt ggaaacggcg tctaatactg gatacagagta  
120  
gcgatcgcat ggtagctac tggaagatt ttttggttg ggatgggctc gggccctatc  
180  
agcttggttg tgaggaatg gctcaccaag gcgtcgacgg gtagccggcc tgagagggtg  
240  
accggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat  
300  
attgcacaat ggccggaagc ctgatgcagc aacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg  
360  
ttgtaaacct cttttagcag ggaagaagcg aaagtgcagg tacctgcaga aaaagcgccg  
420  
gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggcgcc aagcgttata cggaattatt

480  
 540 gggcgtaaag agctcgtagg cggtttgtcg cgtctgctgt gaaatccga ggctcaacct  
 600 cgggcctgca gtgggtacgg gcagactaga gtgcggtagg ggagattgga attcctgggtg  
 660 tagcggtgga atgcgcagat atcaggagga acaccgatgg cgaaggcaga tctctgggcc  
 720 gtaactgacg ctgaggagcg aaaggggtggg gagcaaacag gcttagatac cctggtagtc  
 780 caccocgtaa acgttgggaa ctagttgtgg ggtccattcc acggattccg tgacgcagct  
 840 aacgcattaa gttccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga  
 900 cggggacccg cacaagcggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta  
 960 ccaaggcttg acatatacga gaacgggccca gaaatgggtca actctttgga cactcgtaaa  
 1020 caggtgggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg  
 1080 agcgcaacc cgtttctatg ttgccagcac gtaatgggtg gaactcatgg gatactgccg  
 1140 gggccaactc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgccccctta tgtcttgggc  
 1200 ttcacgcatg ctacaatggc cggtaaaaag ggctgcaata ccgtgagggt gagcgaatcc  
 1260 caaaaagccg gtcccagttc ggattgaggt ctgcaactcg acctcatgaa gtccggagtcg  
 1320 ctagtaatcg cagatcagca acgctgcggt gaatacgttc ccgggtcttg tacacaccgc  
 1380 ccgtcaagtc atgaaagtc gtaacacctg aagccggtgg cctaaccctt gtggaggagag  
 1390 ccgtcgaagg

<210> 11  
 <211> 532  
 <212> ДНК  
 <213> Вид Mycosphaerella  
 <220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> SGI бактеріальний ізолят SGI-010-H11  
 <220>



```

<221>  різноманітні ознаки
<223>  Внутрішній транскрибований спейсер 1_5.8S рибосомна ДНК

<220>
<221>  різноманітні ознаки
<222>  (43)..(43)
<223>  n e a, c, g, або t

<220>
<221>  різноманітні ознаки
<222>  (526)..(526)
<223>  n e a, c, g, або t

<400>  11
60  cggaggggatc attaatgagt gagggggcca cccccaacct ccnacccttt gtgaacgcat

catgttgctt cggggggcgac cctgccgttc gcggcattcc ccccgagggt catcaaaaca
120

ctgcattctt acgtcggagt aaaaagttaa ttttaataaaa ctttcaacaa cggatctctt
180

ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag taatgtgaat tgcagaattc
240

agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccccctg gtattccggg gggcatgcct
300

gttcgagcgt catttcacca ctcaagcctc gcttggtatt gggcgtcgog agtctctcgc
360

gcgcctcaaa gtctccggct gttcggttcg tctcccagcg ttgtggcaac tatttcgcag
420

tgagtagcga gtcgtggcgg cgtttaaatc tttcaaaggt tgacctcgga tcaggtaggg
480

ataccgctg aacttaagca tatcaataag cggaggaggt catagntggt tc
532

<210>  12
<211>  1431
<212>  ДНК
<213>  Вид Variovorax

<220>
<221>  різноманітні ознаки
<223>  SGI бактеріальний ізолят SGI-014-G01

<220>
<221>  різноманітні ознаки
<223>  кодує 16S рибосомну РНК

<400>  12
60  tgccttacac atgcaagtcg aacggcagcg cgggagcaat cctggcgggc agtggcgaa

gggtgagtaa tacatcgga cgtgcccaat cgtgggggat aacgcagcga aagctgtgct
120

```

```

180   aataccgcat acgatctacg gatgaaagca ggggatcgca agaccttgcg cgaatggagc
240   ggccgatggc agattaggta gttggtgagg taaaggctca ccaagccttc gatctgtagc
300   tgggtctgaga ggacgaccag ccacactggg actgagacac ggcccagact cctacgggag
360   gcagcagtgg ggaattttgg acaatgggcg aaagcctgat ccagccatgc cgcgtgcagg
420   atgaaggcct tcgggttgta aactgctttt gtacggaacg aaacggcctt ttctaataaa
480   gagggctaata gacggtaaccg taagaataag caccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg
540   taatacgtag ggtgcaagcg ttaatcgaa ttactgggcg taaagcgtgc gcaggcgggt
600   atgtaagaca gttgtgaaat ccccgggctc aacctgggaa ctgcatctgt gactgcatag
660   ctagagtacg gtagaggggg atggaattcc gcgtgtagca gtgaaatgcg tagatatgcg
720   gaggaacacc gatggcgaag gcaatcccct ggacctgtac tgacgctcat gcacgaaagc
780   gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat gtcaactggt
840   tgttgggtct tcactgactc agtaacgaag ctaacgcgtg aagttgaccg cctggggagt
900   acggccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacggggacc cgcacaagcg gtggatgatg
960   tggtttaatt cgatgcaacg cgaaaaacct taccacactt tgacatgtac ggaattcgcc
1020  agagatggct tagtgctcga aagagaaccg taacacaggt gctgcatggc tgtcgtcagc
1080  tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccttgtc attagttgct
1140  acattcagtt gggcactcta atgagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga
1200  cgtcaagtcc tcatggccct tataggtggg gctacacacg tcatacaatg gctggtacaa
1260  agggttgcca acccgcgagg gggagctaata ccataaaac cagtcgtagt ccggatcgca
1320  gtctgcaact cgactgcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgtggatcag aatgtcacgg

```

```

1380 tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagcg ggttctgcc
1431 gaagtagtta gcttaaccgc aaggagggcg attaccacgg cagggttcgt g

<210> 13
<211> 1424
<212> ДНК
<213> Bacillus amyloliquefaciens

<220>
<221> різноманітні ознаки
<223> SGI бактеріальний ізолят SGI-015-F03

<220>
<221> різноманітні ознаки
<223> кодує 16S рибосомну РНК

<400> 13
60 ctggcggcgt gcctaataca tgcaagtcga gcggacagat gggagcttgc tccctgatgt
120 tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt aacctgcctg taagactggg ataactccgg
180 gaaaccgggg ctaataccgg atggttgtct gaaccgcatg gttcagacat aaaaggtggc
240 ttcggctacc acttacagat ggaccgcgg cgcattagct agttggtgag gtaacggctc
300 accaaggcga cgatgcgtag ccgacctgag agggtgatcg gccacactgg gactgagaca
360 cggcccagac tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga
420 cggagcaacg ccgcgtgagt gatgaagggt ttcggatcgt aaagctctgt tgtagggaa
480 gaacaagtgc cgttcaaata gggcggcacc ttgacggtac ctaaccagaa agccacggct
540 aactacgtgc cagcagccgc ggttaatacgt aggtggcaag cgttgctccg aattattggg
600 cgtaaagggc tcgcaggcgg tttcttaagt ctgatgtgaa agccccggc tcaaccggg
660 agggtcattg gaaactgggg aacttgagtg cagaagagga gagtggaatt ccacgtgtag
720 cggtgaaatg cgtagagatg tggaggaaca ccagtggcga aggcgactct ctggtctgta
780 actgacgctg aggagcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtcac
gocgtaaacg atgagtgcta agtggttagg ggtttccgcc ccttagtgct gcagctaacg

```

840  
 900 cattaagcac tccgcctggg gagtacggtc gcaagactga aactcaaagg aattgacggg  
 960 ggcccgacaca agcgggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acottaccag  
 1020 gtcttgacat cctctgacaa tcctagagat aggacgtccc cttcgggggc agagtgcag  
 1080 gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc  
 1140 gcaacccttg atcttagttg ccagcattca gttgggcaact ctaagggtgac tgcgggtgac  
 1200 aaaccggagg aagggtggga tgacgtcaaa tcatcatgcc cottatgacc tgggctacac  
 1260 acgtgctaca atggacagaa caaagggcag cgaaaccgcg aggttaagcc aatcccacaa  
 1320 atctgttctc agttcggatc gcagtcgtca actcgactgc gtgaagctgg aatcgctagt  
 1380 aatcgcggat cagcatgccg cgggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgta  
 1424 caccacgaga gtttgaaca ccggaagtgc gtgaggtaac cttt

<210> 14  
 <211> 1425  
 <212> ДНК  
 <213> Bacillus subtilis  
 <220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> SGI бактеріальний ізолят SGI-015-H06  
 <220>  
 <221> різноманітні ознаки  
 <223> кодує 16S рибосомну РНК

<400> 14  
 60 gctggcgggc tgctaatac atgcaagtgc agcggacaga tgggagcttg ctccctgatg  
 120 ttagcgggcg acgggtgagt aacacgtggg taacctgcct gtaagactgg gataactccg  
 180 ggaaaccggg gctaataaccg gatggttgtt tgaaccgcat ggttcagaca taaaagggtg  
 240 cttcggttac cacttacaga tggaccgcgc gcgcattagc tagttggtga ggtaacggct  
 300 caccaaggca acgatgcgta gccgacctga gaggggtgat ggccacactg ggactgagac

360 acggcccaga ctccacggg aggcagcagt agggaaatctt ccgcaatgga cgaaagtctg  
 420 acggagcaac gccgcgtgag tgatgaagg tttcggatcg taaagctctg ttgttaggga  
 480 agaacaagtg ccgttcaaat agggcggcac cttgacggta cctaaccaga aagccacggc  
 540 taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttgccg gaattattgg  
 600 gcgtaaaggg ctgcagggc gtttcttaag tctgatgtga aagccccgg ctcaaccggg  
 660 gagggtcatt ggaaactggg gaacttgagt gcagaagagg agagtggaaat tccacgtgta  
 720 gcggtgaaat gcgtagagat gtggaggaa accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt  
 780 aactgacgct gaggagcgaa agcgtgggga gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca  
 840 cgcgtaaac gatgagtgtc aagtgttagg gggtttccgc cccttagtgc tgcagetaac  
 900 gcattaagca ctccgcctgg ggagtaaggc cgcaagactg aaactcaaag gaattgacgg  
 960 gggcccgcac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca  
 1020 ggtcttgaca tcctctgaca atcctagaga taggacgtcc ccttcggggg cagagtgaca  
 1080 ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag  
 1140 cgcaaccctt gatcttagtt gccagcatte agttgggcac tctaagggtga ctgccggtga  
 1200 caaacgggag gaagggtggg atgacgtcaa atcatcatgc ccottatgac ctgggctaca  
 1260 cacgtgctac aatggacaga acaaagggca gcgaaaccgc gaggttaagc caatcccaca  
 1320 aatctgttct cagttcggat cgcagctctgc aactcgactg cgtgaagctg gaatcgctag  
 1380 taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtaac accgccgctc  
 1425 acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc ggtgaggtaa ccttt

<210> 15  
 <211> 37

```

<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР праймер M13-ITS1

<400> 15
tgtaaaacga          cggccagttt          cgtaggtgaa          cctgcgg

37

<210> 16
<211> 38
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР праймер ITS4-M13

<400> 16
caggaaacag          ctatgacctc          ctccgcttat          tgatatgc

38

<210> 17
<211> 39
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР праймер M13-27F Bac

<400> 17
tgtaaaacga          cggccagtta          gagtttgatc          ctggctcag

39

<210> 18
<211> 37
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> ПЛР праймер 1492R-M13 Bac

<400> 18
caggaaacag          ctatgaccgg          ttaccttggt          acgactt

37

```

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділений мікробний штам, який є штамом SGI-014-C06 роду *Microbacterium* sp., депонований NRRL B-50470, і його варіанти, які мають пестицидну активність, де штам і його варіанти мають супресорну активність щодо фузаріозу.
2. Виділений мікробний штам за п. 1, де вказаний мікробний штам містить послідовність ДНК SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Біологічно чиста культура мікробного штаму за п. 1.
4. Збагачена культура мікробного штаму за п. 1.
5. Композиція, яка містить мікробний штам або його культуру за будь-яким із пп. 1-4 і ефективну для сільськогосподарського виробництва кількість сполуки або композиції, вибраних із групи, яка складається з акарициду, бактерициду, фунгіциду, інсектициду, мікробіциду, нематоциду,
- 15 пестициду і добрива.
6. Композиція, яка містить мікробний штам або його культуру за будь-яким із пп. 1-4 і носій.
7. Композиція за п. 6, де вказаним носієм є носій, прийнятний для сільського господарства.
8. Композиція за п. 6, де вказаним носієм є насінина рослини.
9. Композиція за п. 6, де вказану композицію отримують в формі складу, вибраного із групи, яка
- 20 складається з емульсії, колоїду, пилоподібного препарату, гранули, кульки, порошку, спрею, емульсії і розчину.

10. Композиція за п. 6, де вказана композиція являє собою склад, який покриває насіння.
11. Насінина, яке має покриття, що містить композицію за п. 6, де покриття насіння пригнічує фузаріоз у рослини, яка росте з насіння.
12. Спосіб запобігання, інгібування або обробки проти розвитку фузаріозу, де вказаний спосіб
- 5 включає вирощування мікробного штаму або його культуру за будь-яким із пп. 1-4 в середовищі для росту або ґрунті рослини-хазяїна перед вирощуванням або одночасно з вирощуванням рослини-хазяїна у вказаному середовищі для росту або ґрунті.
13. Спосіб за п. 12, де вказаний фітопатоген викликає фузаріоз.
14. Спосіб за п. 13, де вказаним фітопатогеном є *Fusarium graminearum*.
- 10 15. Спосіб запобігання, інгібування або обробки проти розвитку фузаріозу рослини, де вказаний спосіб включає нанесення на рослину або на навколишнє середовище рослини ефективної кількості мікробного штаму або його культури за будь-яким із пп. 1-4.
16. Спосіб за п. 15, де вказаний мікробний штам або його культуру наносять на ґрунт, насіння, коріння, квітку, листок, частину рослини або всю рослину.
- 15 17. Спосіб за п. 15, де вказана рослина є сприйнятливою до *Fusarium graminearum*.
18. Спосіб за п. 15, де вказаною рослиною є пшениця, кукурудза, ячмінь або овес.
19. Спосіб за п. 15, де вказаний мікробний штам або його культура є встановленим(ою) як ендосит до вказаної рослини.
- 20 20. Рослина, яка є рослиною, штучно інфікованою мікробним штамом або його культурою за будь-яким із пп. 1-4.
21. Спосіб отримання сільськогосподарської композиції, який включає стадії, на яких інокують мікробний штам або його культуру згідно з будь-яким із пп. 1-4 в або на субстрат і дають вказаному мікробному штаму або його культурі рости при температурі 1-37 °C до отримання клітин або спор у кількості щонайменше  $10^2$ - $10^3$  на мілілітр або на грам.
- 25 22. Штам *Microbacterium sp.*, який включає послідовність ДНК SEQ ID NO: 1, де вказаний штам *Microbacterium sp.* має супресорну активність щодо фузаріозу.

---

Комп'ютерна верстка О. Рябко

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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