



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120250** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

C12N 1/14 (2006.01)

A01H 15/00

A01N 63/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 09381**

(22) Дата подання заявки: **06.03.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **11.11.2019**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **61/773,722**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **06.03.2013**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **US**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **25.11.2015, Бюл.№ 22**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.11.2019, Бюл.№ 21**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **РСТ/IB2014/059479,
06.03.2014**

(72) Винахідник(и):

**Хум Девід Едвард (NZ),
Джонсон Річард Девід (NZ),
Сімпсон Уейн Ройдон (NZ),
Кард Стюарт Дуглас (NZ)**

(73) Власник(и):

**ЗЕ ГРЕЙНС РІСЬОРЧ ЕНД
ДЕВЕЛОПМЕНТ КОРПОРЕЙШН,
Level 1, 40 Blackall Street Barton, ACT 2600,
Australia (AU),
ГРАССЛАНЗ ТЕКНОЛОДЖІ ЛІМІТЕД,
10 Bisley Road, Hamilton 3240, New Zealand
(NZ)**

(74) Представник:

**Кістерський Тимофій Арсенійович,
реєстр. №457**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

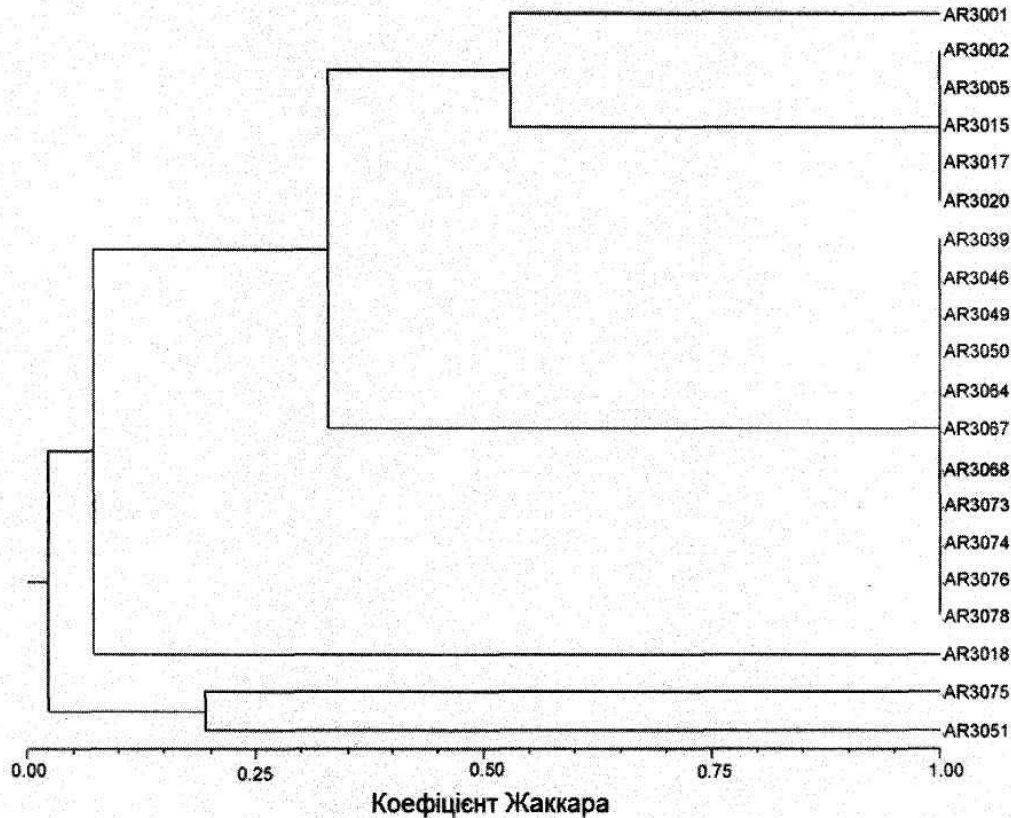
WO 2008/100892 A2, 21.08.2008
US 2012/0144533 A1, 07.06.2012
WO 2004/082384 A2, 30.09.2004
US 2010/0024076 A1, 28.01.2010
WO 02/13616 A2, 21.02.2002
Linda Johnson, "THE EXPLOITATION OF
EPICHLAE ENDOPHYTES FOR
AGRICULTURAL ADVANTAGE", COST-
Action "Endophytes in Biotechnology and
Agriculture": Working Group 1-4 Meeting:
Endophytes: From discovery to application,
Trento/S. Michele, Italy November 12-14,
2012, pages 1 - 41
A B LLOYD, "The Endophytic Fungus of
Perennial Ryegrass", NEW ZEALAND
JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH
2, 01.12.1959, pages 1187 - 1194
STUART D. CARD ET AL, "Mutualistic fungal
endophytes in the Triticeae - survey and
description", FEMS MICROBIOLOGY
ECOLOGY., NL, 2014, vol. 88, no. 1, ISSN
0168-6496, pages 94 - 106

**(54) ВИДІЛЕНИЙ ШТАМ ГРИБКОВОГО ЕНДОФИТА ВИДУ НЕОТУРНОДИУМ ГРУПИ ЕРІСНЛОЕ ДЛЯ
ПІДВИЩЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО ШКІДНИКІВ ТА/АБО ХВОРОБ ШТУЧНО ІНФІКОВАНИХ РОСЛИН SECALE
SPP. (ВАРІАНТИ) ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**

(57) Реферат:

UA 120250 C2

Винахід стосується принаймні одного штаму грибкового ендоефіта групи *Epichloae*, який при об'єднанні з принаймні одним видом *Secale spp.* надає захист від шкідників рослині *Secale spp.* Зокрема, винахід стосується виділеного штаму грибкового ендоефіта групи *Epichloae*, вибраного з групи, що складається з NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50577, NRRL 50578, NRRL 50718, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50721, NRRL 50722, NRRL 50723 та NRRL 50724 та їх комбінацій, рослини *Secale spp.*, інфікованої грибковим ендоефітом, де *Secale spp.* не є природним хазяїном ендоефіта, способу одержання стабільної комбінації рослини-хазяїна/грибкового ендоефіта групи *Epichloae*, способу надання захисту від шкідників рослини-хазяїну *Secale spp.*, та насіння *Secale spp.*, інфікованого грибковим ендоефітом групи *Epichloae*.



ФІГ. 1

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід загалом стосується ендوفітів роду епіхлое (*Epiclloae*), які утворюють стабільну симбіотичну асоціацію із житом (*Secale cereale*).

ВІДОМИЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Secale cereale, загальновідомий як жито, вирощується в усьому світі, типово для виробництва зерна. Зерно використовують переважно для виробництва борошна, хліба та для прямого споживання, особливо в країнах, що мають традицію споживання житнього хліба. Вегетативні частини *S. cereale* можуть бути використані як солома, або перетворені на силос, для використання як корм для тварин, в тому числі при загінному випасу (*in situ grazing*).

Як було відзначено вище, жито переважно вирощують на зерно. Отже, потрібний ефективний захист від шкідників під час вирощування для забезпечення виробництва великої кількості зерна прийнятної якості. Жито типово вважають осінньою культурою, насіння якої звичайно висівають восені. Сівозміна з іншими зерновими або польовими культурами може бути використана для зменшення накопичення шкідників та/або грибкових хвороб, які присутні у ґрунті або розвиваються в пожнивних рештках.

Основні шкідники жита включають, без обмеження, попелицю; трипсів; дротяників та личинок хрущів; личинок комарів-довгоніжок (*Tipula* spp.); озиму муху (*Delia coarctata*); вузькокрилих молей-мінерів (*Agromyza* spp.); шведську муху (*Oscinella frit*); жужелицю (*Zabrus tenebrioides*); галицю злакову сідельну (*Haplodiplosis marginata*); п'явиць (*Oulema melanopus*, *O. gallaeciana*); нематод; та слимаків.

Відомі способи боротьби зі шкідниками жита включають деякі або усі з таких заходів: використання стійких до шкідників сортів рослин, оптимізація часу посіву та посів здоровим насінням, ефективна сівозміна, знищення та/або захоронення або видалення пожнивних рештків (стерні). Додаткові способи боротьби зі шкідниками, що можуть виявитися потрібними, включають обробку різними пестицидами рослин та/або насіння. Інколи для боротьби зі шкідниками може бути потрібним одночасне нанесення двох чи більше активних речовин.

Однак, використання багатьох пестицидів може бути проблематичним через відомі проблеми, асоційовані з хімікатами, часто використовуваними для таких цілей. Багато пестицидів є токсичними і можуть бути небезпечними для людей та тварин, що є споживачами оброблених сільськогосподарських культур (Casida and Quistad, 1998). Зокрема, накопичення у людей та тварин токсичних пестицидів може призводити до серйозних проблем зі здоров'ям у осіб, особливо на ранніх стадіях розвитку. Наприклад, дія пестицидів пов'язувалася з респіраторними розладами, раками розвитку, і було показано, що вони мають довготривалі ефекти на розвиток розумової здатності (Zejda et al., 1993).

Використання пестицидів може бути ускладненим з погляду контролю в змінних умовах навколишнього середовища, що приводять до небажаного розсіювання токсичних сполук, наприклад, в результаті зносу розпилюваних матеріалів або вилуговування ґрунту. Крім того, у шкідників може розвиватися резистентність до пестицидів з ряду причин, включаючи неналежні практику та поводження, які можуть створювати реальну загрозу врожайності (зерна). Відповідно, існує потреба у заходах боротьби зі шкідниками, які б не використовували нанесення пестицидів.

Метою даного винаходу є створення принаймні одного штаму грибкових ендوفітів роду епіхлое, який при поєднанні з принаймні одним видом *Secale* spp. надає принаймні деякий рівень захисту від шкідників рослині *Secale* spp., та/або забезпечує для спільноти корисний вибір.

Коли в даному описі наводяться посилання на описи патентів, інші зовнішні документи або інші джерела інформації, це загалом робиться з метою забезпечення контексту для обговорення ознак винаходу. Якщо конкретно не зазначено інше, посилання на такі зовнішні документи не слід тлумачити як припущення того, що такі документи, або такі джерела інформації, в будь-якій юрисдикції, є відомим рівнем техніки, або утворюють частину загальновідомого знання в цій галузі техніки.

СУТЬ ВІНАХОДУ

В першому аспекті, даний винахід стосується виділеного штаму грибкових ендوفітів роду епіхлое (*Epiclloae*), вибраного з групи, що складається з AR3039 (NRRL# 50716), AR3046 (NRRL# 50576), AR3049 (NRRL#50577), AR3050 (NRRL# 50578), AR3064 (NRRL# 50718), AR3067 (NRRL# 50719), AR3068 (NRRL# 50720), AR3073 (NRRL# 50721), AR3074 (NRRL# 50722), AR3076 (NRRL# 50723) та AR3078 (NRRL# 50724) та їх комбінацій. Краще, винахід стосується штамів AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 та AR3078, краще, AR3046, AR3050 або AR3068.

В одному варіанті реалізації, виділений штам є біологічно чистим.

В другому аспекті винахід стосується рослини *Secale* spp., інфікованої грибковим ендоефітом, причому *Secale* spp. не є природним хазяїном ендоефіта, і рослина та ендоефіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію, що дозволяє рослині розвиватися в нормальному життєвому циклі.

5 В одному варіанті реалізації, ендоефіт передається від першого покоління *Secale* spp. другому поколінню *Secale* spp. шляхом вертикальної передачі. Краще, вертикальна передача від першого покоління рослин-хазяїв другому поколінню рослин-хазяїв відбувається через насіння.

10 В одному варіанті реалізації ендоефіт є ендоефітом, виділеним з *Elymus* spp. Краще, ендоефіти виділені з *Elymus mutabilis*. Краще, ендоефіт є ендоефітом з роду епіхлое (*Epichloae*). Краще, ендоефіт з роду епіхлое є ендоефітом, що належить до штаму роду епіхлое, вибраного з групи, що складається з AR3039 (NRRL# 50716), AR3046 (NRRL# 50576), AR3049 (NRRL#50577), AR3050 (NRRL# 50578), AR3064 (NRRL# 50718), AR3067 (NRRL# 50719), AR3068 (NRRL# 50720), AR3073 (NRRL# 50721), AR3074 (NRRL# 50722), AR3076 (NRRL# 50723) та AR3078 (NRRL# 50724), або їх комбінацій. Краще, винахід стосується ендоефітів штамів AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 та AR3078, краще, AR3046, AR3050 або AR3068.

В одному варіанті реалізації, *Secale* spp., інфіковані грибковим ендоефітом, не демонструють зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції.

20 В одному варіанті реалізації, *Secale* spp., інфіковані грибковим ендоефітом, демонструють нормальний морфологічний фенотип.

В одному варіанті реалізації, *Secale* spp., інфіковані грибковим ендоефітом, продукують полінолі алкалоїди та/або пераміни.

25 В одному варіанті реалізації, *Secale* spp., інфіковані грибковим ендоефітом, мають підвищену резистентність до одного чи декількох шкідників або підвищену резистентність до хвороби рослин, або обидві, у порівнянні з *Secale* spp., не інфікованими грибковим ендоефітом.

В одному варіанті реалізації, *Secale* spp., інфіковані грибковим ендоефітом, мають підвищену резистентність до одного чи декількох шкідників, де один чи декілька шкідників вибрані з групи, що складається з: (1) видів попелиць (*Aphididae*), представлених *Rhopalosiphum padi*, *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum maidis*, *Metopolophium dirhodum*, *Sitobion* spp., *Sitobion avenae*, *Sitobion fragariae*, *Diuraphis noxius*; (2) видів злакових та зернових мух (*Agromyzidae*; *Anthomyiidae*, *Chloropidae*, *Cepidae* та *Cecidomyiidae*), представлених *Oscinella frit*, *Oscinella pusilla*, *Mayetiola destructor*, *Cerodontha* spp., *Cerodontha australis*, *Cerodontha angustipennis*, *Formia fumigata*, *Meromyza americana*, *Haplodiplosis marginata*, *Chlorops pumilionis*, *Tipula* spp. *Chromatomyia fuscata*, *Cephus pygmaeus*, *Chromatomyia fuscata*, *Contarinia tritici*; (3) видів трипсів (*Thripidae*), представлених *Limothrips cerealis*, *Limothrips denticornis*, *Aptinotrips rufus*, *Stenotrips graminum*; (4) видів коників та цвіркунів (*Acridae* та *Gryllidae*), представлених *Locusta migratoria*, *Phaulacridium marginale*, *Phaulacridium vittatum*, *Melanoplus* spp., *Teleogryllus commodus*; (5) видів клопів (*Lygaeidae*), представлених *Nyssius huttoni*, *Blissus leucopertus* *leucopertus*; (6) видів довгоносиків (*Curculionidae*), представлених *Sphenophorus* spp.; (7) видів совок (похідний черв'як та озимий черв'як) (*Noctuidae*), представлених *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera* spp., *Mythimna separata*, *Persectania aversa*, *Agrostis ipsilon*; (8) видів листоїдів (*Chrysomelidae*), представлених *Oulema melanopus*; (9) личинок хрущів (*Scarabaeidae*), представлених видами *Popillia japonica*, *Costelytra zealandica*, *Phyllopertha* spp., *Rhizotrogus majalis*, *Anisoplia segetum*; (10) видів борошнистого червця (*Pseudococcidae* та *Coccidae*), представлених *Phenacoccus hordei*, *Balanococcus poae*, *Ripersella rumicis*, *Porphyrphora tritici*; (11) видів дротяників (*Elateridae*), представлених *Conoderus* spp., *Limonius* spp.; видів жуків (*Carabidae*), представлених *Zabrus tenebrioides*; (13) видів кліщів (*Eriophyidae* та *Pentheleidae*), представлених *Pentheleus* spp., *Halotydeus destructor*, *Aceria* spp.; (14) видів шкідників запасів продуктів (*Curculionidae*, *Silvanidae*, *Pylalidae*, *Gelechiidae*, *Tenebrionidae*, *Bostrichidae*), представлених *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Sitotroga cerealella*, *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes* spp., *Oryzaephilus surinamensis*, *Cadra cautella*, *Plodia interpunctella*, *Tribolium confusum*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma erricorne*; (15) видів пінниць (*Cercopoidea*), представлених *Philaenus spumarius*; (16) видів нематод, представлених кореневою нематодою (*Pratylenchus* spp., зокрема *P. thornei*, *P. crenatus*, *P. neglectus* та *P. penetrans*), вівсяною нематодою (*Heterodera* spp. та *Punctodera* spp., зокрема *H. avenae*, *H. latipons*, *H. hordecalis*, *H. filipjevi*, *H. mani*, *H. bifenestra*, *H. pakistanensis* та *P. punctata*), галовою нематодою (*Meloidogyne* spp., зокрема *M. chitwoodi*, *M. naasi*, *M. artiellia*, *M. microtyla*, *M. ottersoni*, *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. kikuyensis* та *M. spartinae*), стебловою нематодою (*Ditylenchus* spp., зокрема *D. dipsicai* та *D. radicola*); пшеничною нематодою (*Anguina tritici*); (16) видів слимаків (*Deroceras reticulatum* та *Arion* spp., зокрема *A. hortensis* agg. та *A. subfuscus*). В одному варіанті реалізації,

шкідники є нематодами, краще, кореневими нематодами (*Pratylenchus* spp.), або мінуючими мухами *Cerodontha australis* (Diptera: Agromyzidae), також відомими як wheat sheath miner (мінер піхви листя пшениці).

В одному варіанті реалізації, *Secale* spp., інфіковані грибковим ендоефітом, мають підвищену резистентність до хвороби рослин, де хвороба рослин спричинена рослинним патогеном, вибраним з групи, що складається з вірусу жовтої карликовості ячменю (*Luteovirus*), ґрунтового вірусу мозаїки пшениці (*Furovirus*) та вірусу смугастої мозаїки пшениці (*Tritimovirus*), *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum graminicola*, *Glomerella graminicola* [телеоморфа], *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum*, *Mycosphaerella tassiana* [телеоморфа], *Episcoccum* spp., *Sporobolomyces* spp., *Stemphylium* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Cochliobolus sativus* [телеоморфа], *Fusarium* spp., *Tilletia caries*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia foetida*, *Hymenula cerealis*, *Cephalosporium gramineum*, *Helminthosporium sativum*, *Cochliobolus sativus* [телеоморфа], *Coprinus sychromorbidus*, *Dilophospora alopecuri*, *Tilletia controversa*, *Claviceps purpurea*, *Sphacelia segetum* [анаморфа], *Fusarium culmorum*, *Pseudoseptoria donacis*, *Selenophoma donacis*, *Neovossia indica*, *Tilletia indica*, *Puccinia recondita*, *Aecidium clematidis* [анаморфа], *Cercosporidium graminis*, *Scolicotrichum graminis*, *Phaeosphaeria herpotrichoides*, *Leptosphaeria herpotrichoides*, *Ustilago tritici*, *Microdochium nivale*, *Fusarium nivale*, *Monographella nivalis* [телеоморфа], *Erysiphe graminis*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium ultimum*, *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum* [анаморфа], *Septoria secalis*, *Septoria tritici*, *Mycosphaerella graminicola* [телеоморфа], *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia zeae*, *Blumeria* spp., *Ceratobasidium cereale* [телеоморфа], *Myriosclerotinia borealis*, *Sclerotinia borealis*, *Typhula idahoensis*, *Typhula incarnate*, *Typhula ishikariensis*, *Typhula ishikariensis* var. *canadensis*, *Stagonospora nodorum*, *Septoria nodorum*, *Phaeosphaeria nodorum* [телеоморфа], *Leptosphaeria nodorum*, *Urocystis occulta*, *Puccinia graminis*, *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Tapesia acuformis* [телеоморфа], *Uredo glumarum* [анаморфа], *Pyrenophora tritici-repentis*, *Drechslera tritici-repentis* [анаморфа], *Helminthosporium tritici-repentis*, *Puccinia triticina*, *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis* та *Fusarium pseudograminearum*.

Краще, рослинним патогеном є *Puccinia recondita*, *Puccinia triticina*, *Puccinia graminis*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani* або *Fusarium pseudograminearum*.

В одному варіанті реалізації, *Secale* spp., інфіковані грибковим ендоефітом, вибирають з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*. Краще, *Secale* spp. є *Secale cereale*.

В третьому аспекті винахід стосується способу одержання стабільної комбінації рослина-хазяїн/грибковий ендоефіт роду епільохе (*Epichloa*), який включає штучне інфікування рослини *Secale* spp. принаймні одним грибковим ендоефітом, що утворює стабільну комбінацію з інокльованою рослиною, де рослина-хазяїн не демонструє зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції.

В одному варіанті реалізації, стабільна комбінація рослина/грибок є достатньо стабільною, щоб дозволити вертикальну передачу ендоефітів. В одному варіанті реалізації, вертикальна передача здійснюється за допомогою відростків, особливо, квітковими пагонами, що дають насіння (floral tillers into seed), або частин, придатних для вегетативного розмноження. Краще, вертикальна передача від першого покоління рослин-хазяїв другому поколінню рослин-хазяїв відбувається через насіння.

В одному варіанті реалізації, вертикальна передача ендоефітів приводить до вертикальної передачі ендоефітів від першого покоління другому поколінню рослин-хазяїв. Краще, вертикальна передача від першого покоління рослин-хазяїв другому поколінню рослин-хазяїв відбувається через насіння.

В одному варіанті реалізації, спосіб додатково включає стадію вибору рослини-хазяїна *Secale*, яка не виявляє зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції, з популяції інфікованих рослин-хазяїв.

В четвертому аспекті винахід стосується способу надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників рослини-хазяїну *Secale* spp., який включає штучне інфікування рослини *Secale* spp. принаймні одним грибковим ендоефітом роду епільохе (*Epichloa*) де комбінація грибковий ендоефіт-рослина *Secale* продукує принаймні один алкалоїд на рівні, достатньому для надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників рослини-хазяїну.

В п'ятому аспекті, винахід стосується способу надання захисту від шкідників рослини-хазяїну *Secale* spp., який включає штучне інфікування рослини *Secale* spp. принаймні одним грибковим

ендофітом роду епіхлое (*Epichloae*), де комбінація грибовий ендоефіт-рослина *Secale* продукує принаймні один алкалоїд, що надає зазначеного захисту від шкідників рослині-хазяїну.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, принаймні один алкалоїд є алкалоїдом, вибраним з групи, що складається з пераміну, N-ацетилнорлоліну, лоліну, N-форміллоліну, N-ацетиллоліну та N-метиллоліну.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, принаймні один алкалоїд є лоліном або пераміном або обома.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, лолін продукується на рівні принаймні 25 мкг/г.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, лолін продукується на рівні, вказаному у Таблиці 7 для лоліну.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, лолін продукується в діапазоні значень від принаймні 25 мкг/г до приблизно 3660 мкг/г.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, перамін продукується на рівні принаймні 1 мкг/г.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, перамін продукується на рівні, вказаному у Таблиці 7 для пераміну.

В одному варіанті реалізації четвертого або п'ятого аспектів, перамін продукується в діапазоні значень від принаймні 1 мкг/г до приблизно 45 мкг/г.

В одному варіанті реалізації, спосіб додатково включає стадію вибору комбінації грибовий ендоефіт-рослина *Secale*, що продукує принаймні один алкалоїд на рівні, достатньому для надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників рослині-хазяїну.

В шостому аспекті, винахід стосується насіння *Secale* spp., інфікованого грибовими ендоефітами роду епіхлое (*Epichloae*). Краще, насіння *Secale* spp. є насінням *Secale* spp., вибраних з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*. Ще краще, насіння є насінням *Secale cereale*.

В одному варіанті реалізації будь-якого з третього, четвертого, п'ятого або шостого аспектів винаходу, викладених вище, *Secale* spp. вибирають з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*. Краще, *Secale* spp. є *Secale cereale*.

В одному варіанті реалізації будь-якого з третього, четвертого, п'ятого або шостого аспектів винаходу, викладених вище, принаймні один грибовий ендоефіт є ендоефітом, виділеним з *Elymus* spp.

Краще, грибовий ендоефіт виділений з *Elymus mutabilis*. Краще, грибовий ендоефіт є ендоефітом з роду епіхлое (*Epichloae*). Краще, ендоефіта з роду епіхлое вибирають з групи, що складається з AR3039 (NRRL# 50716), AR3046 (NRRL# 50576), AR3049 (NRRL#50577), AR3050 (NRRL# 50578), AR3064 (NRRL# 50718), AR3067 (NRRL# 50719), AR3068 (NRRL# 50720), AR3073 (NRRL# 50721), AR3074 (NRRL# 50722), AR3076 (NRRL# 50723) та AR3078 (NRRL# 50724) та їх комбінацій. Краще, винахід стосується штамів AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 та AR3078, краще, AR3046, AR3050 або AR3068.

Інші аспекти винаходу можна зрозуміти з наведеного далі опису, який представлений лише як приклад та з посиланнями на супровідні креслення.

СТИСЛИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Винахід буде далі описаний лише для прикладу та з посиланнями на креслення, на яких:

Фігура 1 зображує дендрограму філогенетичних взаємозв'язків, основу на розмірах алеля SSR, вказаних у Таблиці 2.

Фігура 2 зображує чотири рослини *Secale cereale*, сорт Rahu; одна неінфікована (E-); та три інфіковані AR3046. Зліва направо: нормальна, карликова та низькоросла морфологія. E- та AR3046-інфіковані нормальні та карликові рослини дають квітки, низькоросла - ні.

Фігура 3 зображує кількість пінявих виділень личинок або число пінниць/рослину, спостережуваних на рослинах *Secale cereale*, сорт Rahu, інфікованих ендоефітами AR3046 (Rahu AR3046), та на неінфікованих рослинах (Rahu Nil). Також показана кількість пінявих виділень личинок або число пінниць/рослину, спостережуваних на рослинах вівсяниці лугової (*Festuca pratensis* syn. *Lolium pratense* syn. *Schedonorus pratensis*), інфікованих її природними ендоефітами *Neotyphodium uncinatum* (MF E+), та на неінфікованих рослинах (MF E-).

Фігура 4 показує, що певні штами ендоефітів істотно ($P \leq 0,05$) інгібували міцеліальний ріст *Fusarium graminearum* у подвійній культурі (дані з неопублікованого дослідження Stuart Card, AgResearch Ltd).

Фігура 5 показує штами ендоефітів зернових, які істотно ($P \leq 0,05$) інгібували міцеліальний ріст *Rhizoctonia solani* у подвійній культурі (дані з неопублікованого дослідження Stuart Card,

AgResearch Ltd).

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Визначення

Наступні визначення призначені для кращого опису даного винаходу та як посібник для рядових фахівців в цій галузі техніки у практиці даного винаходу.

Якщо не зазначено інше, усі технічні та наукові терміни, використовувані в даному документі, слід розуміти як такі, що мають значення, зрозумілі рядовим фахівцям у відповідній галузі техніки, до якої належить даний опис. Приклади визначень звичайних термінів ботаніки, мікробіології, молекулярної біології та біохімії можна знайти у Biology of Plants, Raven et al. (eds.), W.H. Freeman and Company, (2005); Plant Physiology, Taiz et al. (eds.), Sinauer Associates, Incorporated, (2010); Botany: An Introduction to Plant Biology, J.D. Mauseth, Jones & Bartlett Learning, (2003); Methods for General and Molecular Microbiology, 3rd Edition, C.A. Reddy, et al. (eds.), ASM Press, (2008); Encyclopedia of Microbiology, 2nd ed., Joshua Lederburg, (ed.), Academic Press, (2000); Microbiology By Cliffs Notes, I. Edward Alcamo, Wiley, (1996); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (2d ed.) (1994); Biology of Microorganisms 11th ed., Brock et al., Pearson Prentice Hall, (2006); Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, Mueller et al., Academic Press, (2004); Genes IX, Benjamin Lewin, Jones & Bartlett Publishing, (2007); The Encyclopedia of Molecular Biology, Kendrew et al. (eds.), Blackwell Science Ltd., (1994); Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, Robert A. Meyers (ed.), VCH Publishers, Inc., (1995); Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. Schardl CL et al. (2004) Annual Review of Plant Biology 55: 315-340; та Chemotype diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses, Schardl CL, Young CA, Faulkner JR, Florea S, Pan J (2012) Fungal Ecology 331-344 (Schardl et al., 2012).

Вважається також, що практика даного винаходу може здійснюватися з використанням стандартних ботанічних, мікробіологічних, молекулярно-біологічних та біохімічних протоколів та процедур, відомих фахівцям та описаних, наприклад, в Methods of Studying Root Systems, vol. 33, Wolfgang Böhm, Springer-Verlag, (1979); Root methods: A Handbook, Albert L. Smit Springer, (2000); Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods, Mueller et al., Academic Press, (2004); Environmental Microbiology: Methods and Protocols, J.F.T. Spencer et al., Humana Press, (2004); Environmental Microbiology, P.D. Sharma, Alpha Science International, (2005); Environmental Microbiology, J.R. Leadbetter, Gulf Professional Publishing, (2005), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1982); Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989); Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S.L. Berger and A.R. Kimmmerl (Eds.), Academic Press Inc., (1987); Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses. 1994 Bacon and White (Eds.) та інші загальнодоступні довідкові матеріали, що стосуються галузі техніки, до якої належить даний винахід, які усі включені за посиланням до даного документа в повному обсязі.

Термін “рослина”, у використовуваному в даному документі значенні, охоплює цілі рослини та усі частини рослини з усіх стадій життєвого циклу рослини, включаючи, без обмеження, вегетативні та репродуктивні клітини та тканини, частини рослин, призначені для вегетативного розмноження, насіння, ембріони, паростки, стебла, листя, листові піхви та пластинки, суцвіття, корені, пиляки, лігули, палісад, мезофіл, епідерміс, вушки листків, верхню квіткову лусочку, нижню квіткову лусочку та пагони.

Термін “епіхлое (Epichloae)”, у використовуваному в даному документі значенні, стосується збірної групи грибкових ендوفітів, яка включає два роди грибкових ендوفітів: члени формального роду анаморфів *Neotyphodium* та члени телеоморфного роду *Epichloë*.

Термін “ендوفіти з роду епіхлое (Epichloae)”, у використовуваному в даному документі значенні, стосується ендوفітів групи “епіхлое (Epichloae)”, що, як відомо фахівцям або було показано в даному документі, утворюють симбіотичну асоціацію з рослиною-хазяїном.

Термін “надає принаймні деякий рівень захисту від шкідників”, у використовуваному в даному документі значенні, охоплює вимірне зниження частоти, тяжкості та/або тривалості впливу шкідника на рослину *Secale* spp. Краще, вимірне зниження є статистично значущим зниженням з Р-значенням 0,05 чи менше.

Термін “рівень, достатній для надання захисту від шкідників”, у використовуваному в даному документі значенні, з посиланням на рівні алкалоїдів, означає будь-який рівень алкалоїду, продукований симбіозом рослина-ендوفіт, що є достатнім для створення вимірного зниження частоти випадків, тяжкості або тривалості зараження шкідником, інфекції або шкідливого ефекту на рослину-хазяїна *Secale* spp., інфіковану грибковим ендوفітом відповідно до винаходу. Краще, алкалоїд є пераміном або лоліном або похідним лоліну. Краще, вимірне зниження є статистично значущим зниженням з Р-значенням 0,05 чи менше.

Термін "статистично значущий", у використовуваному в даному документі значенні, стосується ймовірності того, що результат чи співвідношення спричинені чимось іншим, ніж випадковістю. Результат може бути визначений як статистично значущий шляхом перевірки статистичної гіпотези, як відомо та робиться фахівцями в цій галузі техніки. Перевірка статистичної гіпотези дає "Р-значення", як відомо фахівцям, яке показує ймовірність того, що виміряний результат викликаний однією лише випадковістю. Фахівці вважають, що загальноприйнятні рівні значущості, які становлять 5% (0,05) чи нижче, є статистично значущими.

Термін "підсилений захист від шкідників", у використовуваному в даному документі значенні, стосується рівня захисту від шкідників, що надається рослині *Secale* spp. в симбіотичній асоціації з грибовими ендоефітами роду *Epichloa* (*Epichloae*), який зменшує частоту, тяжкість та/або тривалість зараження шкідниками, інфекції або шкідливого ефекту на рослину внаслідок присутності та/або активності даного шкідника у порівнянні з частотою, тяжкістю та/або тривалістю таких саме зараження шкідниками, інфекції та/або шкідливого ефекту на рослину *Secale* spp., що не має грибових ендоефітів (контрольна рослина), та/або рослину *Secale* spp., що має інші грибові ендоефіти.

Терміни "штучне інфікування" та "штучна інокуляція", у використовуваному в даному документі значенні, охоплює будь-яку інокуляцію рослини, особливо рослини *Secale* spp., зокрема *Secale cereale*, грибовим ендоефітом з утворенням симбіотичної асоціації рослина/грибок, яка є невідомою в природних умовах.

Термін "in planta", у використовуваному в даному документі значенні, в контексті грибових ендоефітів стосується ендоефіту, коли він живе симбіотично у рослині-хазяїні.

Термін "стабільний симбіоз рослина/грибок", у використовуваному в даному документі значенні, стосується симбіотичної асоціації, яка зберігається протягом життєвого циклу рослини, де рослина не демонструє зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції. В "стабільній симбіотичній комбінації" рослина-хазяїн інфікується ендоефітом в першому поколінні та продукує насіння, при пророщуванні якого виростає друге покоління рослин-хазяїв, які також є інфікованими ендоефітом.

Термін "нормальний життєвий цикл", у використовуваному в даному документі значенні, стосується нормального репродуктивного циклу *Secale*, який включає ріст першого покоління рослини з продукуванням насіння, при пророщуванні якого виростає друге покоління рослини.

Термін "не демонструє зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції", у використовуваному в даному документі значенні, з посиланням на рослину-хазяїна, що містить грибового ендоефіта, означає, що рослина-хазяїн має по суті нормальний морфологічний фенотип, відомий фахівцям для цієї рослини-хазяїна. При цьому, "по суті нормальний морфологічний фенотип" рослини-хазяїна, у використовуваному в даному документі значенні, стосується типової морфології рослини-хазяїна, відомої та загальноприйнятої в даній галузі техніки для цієї рослини-хазяїна при даних умовах росту.

Термін "нормальний фенотип" рослини-хазяїна, у використовуваному в даному документі значенні, стосується типової морфології, росту та інших фенотипових характеристик рослини-хазяїна, що виявляються протягом життєвого циклу рослини-хазяїна, включаючи репродуктивний цикл рослини-хазяїна та насіння рослини-хазяїна, як відомо та є загальноприйнятим в цій галузі техніки для цієї рослини-хазяїна, коли вона не містить ендоефіта.

Термін "аномальний фенотип" по відношенню до рослини-хазяїна, у використовуваному в даному документі значенні, стосується морфології, росту або інших фенотипових характеристик рослини-хазяїна на будь-якій стадії життєвого циклу рослини-хазяїна, включаючи репродуктивний цикл рослини-хазяїна та насіння рослини-хазяїна, які відрізняються від відомих та загальноприйнятих в даній галузі техніки як типові, або таких, що знаходяться в звичайно спостережуваному діапазоні для цієї рослини-хазяїна. Термін "аномальний фенотип" по відношенню до рослини-хазяїна, у використовуваному в даному документі значенні, може включати низькорослі рослини чи карликові рослини, або рослини з явно помітними зовнішніми свідченнями ендоефітної інфекції, або рослини, неспроможні завершити нормальну репродукцію через насіння, без обмеження ними.

Термін "включає", як він використовується в даному описі винаходу, означає "складається принаймні частково з". При тлумаченні формулювань в даному описі винаходу, які включають цей термін, ознаки, що йдуть слідом за цим терміном в кожному формулюванні, усі мають бути обов'язково присутніми, але інші ознаки також можуть бути присутніми. Споріднені терміни, такі як "включати" та "що включає", мають тлумачитися у такий саме спосіб.

Передбачається, що посилання на діапазон цифрових значень, розкритий в даному документі (наприклад, від 1 до 10) також включає посилання на усі раціональні числа в цьому

діапазоні (наприклад, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 та 10), а також будь-який діапазон раціональних чисел усередині цього діапазону (наприклад, від 2 до 8, від 1,5 до 5,5, та від 3,1 до 4,7) і, таким чином, усі піддіапазони усіх діапазонів, явно розкритих в даному документі, є цим самим явно розкритими. Це лише приклади того, що є конкретно передбачуваним, і усі можливі комбінації числових значень між зазначеними найнижчим значенням та найвищим значенням мають вважатися такими, що явно вказані в цій заявці у такий саме спосіб.

Детальний опис

Багато злаків прохолодного сезону (Poaceae, підродина Pooideae) мають грибові ендоефіти роду епіхлоє (Epichloae), що поширюються через насіння, які є відомими через їх біозахисні властивості та, особливо, через продукування алкалоїдів, що виявляють активність проти шкідників, таких як лоліни (Zhang et al., 2010) та перамін (Koulman et al., 2007). Асексуальні епіхлоє (види Neotyphodium) передаються переважно або повністю вертикально, у той час як статеві структури (строма) споріднених видів Epichloë можуть утворювати горизонтально поширювані спори (аскоспори) (Zhang et al., 2010).

Більшість видів Neotyphodium вважаються близько спорідненими з видами роду Epichloë. Багато видів Neotyphodium могли еволюціонувати з Epichloë в результаті процесів, що включають міжвидову гібридизацію (Tsai et al., 1994). На підставі молекулярно-філогенетичних даних деякі автори вважають, що асексуальні види Neotyphodium походять або від індивідуальних видів Epichloë, або від гібридів, утворених за участі принаймні двох предкових видів Epichloë (Tsai et al., 1994; Moon et al., 2004). Сучасна таксономія вважає, що члени формального роду анаморфів Neotyphodium є дуже близькоспорідненими членами телеоморфного роду Epichloë (Glenn et al., 1996). Згідно з попередніми редакціями кодексів ботанічної номенклатури, формальний рід стосується асексуальної спори або вегетативного стану і телеоморфний рід стосується сексуального стану. Зараз кодекс ботанічної номенклатури описує один гриб за протоколом однієї назви (single naming) (Miller et al. 2011). Колективно, два роди, Neotyphodium та Epichloë, відомі в даній галузі техніки як ендоефіти "епіхлоє".

Симбіотичні асоціації між грибами епіхлоє та злаковими травами-хазяями є звичайними і молекулярно-філогенетичні дані дозволяють припустити, що видова специфічність, спостережувана в цих симбіотичних асоціаціях, викликана коеволуцією цих груп рослин та грибових ендоефітів (Schardl et al., 2008).

Жоден із сучасних одомашнених злаків в природних умовах не інфікований ендоефітами епіхлоє, хоча для деяких їх родичів дикого типу це можливо (Marshall et al., 1999). Без бажання обмежуватися теорією зазначимо, що, на думку авторів винаходу, в процесі еволюції сучасних злаків, агротехнічні заходи, такі як зберігання насіння, могли привести до втрати історичних асоціацій, якщо вони існували (Welty et al., 1987).

Утворення стабільного симбіозу рослина/грибок між грибовими ендоефітами роду епіхлоє (Epichloae) та рослиною-хазяїном, яка не є природним хазяїном гриба, є проблематичним та передбачуваним (Simpson and Mace, 2012).

Вважають, що це спричинено вимогою, при створенні таких симбіозів, щодо успішної інтеграції численних біологічних змінних між партнерами, які можуть включати екологічні, біохімічні та/або молекулярні несумісності (Christensen et al., 2000). В даному описі розкритий великий обсяг необхідних досліджень, включаючи значну кількість експериментальних робіт, виконуваних методом спроб та помилок, потрібних для розробки успішних протоколів та процедур, за допомогою яких були створені стабільні симбіотичні асоціації між певними штамми грибових ендоефітів роду епіхлоє (Epichloae) та рослинами-хазяями Secale spp., які не є природними хазяями таких грибів.

Несподівано, автори винаходу визначили, що штучна інокуляція може бути використана для створення стабільних симбіозів рослина/грибок між деякими грибовими ендоефітами роду епіхлоє (Epichloae) та рослинами-хазяями Secale spp. Використовуючи способи за винаходом, описані в даному документі, автори винаходу змогли одержати інфіковану рослину-хазяїна Secale spp., яка утворює стабільну симбіотичну асоціацію з інфекційним грибом, що дозволяє інфікованій рослині розвиватися в нормальному життєвому циклі, та/або при якій інфікована рослина не демонструє зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції. Додатково, автори винаходу знайшли, що утворення таких симбіотичних асоціацій може забезпечувати принаймні певний рівень корисного ефекту для рослини-хазяїна, який полягає у продукуванні в рослині принаймні одного лолінового алкалоїду, похідного лолінового алкалоїду або пераміну, або їх комбінації, що може надавати рослині-хазяїну принаймні деякого рівня захисту від шкідників.

Автори винаходу несподівано виявили, що ізоляти певних грибових ендоефітів, узяті від диких родичів злаків, є придатними для створення стабільних симбіозів рослина/грибок з рослинами-хазяями Secale spp., зокрема Secale cereale. Зокрема, автори винаходу створили

симбіотичні асоціації, які приводять до одержання комбінації грибовий ендоефіт/рослина-хазяїн *Secale* spp., що може мати принаймні певний рівень підсиленого захисту від шкідників у порівнянні з контрольними рослинами *Secale* spp.; тобто, рослинами тих самих *Secale* spp., які є неінфікованими тим самим симбіотичним грибовим штамом епіхлое. Без бажання обмежуватися теорією зазначимо, що, на думку авторів винаходу, підсилений захист від шкідників слід очікувати в комбінаціях грибовий ендоефіт/рослина-хазяїн, що продукують певні алкалоїди, особливо лолін, похідні лоліну та/або перамін. Відповідно, автори винаходу вважають, що продукування алкалоїду (алкалоїдів) лоліну та/або пераміну грибовим ендоефітом роду епіхлое (*Epiclloae*) або комбінацією грибовий ендоефіт/рослина-хазяїн забезпечує принаймні певний рівень підсиленого захисту від шкідників для рослини-хазяїна. Зокрема, автори винаходу встановили, що після використання штамів ендоефітів та способів за винаходом, розкритих в даному документі, рослини-хазяї *Secale* spp., зокрема рослини-хазяї *Secale cereale*, інфіковані певними штамми грибових ендоефітів роду епіхлое (*Epiclloae*), мають підсилений захист проти нематод у порівнянні з контрольними рослинами *Secale*.

Загалом кажучи, симбіотичні асоціації, утворені між рослинами-хазяями та їх грибовими ендоефітами роду епіхлое (*Epiclloae*), оснований на складних та тісних біологічних взаємодіях, які приводять до високого ступеня видоспецифічності як для ендоефіта, так і для хазяїна (Simpson and Mace, 2012).

В результаті довготривалої програми досліджень, заявники ідентифікували уперше гриби епіхлое, здатні утворювати стабільні симбіози рослина/грибок з рослинами-хазяями *Secale* spp. Заявники додатково ідентифікували ендоефіти, здатні надавати інфікованій рослині-хазяїну, коли вони перебувають в симбіозі з рослинами-хазяями *Secale* spp., зокрема рослинами-хазяями *Secale cereale*, здатність продукувати один чи декілька алкалоїдів, що забезпечують для рослини принаймні певний рівень підсиленого захисту від шкідників, у порівнянні з неінфікованою контрольною рослиною. Зокрема, один чи декілька алкалоїдів можуть бути лоліном, похідними лоліну або пераміновими алкалоїдами.

Відповідно, в одному аспекті даний винахід стосується виділеного штаму грибових ендоефітів роду епіхлое (*Epiclloae*), вибраного з групи, що складається з AR3039 (NRRL# 50716), AR3046 (NRRL# 50576), AR3049 (NRRL#50577), AR3050 (NRRL# 50578), AR3064 (NRRL# 50718), AR3067 (NRRL# 50719), AR3068 (NRRL# 50720), AR3073 (NRRL# 50721), AR3074 (NRRL# 50722), AR3076 (NRRL# 50723) і AR3078 (NRRL# 50724) та їх комбінацій. В одному варіанті реалізації виділений штам є біологічно чистим. Краще, винахід стосується штамів AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 та AR3078, краще, AR3046.

Вищевказані штами грибових ендоефітів були депоновані в Міністерстві сільського господарства США, Службі сільськогосподарських досліджень регіону Середнього Заходу (Agricultural Research Service Midwest Area), Національному центрі досліджень, спрямованих на застосування у сільському господарстві (National Center for Agricultural Utilization Research, 1815 North University Street, Peoria, Illinois, 61604-3902, USA) 13 жовтня 2011 р., для штамів:

AR3046 (NRRL# 50576), AR3049 (NRRL#50577) та AR3050 (NRRL# 50578), і 6 березня 2012 р. для штамів AR3039 (NRRL# 50716), AR3064 (NRRL# 50718), AR3067 (NRRL# 50719), AR3068 (NRRL# 50720), AR3073 (NRRL# 50721), AR3074 (NRRL# 50722), AR3076 (NRRL# 50723) та AR3078 (NRRL# 50724),

згідно з Будапештським договором в цілях патентної процедури.

Ендоефіти були виділені з *Elymus* spp., включаючи *E. mutabilis*, одержаного з районів Киргизстану, Казахстану, СРСР та Росії, як вказано у Таблиці 6.

Вищевказані ендоефіти були виділені з інфікованих ендоефітами рослин *Elymus* spp., включаючи *E. mutabilis*, після поверхневої стерилізації рослинної тканини, як описано (Christensen et al., 2002).

Після виділення, виділені та/або біологічно чисті грибові ендоефіти можуть культивуватися з використанням стандартних методик, відомих фахівцям та розкритих в даному документі, включаючи приклади.

В одному варіанті реалізації, грибові ендоефіти культивують на антибіотичному картопляному агарі з декстрозою (ABPDA) при температурі від 20 °C до 25 °C, краще, від 21 °C до 23 °C. Оптимальною температурою для вирощування грибового ендоефіта є 22 °C. Вирощування грибового ендоефіта при температурах вище чи нижче цього діапазону значень є можливим, хоча ріст може бути ослабленим або може зовсім припинитися. В одному варіанті реалізації, грибовий ендоефіт культивують у темряві.

Винахід також стосується способу захисту рослини *Secale* spp. від шкідників, який включає штучне інфікування рослини *Secale* spp. принаймні одним грибовим ендоефітом роду епіхлое (*Epiclloae*), причому грибовий ендоефіт *in planta* продукує принаймні один алкалоїд на рівні,

достатньому для надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників рослин-хазяїну. В одному варіанті реалізації, принаймні один алкалоїд є алкалоїдом, вибраним з групи, що складається з пераміну, N-ацетилнорлоліну, лоліну, N-форміллоліну, N-ацетиллоліну та N-метиллоліну.

5 Інокуляція може бути проведена з використанням кільчиків *Secale* spp., які пророщували протягом приблизно двох тижнів. Краще, кільчики пророщують протягом 4-9 днів.

За межами цього діапазону, кільчики ще можуть утворювати ефективні асоціації, але в деяких випадках можуть бути занадто молодими або занадто старими для поселення грибового ендofіта. Насіння має бути вільним від сторонніх грибів та бактерій, щоб кільчики не
10 були ослаблені внаслідок мікробного зараження.

В одному варіанті реалізації, штучна інокуляція може бути проведена з використанням базальної (basal) інокуляції кільчиків *Secale* spp. Для ефективного утворення асоціації грибовий симбіонт/рослина-хазяїн *Secale* spp., інокуляцію ендofітів слід проводити в меристемі рослин-хазяїна шляхом надрізу рослини та введення міцелію культури гриба.

15 Фахівцям в даній галузі техніки відомо про природну резистентність до шкідників та захист злаків, які ендofіти з роду *epichloe*, що ростуть симбіотично зі злаковими рослинами-хазяями, можуть надавати в такій комбінації. Зокрема відомо, що лолінові алкалоїди та алкалоїд перамін надають певного такого захисту без помітної або відомої токсичності для ссавців або людей, які споживають злакові рослини або продукти, одержувані опосередковано внаслідок споживання
20 злакових.

Лоліни є групою споріднених біологічно активних природних продуктів, які мають спільні окремі хімічні та біологічні характеристики. Лоліни є алкалоїдами, тобто органічними сполуками, які містять основні атоми азоту та хімічно визначаються як насичені 1-амінопіролізидини з внутрішнім ефірним місточком, що з'єднує два кільцевих атоми вуглецю (C-2 з C-7). Внутрішній
25 ефірний місточок, який є незвичним в органічних сполуках, вважають характерною ознакою групи. Конкретні лоліни включають норлолін, а похідні його 1-аміно-фрагмента включають лолін (з метильною групою), N-метиллолін (з двома метильними групами, NML), N-ацетилнорлолін (з ацетильною групою, NANL), N-ацетиллолін (з метильною групою та ацетильною групою, NAL) та N-форміллолін (з формильною групою, NFL) (Schardl et al., 2007; Schardl et al., 2012).

30 Відомо, що лоліни є загалом пестицидними та відлякуючими шкідників сполуками, продукованими в злаках, інфікованих симбіонтами ендofітними грибами *epichloe* (*Epichloë* / *Neotyphodium* spp.). Було продемонстровано, що лоліни підвищують резистентність злакових рослин-хазяїв до рослиноїдних шкідників (Bush et al., 1997). Конкретні лоліни можуть мати деякі відмінності в біологічній активності проти конкретних шкідників. Було також висунуте
35 припущення, що присутність лолінів може забезпечувати рослин-хазяїну певний рівень захисту від екологічних стресів, включаючи засуху та просторову конкуренцію (Malinowski and Belesky, 2000).

Лолінові алкалоїди можуть продукуватися в симбіотичній комбінації як грибовим ендofітом, так і рослиною-хазяїном. Важливим є продукування лолінових алкалоїдів
40 комбінацією, причому продукування індуковане в комбінації присутністю грибового ендofіта на або усередині тканин рослини, особливо, присутністю грибових гіфів між клітинами рослини. Історично, *in vitro* відтворення існуючих в симбіозі умов, що створюють можливість продукування лолінових алкалоїдів, було знайдено надзвичайно складним (Porter 1994). Тому до відносно недавнього часу було невідомо, чи є лолінові алкалоїди, продукування яких
45 спостережують в таких симбіотичних асоціаціях, продукованими самим грибовим ендofітом, або ж вони синтезуються рослиною у відповідь на інфекцію. Лише відносно недавня робота Blankenship et al. (2001) продемонструвала, що ендofіти *Neotyphodium uncinatum* можуть продукувати лоліни у хімічно визначеному живильному середовищі. Ця робота дозволяє припустити, що ендofіти є також продуцентами лолінів в їх природних злакових хазяях
50 (Blankenship et al., 2001). Прямий хімічний аналіз природних *epichloe* також продемонстрував цей ефект (Schardl et al., 2007).

Перамін (піролопіразиновий алкалоїд) є біологічно активним алкалоїдом, продукованим деякими комбінаціями ендofітів та рослин (Schardl et al., 2012). Було показано, що
55 продукування пераміну є залежним від функціонування принаймні одного гена ендofіта (Tanaka et al., 2005). Було показано, що перамін є антифідингом для деяких комах-шкідників рослин, і може надавати захист проти зараження інфікованих ендofітами рослин деякими комахами (Rowan та Latch, 1994).

Винахід додатково стосується способу одержання стабільної комбінації рослина-хазяїн/грибовий ендofіт роду *epichloe* (*Epichloae*), який включає штучне інфікування рослини
60 *Secale* spp. принаймні одним грибовим ендofітом, що утворює стабільну комбінацію з

інокульованою рослиною, причому рослина-хазяїн не демонструє зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції. Це означає, що після утворення комбінації інфікована рослина-хазяїн *Secale* spp. виявляє нормальний морфологічний фенотип *Secale* spp., відомий фахівцям, який є очікуваним для умов росту в місцезнаходженні комбінації.

За певних умов, грибові ендоефіти, які є облигатними симбіонтами одного виду або штаму рослини-хазяїна, можуть бути введені іншому виду або штаму рослини-хазяїна для створення комбінації, що нормально не зустрічається в природі. Однак, такі комбінації можуть бути нестабільними та приводити до одержання рослин-хазяїв, що мають аномальний фенотип, тобто, аномальні морфологічні та/або фізіологічні ознаки у порівнянні з рослинами-хазяями того самого штаму або виду, які є або неінфікованими, або містять природного симбіонта. Аномальні фенотипові ознаки можуть включати карликові рослини (Simpson and Mace, 2012), рослини з помітним епіфітним ростом (Christensen et al., 2012), колонізацію судинного пучка (Christensen et al., 2001) та локалізовану загибель клітин (Christensen, 1995).

Заявник уперше зміг створити стабільну симбіотичну комбінацію рослин-хазяїв *Secale* spp. та грибових ендоефітів роду епіхлоє (*Epiclloae*), що приводить до стабільної комбінації рослини/грибок, яка не виявляє аномальних ефектів ендоефітної інфекції. Стабільні симбіотичні комбінації, запропоновані в даному документі, можуть виявляти нормальний морфологічний фенотип і повний та нормальний репродуктивний цикл.

В одному варіанті реалізації, стабільна симбіотична комбінація є достатньою для забезпечення можливості вертикальної передачі ендоефітів. В одному варіанті реалізації, вертикальна передача здійснюється за допомогою квіткових пагонів та продукowanego згодом насіння. В одному варіанті реалізації, вертикальна передача ендоефітів відбувається від першого покоління другому поколінню рослин-хазяїв. Краще, вертикальна передача від першого покоління рослин-хазяїв другому поколінню рослин-хазяїв відбувається через насіння.

В одному варіанті реалізації, рослиною-хазяїном є *Secale* spp., вибрані з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*. Краще, рослиною-хазяїном є *Secale cereale*.

Винахід додатково стосується ендоефітів, здатних надавати при інфекції рослини-хазяїна *Secale* spp. здатність комбінації ендоефіт/рослина продукувати один чи декілька алкалоїдів з лоліну, похідних лоліну та/або пераміну.

Винахід додатково стосується насіння рослини *Secale* spp., інфікованої принаймні одним грибовим ендоефітом роду епіхлоє (*Epiclloae*). Краще, ендоефіти з роду епіхлоє виділені з *Elymus* spp. Краще, грибовий ендоефіт виділений з *Elymus mutabilis*. Краще, ендоефіти з роду епіхлоє вибирають з групи, що складається з AR3039 (NRRL# 50716), AR3046 (NRRL# 50576), AR3049 (NRRL#50577), AR3050 (NRRL# 50578), AR3064 (NRRL# 50718), AR3067 (NRRL# 50719), AR3068 (NRRL# 50720), AR3073 (NRRL# 50721), AR3074 (NRRL# 50722), AR3076 (NRRL# 50723) та AR3078 (NRRL# 50724) та їх комбінацій. Краще, винахід стосується штамів AR3039, AR3046, AR3050, AR3067, AR3068, AR3074 та AR3078, краще, AR3046.

Краще, насіння *Secale* spp. є насінням *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* або *Secale vavilovii*. Ще краще, насіння є насінням *Secale cereale*.

Різні аспекти винаходу будуть далі проілюстровані у необмежувальний спосіб з посиланням на наступні приклади.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1

Детектування штамів грибових ендоефітів

Більш ніж 580 зразків (accessions) насіння *Elymus* spp. були одержані з різних джерел і, якщо кількість насіння дозволяла, до приблизно 50 індивідуальних насінин або кільчиків досліджували на інфекцію ендоефітами. Живих ендоефітів у листових піхвах кільчиків, вирощених до стадії двох чи більше пагонів, визначали у спосіб, описаний Simpson et al. (2012).

Було знайдено, що приблизно 6% зразків продукували принаймні один паросток, що містить живі ендоефіти, які могли бути додатково досліджені у наступних прикладах.

ПРИКЛАД 2

Детектування генетичних відмінностей штамів грибових ендоефітів

Для того, щоб зосередитися на виборі штамів ендоефітів з тих *Elymus* spp., що містять живі ендоефіти і які могли б становити додатковий інтерес, ендоефіти, зібрані з до 6 рослин для кожного зразка, були частково охарактеризовані та проаналізовані на генетичні відмінності методом ДНК-фінгерпринтингу, оснований на генотипних даних, одержаних з до 8 вибраних локусів маркерних простих коротких повторів (SSR) з використанням праймерних послідовностей, вказаних у Таблиці 1. Раніше було показано, що ці праймерні послідовності загалом ампліфікують поліморфні ДНК-послідовності ендоефітів з роду епіхлоє (*Epiclloae*), що

відповідають ендосфітам in planta.

Зразки приблизно по 100 мг вологої ваги нижніх (basal) пагонів використовують для екстракції повної геномної ДНК (рослина + ендосфіт), з подальшою процедурою виділення рослинної ДНК з використанням набору FastDNA відповідно до інструкцій виробника (Bio 101, Vista, California).

Ампліфікацію SSR проводять з парами олігонуклеотидних праймерів, з використанням одного з двох протоколів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (Таблиця 1). В обох протоколах ПЛР проводять з використанням термоциклера iCycler (BioRad, Hercules, California, USA).

Протокол 1 був таким, як описано (Moon et al., 1999), за винятком того, що використовували температуру відпалу 60 °C. В цьому протоколі прямі праймери були міченими на 5'-кінці флуорофором 6-FAM™ (Applied Biosystems, Foster City, California).

В протоколі 2 прямі праймери були синтезовані з 21-нуклеотидною M13 хвостовою послідовністю на 5'-кінці (5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3') (SEQ ID NO: 1), для сприяння універсальному міченню продуктів ПЛР за допомогою 6-FAM™-міченого M13 праймера (Schuelke, 2000). Зворотні праймери були синтезовані з послідовністю 5'-GTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 2) на 5'-кінці для сприяння нематричному (non-templated) аденілюванню на 3'-кінці продукту ПЛР (Brownstein et al., 1996). Використовували об'єм ПЛР-реакції 10 мкл, що містить приблизно 10 нг загальної геномної ДНК, 2,5 мМ хлориду магнію, 1× буфер для ПЛР, 0,05 мМ кожного dNTP, 0,0375 мМ прямого праймера, 0,15 мМ зворотного праймера, 0,15 мМ флуоресцентно міченого M13-праймера та 0,75 од. ДНК-полімерази Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, California). ПЛР проводили з використанням такого профілю: (1) 94 °C протягом 4:00 хвилин, (2) 30 циклів з: 94 °C протягом 30 секунд, 55 °C протягом 30 секунд та 72 °C протягом 30 секунд, (3) 8 циклів з: 94 °C протягом 30 секунд, 53 °C протягом 30 секунд та 72 °C протягом 30 секунд, (4) 72 °C протягом 30 хвилин (згідно з Schuelke 2000).

Продукти ПЛР аналізували методом капілярного електрофорезу на приладі ABI 3100 Genetic Analyser з використанням 22 см капілярного блока з полімером POP-7™ (Applied Biosystems). GS500 LIZ (Applied Biosystems) використовували як внутрішній стандарт розміру. Електрофорограми аналізували з використанням ABI Prism GeneScan (v 3.7, Applied Biosystems) і генотипні дані кількісно оцінювали з використанням ABI Prism Genotyper (v 3.7, Applied Biosystems).

Рослини, досліджені як описано вище, потім додатково характеризували шляхом проведення хімічних аналізів. Шість інфікованих кільчиків були додатково проаналізовані на присутність алкалоїдів, пов'язуваних з присутністю ендосфітів, таких як індолдигтерпени, алкалоїди ріжків, перамін та лоліни. Зразки типових представників кожного грибового генотипу збирали для більш детального генотипування з використанням праймерів, вибраних для локусів поліморфних SSR.

Результати в Таблиці 2 та на Фігурі 2 показують, що ендосфіти за даним винаходом належать до одного клада, позначеного як Група 1 у Таблиці 2, і можуть бути охарактеризовані як такі, що мають спільними принаймні більшість розмірів алелів SSR для локусів SSR, вказаних у Таблиці 1 та Таблиці 2. Інші ендосфіти у Таблиці 2, Таблиці 3 та на Фігурі 2 є прикладами, призначеними для ілюстрації наявності та співвідношень з ендосфітами інших типів, які не відповідають вимогам даного винаходу.

Таблиця 1.

Праймерні послідовності SSR.

SSR	Праймерні послідовності (5' - 3')		Протокол ПЛР	SEQ ID NO:
B10	прямий	CGCTCAGGGCTACATACACCATGG	1	3
	зворотний	CTCATCGAGTAACGCAGGCGACG		4
ans019	прямий	TACCTCTGCACGGTGTATTCC	2	5
	зворотний	TGCATAACACTCACCTTATAGTCG		6
ans033	прямий	GCGTTGAGGAGGCTAGATAGAA	2	7
	зворотний	TTCCAAGCTGAACAAAAGTCAA		8
egs027	прямий	GATGACGTATCTTGATGCTACCAC	2	9
	зворотний	CGTGTATAAAGTTCGGGATCCTAT		10
egs031	прямий	GAGATATCCCGTCTCCTGATCTAA	2	11
	зворотний	CACAGCGTTACACTATCAACTTCC		12
ces0004	прямий	CACTAAACACACCCAAGAACAAGA	2	13
	зворотний	AGACAGGTAAGAAGTTTTCCCCTT		14
ces0022	прямий	AGCTTTCCAATGACGACATACATA	2	15
	зворотний	TAATTTAGGGTAGCATTTTCTCCG		16
ces0041	прямий	GGTCCCTATTCTAATGCAGGTATG	2	17
	зворотний	CAGTGTACGGGACTTTGTCAATAC		18
ces0054	прямий	TGTATAATAAACATGGCGTGCTCT	2	19
	зворотний	GTGTTGAAAGTTGTTGGATCACTC		20
ces0060	прямий	CGAAATTGTAGACTATGTTGGAGC	2	21
	зворотний	GTAGATGTATTTTGAGCAGGGCTT		22
ces0061	прямий	GAGTGAGACCCGGTGTAGTAAGTC	2	23
	зворотний	GAGTCATTCTTCGTCCATTGTCTT		24
ces0067	прямий	GAAATGAGGCGTCTATCTTAAAGC	2	25
	зворотний	TTTCTTGATTTCCAAAGAACAACA		26
ces0093	прямий	CTGCTAGACATACTTGAACATGG	2	27
	зворотний	CAGTCGAATAATTTAGGGAGCATT		28

Таблиця 2.

Розміри алелів SSR.

SSR	Розміри продуктів ПЛР (п.о.) ^{1,2}					
	Група 1 ³	AR3001	Група 2 ⁴	AR3018	AR3075	AR3051
B10	159	188	188	171	181	193
	185				195	
ans019	204	255	204	204	198	196
ans033	176	179	181	176	183	193
					193	
egs027	345	359	359	362	346	354
	359				351	
egs031	259	259	259	280	308	308
	283					
ces0004	185	185	185	174	179	187
					187	
ces0022	204	209	209	211	204	206
	209					
ces0041	247	261	261	250	254	266
	257					
ces0054	261	261	261	267	255	280
					280	
ces0060	238	238	238	239	246	233
	250				257	246
ces0061	154	154	162	154	164	152
	177				221	
ces0067	277	275	277	265	271	298
	281				295	
ces0093	143	145	145	149	143	143
	145					

¹ розмір алеля +/- 0,5 п.о.

² Для усіх локусів SSR, за винятком B10, розмір продукту включає близько 25 п.о., що належать до послідовностей M13 та "свиний хвостик" (pig tail)

³ Група 1 = AR3039, 3046, 3049, 3050, 3064, 3067, 3068, 3073, 3074, 3076 та 3078

⁴ Група 2 = AR3002, 3005, 3015, 3017 та 3020

ПРИКЛАД 3

Виділення штамів грибкових ендоефітів

- 5 Гриби були виділені з великого числа інфікованих ендоефітами рослин після поверхневої стерилізації рослинних тканин, як загальновідомо в даній галузі техніки, зокрема, як описано Christensen et al. (2002). Пагони видаляли з рослин зрізуванням у основи та укорочували до приблизно 5 см, після чого піддавали поверхневій стерилізації. Розрізані пагони піддавали поверхневій стерилізації шляхом швидкого промивання 96% етанолом та витримування
- 10 протягом 1 хвилини в 10% відбілювальному (bleach) розчині з подальшим промиванням двічі у стерильній воді. Пагони розрізали в поперечному напрямку; стеблові вузли (sheath rings) відокремлювали та поміщали на картопляний агар з декстрозою (ABPDA) з 5 мкг/мл антибіотика тетрацикліну. Чашки Петрі інкубували у темряві при 22-25 °C протягом 3-5 тижнів. Культури
- 15 могли пересіювати на таке саме середовище. Культури аналізували на швидкість росту колоній, морфологію колоній, здатність продукувати конідії, діапазон розмірів конідій, послідовність генів β-тубуліну (tub2) (Moon et al. 2004) та інші описові ознаки, які усі брали до уваги при селекції ендоефітів для додаткових

аналізів.

Вибрані культури, одержані та, в деяких випадках, пересіяні у спосіб, описаний в даному прикладі, були використані для тестування інокуляції та можливої стійкої інфекції кильчиків *Secale cereale*, як описано нижче.

5 ПРИКЛАД 4

Опис ендоефітів

10 *In vitro* характеристики при вирощуванні на PDA (картопляний агар з декстрозою) узгоджувалися з описами *Neotyphodium* (Christensen et al., 1993; Glenn et al., 1996), маючи швидкість росту від повільної до помірно повільної, зі значеннями в діапазоні від 4 тижнів і більше на PDA. Колонії підвищені над агаром, білі, схожі на вату, скручені від незначного до сильного ступеню, повстисті, з численними повітряними гіфами. Зворотний бік колоній від жовтувато-коричневого до кремового на краях. Конідіогенні клітини були відокремленими, піднімалися перпендикулярно над гіфами, мали ширшу основу і звужувалися на кінці. Фіалідні конідії були склоподібними, гладкими, від човноподібних до серпоподібних, 2,05-14,96 мкм в довжину × 1,37-8,19 мкм в ширину. Жоден з ізолятів не був стерильним. Індивідуальні характеристики штамів наведені у Таблиці 3.

Таблиця 3.

Розміри конідій та колоній

Хазяїн	Ендоефіт		Конідії (мкм)							Колонії	
			Сер. довжина		Сер. ширина	Мін. довжина	Макс. довжина	Мін. ширина	Макс. ширина	Діаметр колоній (мм)	Станд. відх.
<i>Elymus dahuricus</i>	AR	3001	5,41	×	2,24	4,09	7,49	1,57	2,93	15,2	1,0
<i>Elymus dahuricus</i>	AR	3002	4,64	×	2,36	2,92	5,68	1,70	3,30	20,7	0,7
<i>Elymus sp.</i>	AR	3005	4,30	×	2,49	3,59	5,41	2,05	3,18	24,0	2,7
<i>Elymus sp.</i>	AR	3015	4,87	×	2,18	3,50	6,51	1,61	3,06	26,8	0,7
<i>Elymus sp.</i>	AR	3017	4,28	×	1,88	2,05	5,95	1,20	2,54	22,1	1,0
<i>Elymus sp.</i>	AR	3018	4,05	×	2,67	3,35	5,17	1,68	5,07	36,9	2,3
<i>Elymus sp.</i>	AR	3020	5,18	×	2,76	3,97	6,80	1,90	3,61	24,2	1,3
<i>Elymus caninus</i>	AR	3039	6,46	×	3,30	4,42	8,60	1,77	4,95	23,8	2,1
<i>Elymus mutabilis</i>	AR	3046	5,24	×	2,78	3,50	7,21	1,83	5,07	41,2	1,2
<i>Elymus mutabilis</i>	AR	3049	5,76	×	3,33	3,57	7,72	2,10	4,37	41,4	1,4
<i>Elymus mutabilis</i>	AR	3050	5,80	×	3,42	3,57	8,36	2,31	4,29	42,5	2,7
<i>Elymus virginicus</i>	AR	3051	3,91	×	2,40	2,74	5,10	1,37	3,16	93,2	4,8
<i>Elymus mutabilis</i>	AR	3064	12,18	×	6,54	8,11	14,96	4,54	8,19	23,0	5,4
<i>Elymus uralensis</i>	AR	3067	6,70	×	4,24	5,00	8,88	3,30	4,96	12,5	2,1
<i>Elymus mutabilis</i>	AR	3068	6,09	×	3,34	4,67	7,91	2,36	4,08	36,7	1,8
<i>Elymus caninus</i>	AR	3073	6,36	×	3,41	5,24	9,39	2,81	4,45	16,0	0,6
<i>Elymus caninus</i>	AR	3074	6,24	×	3,54	5,20	7,31	2,64	4,22	32,8	1,5
<i>Elymus elymoides</i> ssp. <i>brevifolius</i>	AR	3075	6,02	×	3,63	2,81	7,47	3,01	4,89	34,5	1,1
<i>Elymus mutabilis</i> var. <i>oschensis</i>	AR	3076	6,00	×	3,33	4,49	7,31	2,51	4,54	51,6	0,7

ПРИКЛАД 5

20 Використання послідовності гена β -тубуліну для визначення співвідношень ендоефітів з відомими видами *Epichloë*

Грибковий ендоефіт злакових може належати до видів *Epichloë* або видів *Neotyphodium*. Деякі, але не всі види *Neotyphodium*, є очевидно гібридами, похідними від двох чи більше видів *Epichloë*, як було виявлено у першу чергу шляхом порівняння вибраних генних послідовностей (Moon et al., 2004).

25 Присутність численних алелів деяких локусів, використаних для аналізу SSR ендоефітів (як у Прикладі 2 вище) може вказувати на те, що кладі, до яких вони належать, імовірно мають гібридне походження.

30 Генні послідовності *tub2* трьох прикладів ендоефітів, AR3039, AR3046 та AR3064, описані в цій заявці, були проаналізовані з використанням методу Moon et al. (2004) з незначними змінами для визначення ймовірності того, що ендоефіти є похідними від одного чи декількох розпізнаваних видів *Epichloë*. Чотири інші ендоефіти, очевидно з інших кладів, також були аналогічно проаналізовані для виявлення їх співвідношення з відомими видами *Epichloë*.

35 Праймери та умови, використані для ПЛР-ампліфікацій, були модифіковані у спосіб, який дозволяє краще забезпечити, щоб численні алелі *tub2* були спостережуваними в усіх зразках, для яких гібридне походження вважається ймовірним або можливим. Вибраними праймерними послідовностями були праймер TCG GCC TCA CGA CGC ACA AC (RJ251-F) (SEQ ID

NO: 29) та зворотний праймер CCC ATA CAT TAC ACC TTT CTG GCG (RJ252-R) (SEQ ID NO: 30), вибрані з метою одержання продуктів ПЛР ендоефітів з *Elymus* spp., що відповідають по суті та включають відповідні послідовності, описані та використані для визначення співвідношень ендоефітів *Epichloë* та *Neotyphodium* та їх гібридів (Moon et al., 2004). ПЛР проводили з початковою стадією при 95° (3 хвилини); 35 циклів при 95° (30 секунд), 62° (30 секунд), 72° (45 секунд); кінцева стадія 72° (5 хвилини).

Продукти ПЛР були секвеновані за способом Sanger (1997) на ДНК-аналізаторі ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems). Послідовності, які містили численні перекривні піки, вважалися такими, що походять від гібридів, в той час як ті, для яких цього не спостерігали, вважали похідними від не-гібридів.

Клонування ПЛР-ампліконів, коли існували свідчення (походження від) декількох послідовностей, проводили з використанням набору TOPO® TA Cloning® (з вектором pCR®2.1-TOPO®) (Invitrogen). До 10 клонів секвенували, як описано вище, та проводили вирівнювання з використанням модуля Align X приладу Vector NTI Advance 11 (Invitrogen), з послідовностями індивідуальних алелів *tub2*.

Індивідуальні алелі *tub2* були віднесені до найближчих негібридних видів *Epichloë* у такий спосіб: послідовності вирівнювали з використанням Dialign-TX (Subramanian et al., 2008) і дерева максимальної імовірності були побудовані з цього вирівнювання з використанням комплексу програмного забезпечення Phylip (Felsenstein, 2005). Для створення кінцевого дерева запускали програму DNAML з використанням 1000 циклів самонагодження (bootstraps) та трьох рандомізацій порядку введення послідовностей на комплект даних (per set) і зводили в одне консенсусне дерево з використанням підходу правила більшості. Дерево було одержане з використанням Dendroscope (Huson et al., 2007) для найближчого віднесення відомих видів *Epichloë* до вибраних ендоефітів.

Ендоефіти AR3039, AR3046 та AR3064, описані в цій заявці, дають дві послідовності *tub2*, які узгоджуються з ендоефітами, що є гібридами *E. bromicola* та *E. amarillans*. Цей гібрид не був досі описаний і може вважатися новим видом, який поки що названий *E. bromicola* x *amarillans*.

Штами ендоефітів AR3049, AR3050, AR3067, AR3068, AR3073, AR3074 та AR3078 утворюють групу, близьку до AR3039, AR3046 та AR3064 за даними SSR-аналізу (Фігура 1) і можуть також вважатися такими, що найбільш імовірно належать до *E. bromicola* x *amarillans*. Три інших ендоефіти у порівняльному тестуванні були віднесені до однієї групи з *E. bromicola*, і один з інших ендоефітів - з *E. yangzii* – вони є представниками інших груп ендоефітів зі спільними конфігураціями SSR-генотипів, спостережуваних для зразків, джерелом одержання яких були *Elymus* spp.

Об'єднані дані для SSR та β-тубуліну дозволяють припустити, що штамми ендоефітів AR3039, AR3046, AR3049, AR3050, AR3064, AR3067, AR3068, AR3073, AR3074 та AR3078 утворюють репрезентативну групу щойно охарактеризованих ендоефітів, що можуть вважатися функціональним кладом, які можуть бути перенесені з їх нативної рослини-хазяїна до альтернативного хазяїна, *Secale*, з утворенням штучно створеної стабільної симбіотичної комбінації *Secale*/ендоефіт, причому інфікований хазяїн *Secale* демонструє нормальний ріст та має нормальний життєвий цикл.

ПРИКЛАД 6

Інокуляція грибових ендоефітів роду епіхлое (*Epichloae*) в *Secale cereale*

Насіння *Secale cereale*, сорти Rahu, Amilo та "KWS", та вибрані сорти *S. cereale*, одержані від д-ра Марка Ньюелла (Dr Mark Newell, The Samuel Roberts Noble Foundation) (NF95307A, NF95319B, 97326, Bates RS4, або MATON2) були піддані поверхневій стерилізації та інокульовані, як описано Latch and Christensen (1985). Насіння піддавали поверхневій стерилізації шляхом занурення в 50% розчин сірчаної кислоти на 15 хвилини з подальшим п'ятикратним промиванням водопровідною водою, та зануренням в 10% розчин побутового відбілювача (Japola) на 15 хвилини з подальшим промиванням два рази у стерильній воді. Насіння висушували у шкафу з ламінарним потоком повітря на стерильному фільтрувальному папері Whatmann перед розкладанням на чашках Петрі з 4% водним агаром. Насіння на чашках пророщували у темряві при 22-25 °C протягом 4-9 днів та утворені етіолозовані кільчики інокульовали перед поверненням до темного інкубатора на 7 днів. Після цього інкубаційні чашки поміщали під біле флуоресцентне світло принаймні на 7 днів, і потім видаляли кільчики та висаджували їх в комерційну горщикову суміш та вирощували у теплиці. Рослини вирощували протягом близько 6 тижнів до проведення ідентифікації інфікованих особин. Інфіковані рослини ідентифікували методом Simpson et al. (2012). Рослини вирощували далі у теплиці для дослідження фенотипу інфікованих рослин у порівнянні з типовими неінфікованими рослинами і, зокрема, для визначення, чи будуть утворюватися суцвіття та насіннєві голівки.

Зведення успішних інокуляцій, позначених "так", наведене у Таблиці 4 для тих штамів ендоефітів, де принаймні деякі з інокульованих рослин мали по суті нормальний фенотип та були здатними розвиватися в нормальному життєвому циклі (Фігура 2). З рослин збирали насіння, як вказано у Таблиці 4.

5

Таблиця 4.

Штами, якими інокульовали та інфікували *S. cereale*, та приклади продукування насіння.

Ендоефіти	Спроби інокуляції <i>Secale</i>	Одержані інфіковані рослини <i>Secale</i>	Інфіковані рослини <i>Secale</i> продукують насіння	Насіння <i>Secale</i> було інфіковане ендоефітами	Насіння було інфіковане життєздатними ендоефітами
AR3039*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3046*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3039**	Так	Так	Так	БВП	БВП
AR3046/**	Так	Так	Так	БВП	БВП
AR3046/ NF95307A ***	Так	Так	Так	БВП	БВП
AR3046/ NF95319B ***	Так	Так	Так	БВП	БВП
AR3046/97326***	Так	Так	Так	БВП	БВП
AR3046/ Bates RS4***	Так	Так	Так	БВП	БВП
AR3046/ MATON2***	Так	Так	Так	БВП	БВП
AR3049*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3050*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3064*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3067*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3068*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3068****	Так ¹	Так ¹	Так ¹	БВП	БВП
AR3073*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3074*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3076*	Так	Так	Так	Так	Так
AR3078*	Так	Так	Так	Так	Так

*інокульований в *S. cereale* var. Rahu

** інокульований в *S. cereale* var. Amilo

***інокульовані зразки жита (*Secale cereale*) від д-ра Марка Ньюелла (The Samuel Roberts Noble Foundation). Варіант як вказано: NF95307A, NF95319B, 97326, Bates RS4 або MATON2.

БВП = буде визначено пізніше

Так¹ = очікуваний результат

ПРИКЛАД 7

Продукування алкалоїду в інфікованих ендоефітом природних батьківських рослинах

- Листкові пластинки та псевдостебла рослин *Elymus mutabilis*, *Elymus caninus*, *Elymus uralensis*, *Elymus nevskii* та *Elymus mutabilis* var. *oschensis*, інфікованих конкретними штамми ендоефітів, аналізували на лолінові алкалоїди та перамін з незначними модифікаціями загально визнаних методів (Kennedy and Bush, 1983; Yates et al., 1989) та на перамін (Rasmussen et al., 2012). Результати наведені у Таблиці 5. Загальна кількість лолінових алкалоїдів у листках досліджених рослин була вище, ніж у псевдостеблах. Без бажання обмежуватися теорією зазначимо, що, на думку авторів винаходу, загальна кількість алкалоїдів, присутніх в досліджених рослинах, є репрезентативною для діапазону, що є достатнім для

забезпечення принаймні деякого захисту від шкідників для рослини-хазяїна (Wilkinson et al., 2000). Ці результати показують, що ряд штамів ендоефітів, які входять до клада, визначеного за даними для SSR та β -тубуліну, наведеними в інших розділах даного документу, в стані in planta можуть надавати симбіотичній комбінації здатність продукувати вимірні кількості лолінових алкалоїдів або пераміну або обох.

Таблиця 5.

Загальні кількості лолінових та перамінових алкалоїдів в інфікованих ендоефітами батьківських рослинах *Elymus*.

Ендоефіти	Частина рослини	Лоліни ¹ (мкг/г)	Перамін ² (мкг/г)
AR3039	Листкова пластинка	56	55,6
	Псевдостебло	34	26,1
AR3046	Листкова пластинка	461	78,4
	Псевдостебло	240	45,2
AR3049	Листкова пластинка	437	83,4
	Псевдостебло	242	45,5
AR3050	Листкова пластинка	532	84,7
	Псевдостебло	379	59,2
AR3064	Листкова пластинка	465	66,0
	Псевдостебло	342	39,0
AR3067	Листкова пластинка	205	27,5
	Псевдостебло	107	16,3
AR3068	Листкова пластинка	372	59,4
	Псевдостебло	151	31,1
AR3073	Листкова пластинка	43	65,8
	Псевдостебло	34	24,8
AR3074	Листкова пластинка	257	47,5
	Псевдостебло	169	32,9
AR3076	Листкова пластинка	312	53,2
	Псевдостебло	151	28,3
AR3078	Листкова пластинка	466	32,7
	Псевдостебло	273	30,9

Примітка: ¹ аналіз методом GC-FID (газова хроматографія з полуменево-іонізаційним детектором), ² аналіз методом LC-MS (рідинна хроматографія з мас-спектрометрією)

ПРИКЛАД 8

Джерело та географічне походження вибраних ендоефітів *Elymus* spp.

У Таблиці 6 перелічений ряд виділених штамів ендоефітів, розкритих в даному документі, номери доступу джерел, з яких вони були отримані, гадані види вихідних зразків (accession) рослини-хазяїна та регіональні джерела зразків. Рослини-хазяї *Elymus* spp. загалом були одержані з центральної Азії.

Таблиця 6.

Штами виділених ендоефітів із зазначенням числового коду AR, гаданого вихідного виду-хазяїна, регіонального джерела та номера доступу зразка.

Ендоефіти	Хазяїн Elymus	Регіон	Джерело зразка	
AR3039	<i>E. caninus</i>	невідомо	RBG ¹	0006334
AR3046	<i>E. mutabilis</i>	Озеро Іссик-Куль, Киргизстан	PI ²	564954
AR3049	<i>E. mutabilis</i>	Озеро Іссик-Куль, Киргизстан	PI	564954
AR3050	<i>E. mutabilis</i>	Озеро Іссик-Куль, Киргизстан	PI	564954
AR3064	<i>E. mutabilis</i>	Горний Алтай, Росія	PI	564949
AR3067	<i>E. uralensis</i>	Алма-Ата (Amla Ata), Казахстан	PI	547365
AR3068	<i>E. mutabilis</i>	СССР	NGB ³	90498
AR3073	<i>E. caninus</i>	невідомо	RBG	0006334
AR3074	<i>E. caninus</i>	Перевал Чіке-Таман (Cheketeman Pass), Горний Алтай, Росія	PI	564915
AR3076	<i>E. mutabilis</i> var. <i>oschensis</i>	Гори Киргизького Алатау (Khigiz-Alatau), Киргизстан	PI	531640
AR3078	<i>E. nevskii</i>	Новосибірськ, Росія	PI	564925

Примітки

1. Royal Botanic Gardens, Seed Conservation Department, Ardingly, UK
2. Pullman Institute, Washington State University, Pullman, WA., USA
3. Nordic Genetic Resource Centre (NordGen), Alnarp, Sweden

ПРИКЛАД 9

Продуктування алкалоїду в рослинах *Secale cereale*

- 5 Кільчики *Secale cereale*, сорт Rahu, інокулювали ендоефітами, переліченими у Таблиці 7, вирощували у теплиці та підтверджували присутність в них ендоефіта при по суті нормальному фенотипі рослин. Листкові пластинки та стебла окремо аналізували на лолінові алкалоїди (Kennedy and Bush, 1983; Yates et al., 1989) або перамін (Garthwaite et al., 1994). Результати в Таблиці 7 показують діапазони концентрацій як для лолінових алкалоїдів, так і для пераміну.
- 10 Без бажання обмежуватися теорією зазначимо, що, на думку авторів винаходу, загальна кількість лолінових алкалоїдів та пераміну, присутніх в досліджених рослинах, є характерною для діапазону, що є достатнім для забезпечення принаймні деякого захисту рослини-хазяїна від шкідників (Rowan 1993; Wilkinson et al., 2000; Bacetty et al., 2009a 2009b).

Таблиця 7.

Результати аналізів алкалоїдів в рослинах *S. cereale* (до 3 рослин), інфікованих ендofітами.

Ендofіти	Частина рослини	Лоліні ¹ (мкг/г)			Перамін ² (мкг/г)		
		n	Середнє	Діапазон	n	Середнє	Діапазон
AR3039	Листкова пластинка	6	97	54-193	6	23,3	18,1-33,0
	Стебло	6	87	65-110	6	16,7	11,6-21,1
AR3046	Листкова пластинка	5	1487	911-3285	3	18,7	14,1-23,2
	Стебло	4	250	167-280	3	15,6	15,1-16,0
AR3049	Листкова пластинка	6	1765	642-3660	4	25,2	17,0-30,1
	Стебло	6	362	250-669	2	16,2	12,1-20,3
AR3050	Листкова пластинка	1	1607	-	1	16,8	-
	Стебло	1	342	-	5	6,8	4,3-12,4
AR3064	Листкова пластинка	4	358	140-490	3	7,3	1,6-11,4
	Стебло	4	103	32-172	2	4,0	1,2-6,9
AR3067	Листкова пластинка	4	111	101-119	1	47,7	-
	Стебло	2	136	136-136	1	36,3	-
AR3068	Листкова пластинка	6	1108	895-1696	5	21,0	11,6-30,2
	Стебло	6	276	122-488	2	15,2	5,8-24,5
AR3073	Листкова пластинка	6	86	56-112	6	20,8	11,1-38,3
	Стебло	5	62	40-82	3	25,0	16,9-36,1
AR3074	Листкова пластинка	2	599	275-922	2	14,4	8,0-20,7
	Стебло	2	431	392-470	4	3,5	2,5-5,2
AR3076	Листкова пластинка	3	310	164-588	4	14,9	7,3-18,7
	Стебло	3	230	92-437	3	13,7	11,4-16,4
AR3078	Листкова пластинка	5	489	54-1646	5	15,8	1,4-43,4
	Стебло	5	219	39-607	4	11,5	3,6-24,0

Примітка: ¹ аналіз методом GC-FID, ² аналіз методом ELISA
(твердофазовий імуноферментний аналіз)

ПРИКЛАД 10

5 Комбінації *Elymus mutabilis*/ендофіт виявляють біологічну активність проти шкідників злаків
Через відсутність контрольних *E. mutabilis*, що не містили б ендofітів, використовували
вівсяницю лугову з її природним ендofітом (*Neotyphodium uncinatum*) та без нього, оскільки
вона, як відомо, продукує лолінові алкалоїди та виявляє відому активність проти попелиці.

Вплив на попелицю

10 Попелиця *Rhopalosiphum padi* є важливим шкідником злакових рослин, тому що вона
переносить вірус жовтої карликовості ячменю.

У біологічному аналізі з вибором, що проводився з використанням пагонів у чашках Петрі,

число *Rhopalosiphum padi* на *Elymus mutabilis*, інфікованому AR3050, було близьким до кількості на вівсяниці лугової, інфікованій її природним ендосфітом *Neotyphodium uncinatum*, та істотно меншим, ніж кількість попелиці на контрольній вівсяниці лугової, що не містить ендосфітів (Таблиця 8).

5

Таблиця 8.

Кількість попелиці *R. padi*, знайденої на пагонах *E. mutabilis*, інфікованих AR3050, та на вівсяниці лугової з (MF E+) та без (MF E-) її природного ендосфіта *N. uncinatum* у випробуваннях з вибором протягом 3 днів.

Обробка ендосфітами	Кількість попелиць/пагон		
	День 1	День 2	День 3
AR3050	2,8	1	1,5
MF E+	0	0	0,8
MF E-	5,2	7,5	15,3
P-значення	0,003	<0,001	<0,001

Результати цих випробувань дозволяють припустити, що лолінові алкалоїди, продуковані в результаті утворення симбіотичної асоціації між *E. mutabilis* та AR3050, можуть відлякувати попелицю від поїдання рослин, як це видно на пасовищних травах (Wilkinson et al., 2000).

10 Вплив на кліщів *Aceria*

Aceria spp., зокрема *A. tosichella*, є кліщами, які переносять вірус смугастої мозаїки пшениці в Австралії. Кліщ, використаний в цих випробуваннях, був ідентифікований як такий, що належить до *Aceria* spp., гадано як *A. tosichella*.

15 Через відсутність контрольних *E. mutabilis*, що не містили б ендосфітів, та невідомий ефект генотипу рослин на поширеність кліщів *Aceria*, вплив лолінових алкалоїдів на кліщів оцінювали на шести рослинах вівсяниці лугової, інфікованих ендосфітами, та на шести рослинах без ендосфітів. Кліщів *Aceria* підраховували на трьох пагонах кожної рослини. Істотно більше кліщів було присутньо на рослинах без ендосфітів, ніж на інфікованих ендосфітами (кількість/пагін: 74 для E+ порівняно з 454 для E-. $P < 0.001$). Результати наведені нижче у Таблиці 9.

20

Таблиця 9.

Середня кількість кліщів *Aceria* на двох листах трьох пагонів на шести рослинах вівсяниці лугової з (E+) та без (E-) ендосфітів *N. uncinatum*.

	E+	E-	SED (ст.відхил)	Значущість
Пагін 1	65	417	70,6	<0,001
Пагін 2	101	543	97,5	0,001
Пагін 3	59	403	57,1	<0,001
Усі	224	1363	134,2	<0,001

25 Як показано вище у проведених дослідженнях, результати цих випробувань з кліщами дозволяють припустити, що лолінові алкалоїди відповідають за відлякування трав'яїдних кліщів, аналогічно впливу на попелицю, який був продемонстрований на пасовищних травах (Wilkinson et al., 2000).

Вплив на яблуневу міль

Відомо, що ця комаха є чутливою до біологічно активних речовин, продукованих ендосфітами райграсу пасовищного. Вона була використана тут для того, щоб продемонструвати присутність біологічно активних речовин у рослинах *E. mutabilis*, інфікованих AR3046.

30 Був виявлений дуже сильний ефект AR3046, коли рослинний матеріал *E. mutabilis*, узятий від рослин, інфікованих AR3046, був включений до штучного раціону, яким годували яблуневу міль. Середній процент личинок, які прижилися та почали годуватися протягом перших 24 годин після приміщування новонароджених личинок на тестовані раціони, складав: 88% в середньому для трьох інших видів *Elymus*, не інфікованих ендосфітами, у порівнянні з 4% для личинок, раціон яких містив *E. mutabilis*, інфікований AR3046. На День 10 випробувань, 60% личинок, яких годували рослинним матеріалом без ендосфітів, пройшли линяння до першої вікової стадії

35

(instar) у порівнянні з лише 13% личинок, яких годували AR3046, що линяли до першої вікової стадії. Результати цих випробувань наведені нижче у Таблиці 10.

Таблиця 10.

Частка яблуневої молі, яка прижилася на раціонах після 24 год. та почала годуватися після 24 та 48 год., і середній час до першого линяння при приміщуванні на раціони, що містять ліофілізований рослинний матеріал *Elymus* без ендоефітів або інфікований продукуючими лолін ендоефітами AR3046.

Рослина	Ендоефіт	Частка тих, що прижилися	Частки тих, що годувалися		Час до 1-го линяння
		24 год.	24 год.	48 год.	Ln днів
<i>Elymus</i> sp.	немає	0,91	0,83	0,87	2,176
<i>Elymus mutabilis</i>	AR3046	0,05	0,05	0,00	2,716
SED		0,153	0,102	0,129	0,1079
P		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

- 5 Результати цих випробувань з міллю є сильним свідченням на користь того, що AR3046 продукує лолінові алкалоїди, відповідальні за відлякування трав'яної яблуневої молі.

ПРИКЛАД 11

Захист від шкідників інфікованого ендоефітом *Secale*

- 10 Був поставлений експеримент з випробування здатності ендоефіта захищати *Secale* від кореневих нематод (*Pratylenchus* spp.), з використанням пагонів *Secale cereale*, сорт Rahu, з ендоефітом AR3046 або без нього. Одинадцять індивідуальних пагонів E+ та E- Rahu, вибраних з 4 незалежних батьківських рослин на групу обробки (2-3 клони на батьківську рослину) пересаджували в глибокі лотки (deep root trainers) розміром 5×5×12 см, що містять 100 г зібраного в полі ґрунту з природним зараженням 30 *Pratylenchus* spp. на 100 г. До кожного лотка
- 15 додавали додатково 30 вирощених в лабораторії *Pratylenchus penetrans*, так щоб кожна рослина була доступною для 60 нематод. Рослини інкубували в освітлюваній камері росту при 20 °C протягом 30 днів. Рослини потім видаляли з ґрунту, корені промивали, потім очищали з використанням 1,5% хлориду натрію протягом 3 хвилин. Нематод у коренях забарвлювали з використанням анілінового синього в гліцерині. Корені потім аналізували під мікроскопом та
- 20 підраховували число нематод у кореневій системі. Ендоефітна інфекція не впливала на вагу коренів.

Присутність ендоефіта AR3046 спричинювала значне ($P < 0,05$) зменшення числа нематод на кореневу систему (Таблиця 11).

- 25 Як було показано у випробуваннях з відлякування комах, описаних вище, результати цих випробувань з нематодами надають сильні докази на користь того, що лолінові алкалоїди, продуковані AR3046, відповідають за надання інфікованим *Secale* принаймні деякого рівня захисту від шкідників шляхом перешкоджання колонізації нематодами коренів інфікованих ендоефітами рослин *Secale*. Це узгоджується з тим, що для лолінів були продемонстровані ефекти відлякування та пестицидної дії на нематод (Bacetty et al., 2009a 2009b).

30

Таблиця 11.

Число кореневих нематод (*Pratylenchus* spp.) у коренях рослин *Secale cereale*, сорт Rahu, з ендоефітами (AR3046) та без ендоефітів (E-) ($P = 0,013$).

Ендоефіти	Число нематод на рослину
AR3046	3,4
E-	8,1

ПРИКЛАД 12

Вплив *Secale cereale* var. "Rahu", інфікованого ендоефітами AR3046, на *Cerodontha australis*

- 35 Злакові трави та зернові в Новій Зеландії та Австралії часто інфікуються личинками мінуючої мухи *Cerodontha australis* (Diptera: Agromyzidae), також відомої як wheat sheath miner (мінер піхв листків пшениці). Личинки цієї мухи поїдають зсередини тканини ряду злакових та зернових, спричинюючи ушкодження, які можуть призвести до загибелі пагона. Мінери залишають видимі сліди у листках.

В цьому експерименті рослини *S. cereale* cv. Rahu, інфіковані продукуючим лолін ендоефітом AR3046 або неінфіковані (Nil), були піддані зараженню *S. australis*. Вівсяниця лугова, інфікована її природним ендоефітом *Neotyphodium uncinatum*, була включена в експеримент тому, що цей ендоефіт також продукує лолінові алкалоїди.

5 Метод

По шість рослин кожного з *Secale* "Rahu", інфікованого AR3046, та вівсяниці лугової, інфікованої *N. uncinatum*, з їх аналогами, що не містять ендоефітів (Nil), порівнювали на їх вплив на зараження *S. australis*. Рослини випадково розподіляли на однакові експериментальні групи, які включали по одній рослині кожного типу, і по чотири лялечки мінулої мухи, вирізані з рослин райграсу пасовищного, вирощуваних у наметі (screenhouse) розміщали у основи кожної рослини (між пагонами). Крім того, по одній дорослій самці та по одному самцю мухи, які вже вилупилися із зібраних лялечок, випускали в експериментальні групи 1-5, і одного самця – в експериментальну групу 6. Кожну експериментальну групу з чотирьох рослин накривали тонкою сіткою, натягнутою на проволочну клітку. Клітки знімали з рослин через 2 тижня після їх встановлення. Експеримент проводили у теплиці з максимальною денною температурою 22 °C і рослини поливали вручну у разі потреби.

Число пагонів і кількість та довжину ходів личинок в кожному листі реєстрували через 4 та 6 тижнів після розміщення лялечок та дорослих комах на рослинах, і присутність ушкоджень від личинок або лялечок в кожному стеблі - через 6 тижнів.

Лічильні дані піддавали логарифмічному перетворенню (ln), і пропорційні дані перетворювали добуванням квадратного кореня перед проведенням аналізу за допомогою програми Genstat v16 методом дисперсійного аналізу (ANOVA) з даними, зблокованими по експериментальним групам.

Результати

Лише одна з шести рослин Rahu, інфікованих AR3046, була заражена мухами, у порівнянні з усіма шістьма рослинами Rahu Nil. Число пагонів/рослину ($P < 0,001$) та частка пагонів ($P < 0,002$), заражених *S. australis*, на Rahu, інфікованих AR3046, були істотно нижчими, ніж на Rahu Nil, в обидва моменти контролю через 4 та 6 тижнів (Таблиця 12). Крім того, AR3046 знижував число ходів/рослину ($P < 0,001$) (ходи є вертикальними слідами, які залишають личинки, що поїдають тканини усередині рослини), та число стебел пагонів (тобто, нижніх частин кожного пагона), які були ушкоджені або містили личинок чи лялечок.

Рослини вівсяниці лугової були загалом сильніше заражені мухами, причому всі рослини були атаковані. Інфекція *N. uncinatum* у вівсяниці лугової знижувала частку пагонів, заражених *S. australis* в моменти часу 4 ($P < 0,007$) та 6 тижнів ($P < 0,002$) (Таблиця 12). Крім того, істотно менше ($P < 0,05$) стебел пагонів були ушкоджені або містили личинок в інфікованій ендоефітом вівсяниці лугової у порівнянні з рослинами без ендоефітів.

Середнє число живих пагонів, число ушкоджених пагонів, частка ушкоджених пагонів та число ходів/рослину, спричинених *Cerodontha australis* через 4 та 6 тижнів після того, як лялечки та дорослі комахи були випущені на рослини *Secale cereale* var. "Rahu" та вівсяниці лугової з (MF *N. unc.*) та без (MF Nil) ендоефітів, наведені у таблиці нижче. Середнє число пагонів з ушкодженнями та або лялечками у стеблі пагонів наведене для контрольної перевірки в момент часу 6 тижнів. Дані для середніх чисел піддані логарифмічному (ln) перетворенню і дані для часток перетворювали добуванням квадратного кореня.

Таблиця 12.

	Rahu AR3046	Rahu Nil	MF N unc.	MF Nil	SED ¹	Rahu ² P-значення	MF ² P-значення
4 тижня							
Число живих пагонів/рослину	4,04	3,01	3,89	3,35	0,309	0,005	0,103
Число ушкоджених пагонів/рослину	-0,33	1,43	2,37	2,73	0,365	<,001	0,349
Частка ушкоджених пагонів	0,04	0,45	0,58	0,93	0,113	0,002	0,007
Число ходів/рослину	-0,33	1,64	2,56	3,26	0,370	<,001	0,077
6 тижнів							
Число живих пагонів/рослину	3,67	3,15	3,88	3,33	0,309	0,114	0,092
Число ушкоджених пагонів/рослину	-0,69	1,82	2,50	2,92	0,332	<,001	0,222
Частка ушкоджених пагонів	0,00	0,53	0,62	1,03	0,106	<,001	0,002
Число ходів/рослину	-0,69	2,24	2,71	3,35	0,330	<,001	0,075
Число пагонів з ушкодженням стебла	-0,69	1,55	1,66	2,52	0,396	<,001	0,046

¹SED = стандартна помилка різниці для порівнянь усіх чотирьох груп обробки

²P-значення призначені для порівняння між інфікованими рослинами та рослинами без ендоефітів усередині видів

Висновки

Інфекція *Secale* cv. Rahu, інфікованого продукуючим лолін ендоефітом AR3046, істотно знижувала зараження мінулою мухою *Cerodontha australis*. Інші продукуючі лолін види ендоефітів вівсяниці лугової також знижували частку пагонів, ушкоджених личинками мух та число пагонів з ушкодженням стебла.

Результати цих випробувань надають сильні докази на користь того, що лолінові алкалоїди, продуковані AR3046, відповідають за надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників інфікованим *Secale* spp. шляхом зниження зараження *C. australis* інфікованих ендоефітом рослин *Secale* spp. Це узгоджується з продемонстрованими для лолінів ефектами відлякування та пестицидної дії на інших комах та шкідників рослин (Schardl et. al., 2007; Bacetty et al., 2009a 2009b).

ПРИКЛАД 13

Вплив "Rahu" *Secale*, інфікованого ендоефітом AR3046, на пінниць

Був проведений експеримент з порівняння впливу *Secale cereale* var. Rahu, інфікованого AR3046, та вівсяниці лугової, інфікованої її природним продукуючим лолін ендоефітом *N. uncinatum*, разом з відповідними неінфікованими контролями, на комаху-шкідника *Phlaenus spumarius* (пінниця), що поїдає ксилему, яку вважають чутливою до лолінових алкалоїдів. Рослини клонували так, щоб в кожному експерименті з різними комахами використовувалося шість генетично ідентичних рослин інфікованого Rahu та інфікованої і неінфікованої вівсяниці лугової, але лише три з шести рослин Rahu без ендоефітів були однаковими.

Було проведено два експерименти, перший з використанням зрілих німф пінниці, які швидко розвивалися в дорослих особин, і другий з використанням молодших німф. В обох випадках на кожну рослину випускали по три пінниці. В першому експерименті рослини накривали ацетатними клітками, які не були повністю непроникними для комах, в той час як в другому експерименті використовували непроникні для комах найлонові покриття. Число присутніх пінниць і число малих, середніх та великих грудок "слини", які пінниці виділяють при годуванні, регулярно підраховували протягом кожного експеримента. *Secale* Rahu, інфіковані AR3046, зменшували як число, так і кількість "слини", продукованої пінницями, у порівнянні з рослинами без ендоефітів (Фігура 3).

В першому експерименті, істотно менше пінниць були присутніми на рослинах з AR3046 порівняно з рослинами без ендоефітів протягом усього експерименту, тоді як в другому експерименті зменшення кількості було значним лише на початку експеримента. На відміну від цих результатів, інфікована ендоефітами вівсяниця лугова не впливала на число або на годування пінниць.

Результати цих випробувань надають сильні докази на користь того, що лолінові алкалоїди, продуковані AR3046, відповідають за надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників інфікованим *Secale* шляхом зниження зараження пінницями інфікованих ендоефітом рослин *Secale*. Це узгоджується з продемонстрованими для лолінів ефектами відлякування та пестицидної дії на інших комах та шкідників рослин (Schardl et. al., 2007; Bacetty et al., 2009a 2009b).

ПРИКЛАД 13

Випробування з хворобами рослин

Наступні одержані *in vitro* результати демонструють вплив вибраних ендоефітів на грибові патогени зернових, включаючи інгібування розвитку ряду патогенних та сапротрофних грибів. Наприклад, ряд штамів ендоефітів в значному ступені ($P \leq 0,05$) інгібували міцеліальний ріст *Fusarium graminearum* та *Rhizoctonia solani* (Фіг. 4 та Фіг. 5). Ці два патогени є причинними факторами фузаріозу колоса та ризоктоніозу, відповідно, які обидва є спустошливими хворобами зернових культур. Ці ендоефіти мають потенціал забезпечення захисту проти багатьох хвороб зернових. Без бажання обмежуватися теорією зазначимо, що, на думку авторів винаходу, хоча досі не були ідентифіковані механізми дії, відповідальні за таке інгібування, ймовірним механізмом є антобіоз внаслідок продукування невідомих вторинних метаболітів.

Результати випробувань продемонстрували, що ряд штамів ендоефітів істотно ($P \leq 0,05$) інгібує міцеліальний ріст *Fusarium graminearum* (Фіг. 4) та *Rhizoctonia solani* (Фіг. 5).

Хоча винахід був описаний як приклад та з посиланням на конкретні варіанти реалізації, слід розуміти, що модифікації та/або удосконалення можуть бути зроблені без виходу за межі обсягу винаходу.

Крім того, у випадках, коли ознаки або аспекти винаходу описані за допомогою груп Маркуша, кваліфікованим фахівцем буде зрозуміло, що винахід також описаний при цьому для будь-якого індивідуального члена або підгрупи членів групи Маркуша.

Кваліфікований фахівець зрозуміє, що винахід, як він викладений та описаний в даному

документі, не обмежений лише описаними аспектами, варіантами реалізації та прикладами, але також охоплює по суті та в обсязі винаходу ті варіанти та модифікації винаходу, які будуть очевидними кваліфікованим фахівцем в даній галузі техніки (включаючи пересічного фахівця в даній галузі техніки) з урахуванням розкриття, зробленого в даному документі, та відомого рівня техніки.

ПРОМИСЛОВА ЗАСТОСОВНІСТЬ

Штами ендоефітів з роду епіхлоае (*Epichloae*), симбіози рослина/грибок, насіння, продуковане такими симбіозами, та способи одержання таких симбіозів відповідно до винаходу, розкриті в даному документі, усі мають промислову застосовність у вирощуванні рослин, які використовуються для споживання людиною або тваринами.

ПОСИЛАННЯ

Bacetty AA, Snook ME, Glenn AE, Noe JP, Hill N, Culbreath A, Timper P, Bacon CW (2009a) Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *Phytopathology* 99: 1336-1345

Bacetty AA, Snook ME, Glenn AE, Noe JP, Nagabhyru P, Bacon CW (2009b) Chemotaxis disruption in *Pratylenchus Scribneri* by tall fescue root extracts and alkaloids. *Journal of Chemical Ecology* 35: 844-850

Blankenship JD, Spiering MJ, Wilkinson HH, Fannin FF, Bush LP, Schardl CL (2001). Production of loline alkaloids by the grass endophyte, *Neotyphodium uncinatum*, in defined media. *Phytochemistry* 58: 395-401

Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20: 1004-1010

Bush LP, Wilkinson HH, Schardl CL (1997) Bioprotective Alkaloids of Grass-Fungal Endophyte Symbioses. *Plant Physiology* 114: 1-7

Casida JE, Quistad GB (1998) Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annual Review of Entomology* 43: 1-16.

Christensen MJ (1995) Variation in the ability of *Acremonium* endophytes of *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *F. pratensis* to form compatible associations in the 3 grasses. *Mycological Research* 99: 466-470

Christensen MJ, Bennett RJ, Schmid J (2002) Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. *Mycological Research* 106: 93-106

Christensen MJ, Bennett RJ, Schmid J (2001) Vascular bundle colonisation by *Neotyphodium* endophytes in natural and novel associations with grasses. *Mycological Research* 105: 1239-1245

Christensen MJ, Leuchtmann A, Rowan DD, Tapper BA (1993) Taxonomy of *Acremonium* Endophytes of Tall Fescue (*Festuca-Arundinacea*), Meadow Fescue (*F-Pratensis*) and Perennial Ryegrass (*Lolium-Perenne*). *Mycological Research* 97: 1083-1092

Christensen MJ, Simpson WR, Al Samarrai T (2000) Infection of tall fescue and perennial ryegrass plants by combinations of different *Neotyphodium* endophytes. *Mycological Research* 104: 974-978

Christensen MJ, Saulsbury K, Simpson WR (2012) Conspicuous epiphytic growth of an interspecific hybrid *Neotyphodium* sp. endophyte on distorted host inflorescences. *Fungal Biology* 116: 42-48

Felsenstein, J. (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle

Garthwaite I, Sprosen J, Briggs L, Collin R, Towers N (1994) Food quality on the farm: Immunological detection of mycotoxins in New Zealand pastoral agriculture. *Food & Agricultural Immunology* 6: 123-129

Glenn AE, Bacon CW, Price R, Hanlin RT (1996) Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88: 369-383

Huson D, Richter D, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R (2007) Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC bioinformatics* 8: 460

Kennedy CW, Bush LP (1983) Effect of environment and management factors on the accumulation of N-acetyl and N-formyl loline alkaloids in tall fescue. *Crop Science* 23: 547-552

Koulman A, Lane GA, Christensen MJ, Fraser K, Tapper BA (2007) Peramine and other fungal alkaloids are exuded in the guttation fluid of endophyte-infected grasses. *Phytochemistry* 68: 355-360

Latch GCM, Christensen MJ (1985) Artificial Infection of Grasses with Endophytes. *Annals of Applied Biology* 107: 17-24

Malinowski DP, Belesky DP (2000) Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*: 40: 923-940

- Marshall D, Tunali B, Nelson LR (1999) Occurrence of fungal endophytes in species of wild triticum. *Crop Science* 39: 1507-1512
- Miller JS, Funk VA, Wagner WL, Barrie F, Hoch PC, Herendeen P (2011) Outcomes of the 2011 botanical nomenclature section at the XVIII International Botanical Congress. *PhytoKeys* 5: 1-3
- 5 Moon CD, Tapper BA, Scott B (1999) Identification of *Epichloë* endophytes in planta by a microsatellite-based PCR fingerprinting assay with automated analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1268-1279
- Moon CD, Craven KD, Leuchtmann A, Clements SL, Schardl CL (2004). Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology* 13 (6): 1455-1467
- 10 Porter JK (1994). Chemical constituents of grass endophytes. In: Bacon, C.W., White Jr., J.F (Eds), *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 103-123
- Rasmussen S, Lane GA, Mace W, Parsons AJ, Fraser K, Xue H (2012) The use of genomics and metabolomics methods to quantify fungal endosymbionts and alkaloids in grasses. *Methods in Molecular Biology* 860: 213-226
- 15 Rowan DD (1993) Lolitrems, peramine and paxilline: mycotoxins of the ryegrass/endophyte interaction. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 44:, 103-122
- Rowan DD, Latch GCM (1994) Utilization of endophyte-infected perennial ryegrasses for increased insect resistance. In: Bacon CW, White Jr. JF (eds), *Biotechnology of Endophyte Fungi of Grasses*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 169-183
- 20 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74 (12): 5463–5467
- Schardl CL, Craven KD, Speakman S, Stromberg A, Lindstrom A, Yoshida R (2008). A novel test for host-symbiont codivergence indicates ancient origin of fungal endophytes in grasses. *Syst Biol.* 57: 483-498
- 25 Schardl CL, Grossman RB, Nagabhyru P, Faulkner JR, Mallik UP (2007) Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry* 68: 980-996
- Schardl CL, Young CA, Faulkner JR, Florea S, Pan J (2012) Chemotypic diversity of *epichloae* fungal symbionts of grasses. *Fungal Ecology* 5: 331-344
- 30 Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234
- Simpson WR, Mace WJ (2012) Novel associations between *epichloae* endophytes and grasses: Possibilities and outcomes. In 'Epichloae, endophytes of cool season grasses: Implications, utilization and biology.' (Eds CA Young, GE Aiken, RL McCulley, JR Strickland, CL Schardl.) pp. 35-39. (The Samuel Roberts Noble Foundation: Ardmore, Oklahoma)
- 35 Simpson WR, Schmid J, Singh J, Faville MJ, Johnson RD (2012) A morphological change in the fungal symbiont *Neotyphodium lolii* induces dwarfing in its host plant *Lolium perenne*. *Fungal Biology* 116: 234-240
- Subramanian AR, Kaufmann M, Morgenstern B (2008) DIALIGN-TX: greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment. *Algorithms for Molecular Biology* 3: article 6
- 40 Tanaka A, Tapper BA, Popay A, Parker EJ, Scott B (2005) A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiont from insect herbivory. *Molecular Microbiology* 57: 1036-1050
- 45 Tsai HF, Liu JS, Staben C, Christensen MJ, Latch GC, Siegel MR, Schardl CL (1994). Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grass by hybridization with *Epichloë* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (7): 2542-2546
- Welty RE, Azevedo MD, Cooper TM (1987) Influence of moisture content, temperature, and length of storage on seed germination and survival of endophytic fungi in seeds of tall fescue and perennial ryegrass. *Phytopathology* 77: 893-900
- 50 Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL (2000). Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 1027-1033
- Yates SG, Fenster JC, Bartelt RJ (1989) Assay of tall fescue seed extracts, fractions and alkaloids using the large milkweed bug. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 37: 354-357
- 55 Zejda JE, McDuffie HH, Dosman JA (1993) Epidemiology of health and safety risks in agriculture and related industries - Practical applications for rural physicians. *Western Journal of Medicine* 158: 56-63
- Zhang, DX, Nagabhyru P, Blankenship JD, Schardl CL (2010) Are loline alkaloid levels regulated in grass endophytes by gene expression or substrate availability? *Plant Signaling and Behavior* 5 (11):
- 60

1419-22

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110>	ГРАССЛАНЗ ТЕКНОЛОДЖІ ЛІМІТЕД	
<120>	ГРИБКОВІ ЕНДОФІТИ З ПОЛІПШЕНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ	
<130>	640964 JBA	
<160>	30	
<170>	PatentIn версія 3.5	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	1	
	tgtaaaacga cggccagt	18
<210>	2	
<211>	7	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	2	
	gtttctt	7
<210>	3	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	3	
	cgctcagggc tacatacacc atgg	24
<210>	4	
<211>	23	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	4	
	ctcatcgagt aacgcaggcg acg	23
<210>	5	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	

<400> 5		
tacctctgca cgggtgtattc c		21
<210> 6		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Праймер, штучний		
<400> 6		
tgcataaacac tcaccttata gtcg		24
<210> 7		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> Праймер, штучний		
<400> 7		
gcgttgagga ggctagatag aa		22
<210> 8		
<211> 22		
<212> ДНК		
<213> Праймер, штучний		
<400> 8		
ttccaagctg аасааааgtc aa		22
<210> 9		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Праймер, штучний		
<400> 9		
gatgacgtat cttgatgcta ccac		24
<210> 10		
<211> 24		
<212> ДНК		
<213> Праймер, штучний		
<400> 10		
cgtgtataaa gttcgggatc ctat		24
<210> 11		
<211> 24		

<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 11	
gagatatccc gtctcctgat ctaa	24
<210> 12	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 12	
cacagcgta cactatcaac ttcc	24
<210> 13	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 13	
cacagcgta cactatcaac ttcc	24
<210> 14	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 14	
agacaggtaa gaagttttcc cctt	24
<210> 15	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 15	
agctttccaa tgacgacata cata	24
<210> 16	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 16	
taatttaggg tagcattttc tccg	24

<210> 17	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 17	
ggtccttatt ctaatgcagg tatg	24
<210> 18	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 18	
cagtgtacgg gactttgtca atac	24
<210> 19	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 19	
tgtataataa acatggcgtg ctct	24
<210> 20	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 20	
gtgttgaaag ttgttgatc actc	24
<210> 21	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 21	
cgaattgta gactatgttg gagc	24
<210> 22	
<211> 24	
<212> ДНК	
<213> Праймер, штучний	
<400> 22	
gtagatgtat tttagcagg gctt	24

<210>	23	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	23	
	gagtgagacc cggtagta agtc	24
<210>	24	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	24	
	gagtcattct tcgtccattg tctt	24
<210>	25	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	25	
	gaaatgaggc gtctatctta aagc	24
<210>	26	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	26	
	tttcttgatt tccaaagaac aaca	24
<210>	27	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	
<400>	27	
	ctgctagaca tacttggaac atgg	24
<210>	28	
<211>	24	
<212>	ДНК	
<213>	Праймер, штучний	

<400> 28
cagtcgaata atttagggag catt

24

<210> 29
<211> 20
<212> ДНК
<213> Праймер, штучний

<400> 29
tcggcctcac gacgcacaac

20

<210> 30
<211> 24
<212> ДНК
<213> Праймер, штучний

<400> 30
cccatacatt acacctttct ggcg

24

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50716, для підвищення стійкості до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
- 10 2. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50576, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
- 15 3. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50577, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
- 20 4. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50578, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
- 25 5. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50718, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
- 30 6. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50719, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
- 35 7. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50720, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
8. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50721, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.
9. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50722, для підвищення резистивності до шкідників та/або

хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.

10. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50723, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.

11. Виділений штам грибового ендofіта, що є видом *Neotyphodium* групи *Epichloae*, депонований за номером NRRL 50724, для підвищення резистивності до шкідників та/або хвороб штучно інфікованих рослин *Secale* spp. або насіння *Secale* spp., де рослина і ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію.

12. Виділений штам за будь-яким з пп. 1-11, який є біологічно чистим.

13. Рослина *Secale* spp., інфікована грибовим ендofітом виду *Neotyphodium* групи *Epichloae*, де *Secale* spp. не є природним хазяїном ендofіта, і де рослина та ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію, що дозволяє рослині розвиватися в нормальному життєвому циклі, рослина *Secale* spp., інфікована грибовим ендofітом, має підвищену резистентність до одного чи декількох шкідників або підвищену резистентність до принаймні однієї хвороби рослин, або обидві, у порівнянні з рослиною *Secale* spp., не інфікованою грибовим ендofітом.

14. Рослина *Secale* spp. за п. 13, у якій ендofіт передається від першого покоління *Secale* spp. другому поколінню *Secale* spp. шляхом вертикальної передачі.

15. Рослина *Secale* spp. за п. 14, у якій вертикальна передача від першого покоління рослин-хазяїнів другому поколінню рослин-хазяїнів відбувається через насіння.

16. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій ендofіт є ендofітом, виділеним з *Elymus* spp.

17. Рослина *Secale* spp. за п. 16, у якій ендofіт виділений з *Elymus mutabilis*.

18. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій ендofіт є вибраним з групи, що складається з NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50577, NRRL 50578, NRRL 50718, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50721, NRRL 50722, NRRL 50723 і NRRL 50724 або їх комбінацій.

19. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій ендofіт є вибраним з групи, що складається з NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50578, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50722 та NRRL 50724.

20. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій ендofіт є NRRL 50576, NRRL 50578 або NRRL 50720.

21. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій рослина *Secale* spp., інфікована грибовим ендofітом, не демонструє зовнішніх симптомів ендofітної інфекції.

22. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій рослина *Secale* spp., інфікована грибовим ендofітом, демонструє нормальний морфологічний фенотип.

23. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій рослина *Secale* spp., інфікована грибовим ендofітом, продукує лолінові алкалоїди та/або перамін.

24. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій рослина *Secale* spp., інфікована грибовим ендofітом, має підвищену резистентність до одного чи декількох шкідників, де шкідники вибрані з групи, що складається з: (1) видів попелиці (Aphididae), представлених *Rhopalosiphum padi*, *Schizaphis graminum*, *Rhopalosiphum maidis*, *Metopolophium dirhodum*, *Sitobion* spp., *Sitobion avenae*, *Sitobion fragariae*, *Diuraphis noxis*; (2) видів злакових та зернових мух (Agromyzidae; Anthomyiidae, Chloropidae, Cephidae та Cecidomyiidae), представлених *Oscinella frit*, *Oscinella pusilla*, *Mayetiola destructor*, *Cerodontha* spp., *Cerodontha australis*, *Cerodontha angustipennis*, *Formia fumigata*, *Meromyza americana*, *Haplodiplosis marginata*, *Chlorops pumilionis*, *Tipula* spp., *Chromatomyia fuscata*, *Cephus pygmaeus*, *Chromatomyia fuscata*, *Contarinia tritici*; (3) видів трипсів (Thripidae), представлених *Limothrips cerealis*, *Limothrips denticornis*, *Aptinothrips rufus*, *Stenothrips graminum*; (4) видів коників та цвіркунів (Acrididae та Gryllidae), представлених *Locusta migratoria*, *Phaulacridium marginale*, *Phaulacridium vittatum*, *Melanoplus* spp., *Teleogryllus commodus*; (5) видів клопів (Lygaeidae), представлених *Nyssius huttoni*, *Blissus leucopertus leucopertus*; (6) видів довгоносику (Curculionidae), представлених *Sphenophorus* spp.; (7) видів похідних черв'яків та озимих черв'яків (Noctuidae), представлених *Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera* spp., *Mythimna separata*; *Persectania aversa*, *Agrostis ipsilon*; (8) видів листоїдів (Chrysomelidae), представлених *Oulema melanopus*; (9) личинок хрущів (Scarabaeidae), представлених видами *Popillia japonica*, *Costelytra zealandica*, *Phyllopertha* spp., *Rhizotrogus majalis*, *Anisoplia segetum*; (10) видів борошнистого червця (Pseudococcidae та Coccidae), представлених *Phenacoccus hordei*, *Balanococcus poae*, *Ripersella rumicis*, *Porphyrophora tritici*; (11) видів дротяників (Elateridae), представлених *Conoderus* spp., *Limoni* spp.; видів жуків (Carabidae), представлених *Zabrus tenebrioides*; (13) видів кліщів (Eriophyidae та

- Penthaleidae), представлених *Penthaleus* spp., *Halotydeus destructor*, *Aceria* spp.; (14) видів шкідників запасів продуктів (Curculionidae, Silvanidae, Pyralidae, Gelechiidae, Tenebrionidae, Bostrichidae), представлених *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Sitotroga cerealella*, *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes* spp., *Oryzaephilus surinamensis*, *Cadra cautella*, *Plodia interpunctella*, *Tribolium confusum*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma erricorne*; (15) видів пінниць (Cercopoidea), представлених *Philaenus spumarius*, (16) видів нематод, представлених кореневою нематодою (*Pratylenchus* spp., зокрема *P. thornei*, *P. crenatus*, *P. neglectus* та *P. penetrans*), вівсяною нематодою (*Heterodera* spp. та *Punctodera* spp., зокрема *H. avenae*, *H. latipons*, *H. hordecalis*, *H. filipjevi*, *H. mani*, *H. bifenestra*, *H. pakistanensis* та *P. punctata*), галовою нематодою (*Meloidogyne* spp., зокрема *M. chitwoodi*, *M. naasi*, *M. artiellia*, *M. microtyla*, *M. ottersoni*, *M. graminicola*, *M. graminis*, *M. kikuyensis* та *M. spartinae*), стебловою нематодою (*Ditylenchus* spp., зокрема *D. dipsicai* та *D. radicola*); пшеничною нематодою (*Anguina tritici*); (16) видів слимаків (*Deroceras reticulatum* та *Arion* spp. зокрема *A. hortensis* agg. та *A. subfuscus*). В одному варіанті реалізації шкідники є нематодами, краще кореневими нематодами (*Pratylenchus* spp.), або мінуючими мухами *Cerodontha australis* (Diptera: Agromyzidae), також відомими як wheat sheath miner (мінер піхв листків пшениці).
25. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, у якій рослина *Secale* spp., інфікована грибковим ендоефітом, має підвищену резистентність до принаймні однієї хвороби рослин, де хвороба рослин спричинена рослинним патогеном, вибраним з групи, що складається з вірусу жовтої карликовості ячменю (Luteovirus), ґрунтового вірусу мозаїки пшениці (Furovirus) та вірусу смугастої мозаїки пшениці (Tritimovirus), *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Colletotrichum graminicola*, *Glomerella graminicola* [телеоморфа], *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum*, *Mycosphaerella tassiana* [телеоморфа], *Epicoccum* spp., *Sporobolomyces* spp., *Stemphylium* spp., *Bipolaris sorokiniana*, *Cochliobolus sativus* [телеоморфа], *Fusarium* spp., *Tilletia caries*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia foetida*, *Hymenula cerealis*, *Cephalosporium gramineum*, *Helminthosporium sativum*, *Cochliobolus sativus* [телеоморфа], *Coprinus sychromorbidus*, *Dilophospora alopecuri*, *Tilletia controversa*, *Claviceps purpurea*, *Sphacelia segetum* [анаморфа], *Fusarium culmorum*, *Pseudoseptoria donacis*, *Selenophoma donacis*, *Neovossia indica*, *Tilletia indica*, *Puccinia recondita*, *Aecidium clematidis* [анаморфа], *Cercosporidium graminis*, *Scolicotrichum graminis*, *Phaeosphaeria herpotrichoides*, *Leptosphaeria herpotrichoides*, *Ustilago tritici*, *Microdochium nivale*, *Fusarium nivale*, *Monographella nivalis* [телеоморфа], *Erysiphe graminis*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium ultimum*, *Gibberella zeae*, *Fusarium graminearum* [анаморфа], *Septoria secalis*, *Septoria tritici*, *Mycosphaerella graminicola* [телеоморфа], *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia zeae*, *Blumeria* spp., *Ceratobasidium cereale* [телеоморфа], *Myriosclerotinia borealis*, *Sclerotinia borealis*, *Typhula idahoensis*, *Typhula incarnate*, *Typhula ishikariensis*, *Typhula ishikariensis* var. *canadensis*, *Stagonospora nodorum*, *Septoria nodorum*, *Phaeosphaeria nodorum* [телеоморфа], *Leptosphaeria nodorum*, *Urocystis occulta*, *Puccinia graminis*, *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Tapesia acuformis* [телеоморфа], *Uredo glumarum* [анаморфа], *Pyrenophora tritici-repentis*, *Drechslera tritici-repentis* [анаморфа], *Helminthosporium tritici-repentis*, *Puccinia triticina*, *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis* та *Fusarium pseudograminearum*.
26. Рослина *Secale* spp. за п. 25, у якій рослинним патогеном є *Puccinia recondita*, *Puccinia triticina*, *Puccinia graminis*, *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhynchosporium secalis*, *Puccinia striiformis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani* або *Fusarium pseudograminearum*.
27. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, де *Secale* spp. вибирають з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*.
28. Рослина *Secale* spp. за будь-яким з пп. 13-15, де *Secale* spp. є *Secale cereale*.
29. Спосіб одержання стабільної комбінації рослина-хазяїн/грибковий ендоефіт виду *Neotyphodium* групи *Epichloae*, який включає штучне інфікування рослини *Secale* spp. принаймні одним грибковим ендоефітом, що утворює стабільну комбінацію з інюльованою рослиною, причому рослина-хазяїн не демонструє зовнішніх симптомів ендоефітної інфекції і має нормальний життєвий цикл, і де комбінація має підвищену резистентність до одного чи декількох шкідників або підвищену резистентність до принаймні однієї хвороби рослин, або обидві, у порівнянні з рослиною *Secale* spp., не інфікованою грибковим ендоефітом.
30. Спосіб за п. 29, у якому стабільна комбінація рослина-грибок є достатньо стабільною, щоб дозволити вертикальну передачу ендоефіта.
31. Спосіб за п. 30, у якому вертикальна передача здійснюється за допомогою відростків або

частин рослини, призначених для вегетативного розмноження.

32. Спосіб за п. 30 або 31, у якому вертикальна передача здійснюється квітковими пагонами, що дають насіння.
33. Спосіб за будь-яким з пп. 30-32, у якому вертикальна передача ендofіта приводить до вертикальної передачі ендofіта від першого покоління другому поколінню рослин-хазяїнів.
34. Спосіб за будь-яким з пп. 30-32, у якому вертикальна передача від першого покоління рослини-хазяїна другому поколінню рослини-хазяїна відбувається через насіння.
35. Спосіб за будь-яким з пп. 29-34, у якому спосіб додатково включає стадію вибору рослини-хазяїна *Secale* spp., що не виявляє зовнішніх симптомів ендofітної інфекції, з популяції інфікованих рослин-хазяїнів.
36. Спосіб за будь-яким з пп. 29-35, у якому *Secale* spp. вибирають з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*.
37. Спосіб за будь-яким з пп. 29-36, у якому *Secale* spp. є *Secale cereale*.
38. Спосіб за будь-яким з пп. 29-37, у якому принаймні один грибовий ендofіт є ендofітом, виділеним з *Elymus* spp.
39. Спосіб за будь-яким з пп. 29-38, у якому грибовий ендofіт виділений з *Elymus mutabilis*.
40. Спосіб за п. 39, у якому ендofіт вибирають з групи, що складається з NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50577, NRRL 50578, NRRL 50718, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50721, NRRL 50722, NRRL 50723 і NRRL 50724 та їх комбінацій.
41. Спосіб за п. 40, у якому ендofіт є NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50578, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50722 або NRRL 50724.
42. Спосіб за п. 41, у якому ендofіт є NRRL 50576, NRRL 50578 або NRRL 50720.
43. Спосіб надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників рослині-хазяїну *Secale* spp., який включає штучне інфікування рослини *Secale* spp. принаймні одним грибовим ендofітом виду *Neotyphodium* групи *Epichloae*, де комбінація грибовий ендofіт-рослина *Secale* продукує принаймні один алкалоїд на рівні, достатньому для надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників рослині-хазяїну, де рослина й ендofіт утворюють стабільну симбіотичну асоціацію, яка забезпечує рослині можливість розвиватися у нормальному життєвому циклі.
44. Спосіб за п. 43, у якому принаймні один алкалоїд є алкалоїдом, вибраним з групи, що складається з пераміну, *N*-ацетилнорлоліну, лоліну, *N*-форміллоліну, *N*-ацетиллоліну та *N*-метиллоліну.
45. Спосіб за п. 43 або п. 44, у якому принаймні один алкалоїд є лоліном або пераміном або обома.
46. Спосіб за п. 43 або п. 44, у якому спосіб додатково включає стадію вибору комбінації грибовий ендofіт-рослина *Secale*, що продукує принаймні один алкалоїд на рівні, достатньому для надання принаймні деякого рівня захисту від шкідників рослині-хазяїну.
47. Спосіб за п. 43 або п. 44, у якому *Secale* spp. вибирають з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*.
48. Спосіб за п. 43 або п. 44, у якому *Secale* spp. є *Secale cereale*.
49. Спосіб за п. 43 або п. 44, у якому принаймні один грибовий ендofіт є ендofітом, виділеним з *Elymus* spp.
50. Спосіб за п. 43 або п. 44, у якому грибовий ендofіт виділений з *Elymus mutabilis*.
51. Спосіб за п. 43 або п. 44, у якому грибовий ендofіт є ендofітом виду *Neotyphodium* групи *Epichloae*.
52. Спосіб за п. 51, у якому ендofіт вибирають з групи, що складається з NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50577, NRRL 50578, NRRL 50718, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50721, NRRL 50722, NRRL 50723 та NRRL 50724 та їх комбінацій.
53. Спосіб за п. 52, у якому ендofіт є NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50578, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50722 або NRRL 50724.
54. Спосіб за п. 53, у якому ендofіт є NRRL 50576, NRRL 50578 або NRRL 50720.
55. Насіння *Secale* spp., інфіковані грибовим ендofітом виду *Neotyphodium* групи *Epichloae*, що одержаний зі штучно інфікованої рослини, яка утворює симбіотичну асоціацію між ендofітом і рослиною, де асоціація має підвищену резистентність до одного чи декількох шкідників або підвищену резистентність до принаймні однієї хвороби рослин, або обидві, у порівнянні з рослиною *Secale* spp., не інфікованою грибовим ендofітом.
56. Насіння *Secale* spp. за п. 55, у якому насіння є насінням *Secale* spp., вибраним з групи, що складається з *Secale cereale*, *Secale montanum*, *Secale strictum*, *Secale sylvestre* та *Secale vavilovii*.
57. Насіння *Secale* spp. за п. 55 або п. 56, у якому насіння є насінням *Secale cereale*.
58. Насіння *Secale* spp. за п. 55 або п. 56, у якому принаймні один грибовий ендofіт є

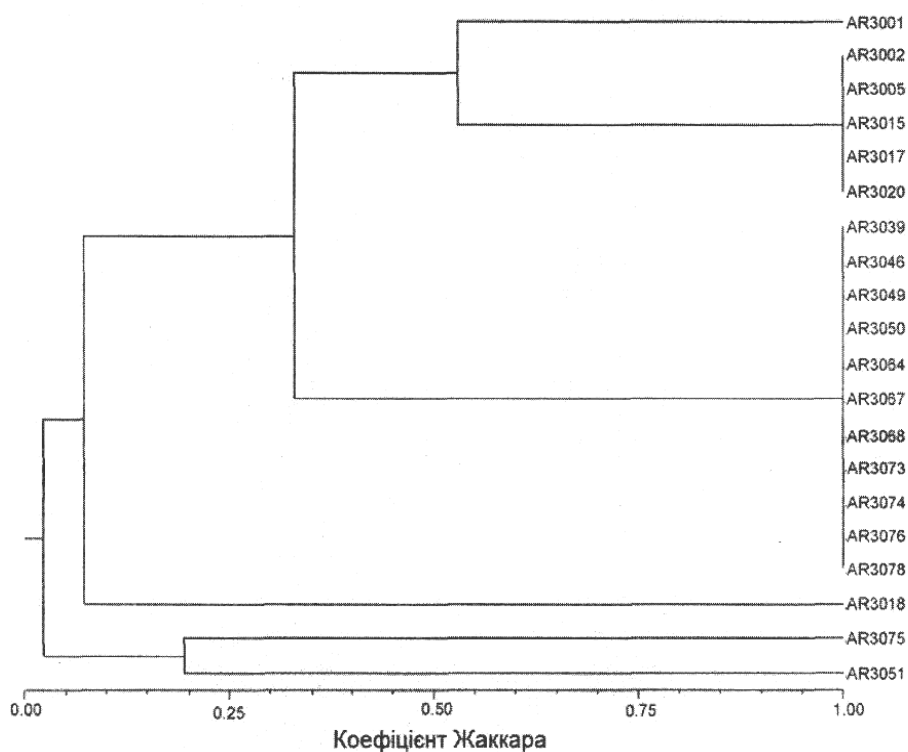
ендофітом, виділеним з *Elymus* spp.

59. Насіння *Secale* spp. за п. 55 або п. 56, у якому грибовий ендосит виділений з *Elymus mutabilis*.

5 60. Насіння *Secale* spp. за п. 59, у якому ендосит вибирають з групи, що складається з NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50577, NRRL 50578, NRRL 50718, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50721, NRRL 50722, NRRL 50723 та NRRL 50724 та їх комбінацій.

61. Насіння *Secale* spp. за п. 60, у якому ендосит є NRRL 50716, NRRL 50576, NRRL 50578, NRRL 50719, NRRL 50720, NRRL 50722 або NRRL 50724.

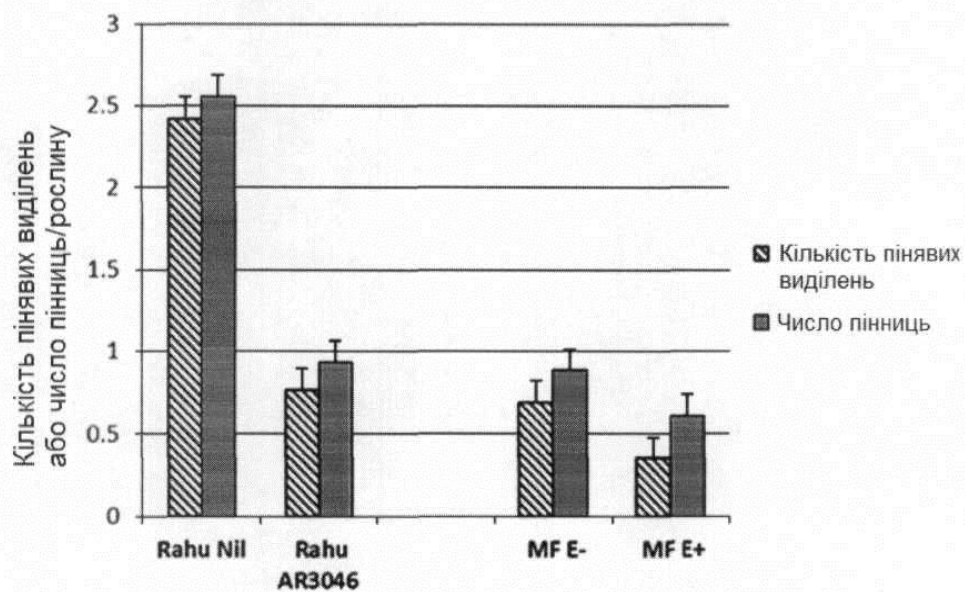
62. Насіння *Secale* spp. за п. 61, у якому ендосит є NRRL 50576, NRRL 50578 або NRRL 50720.



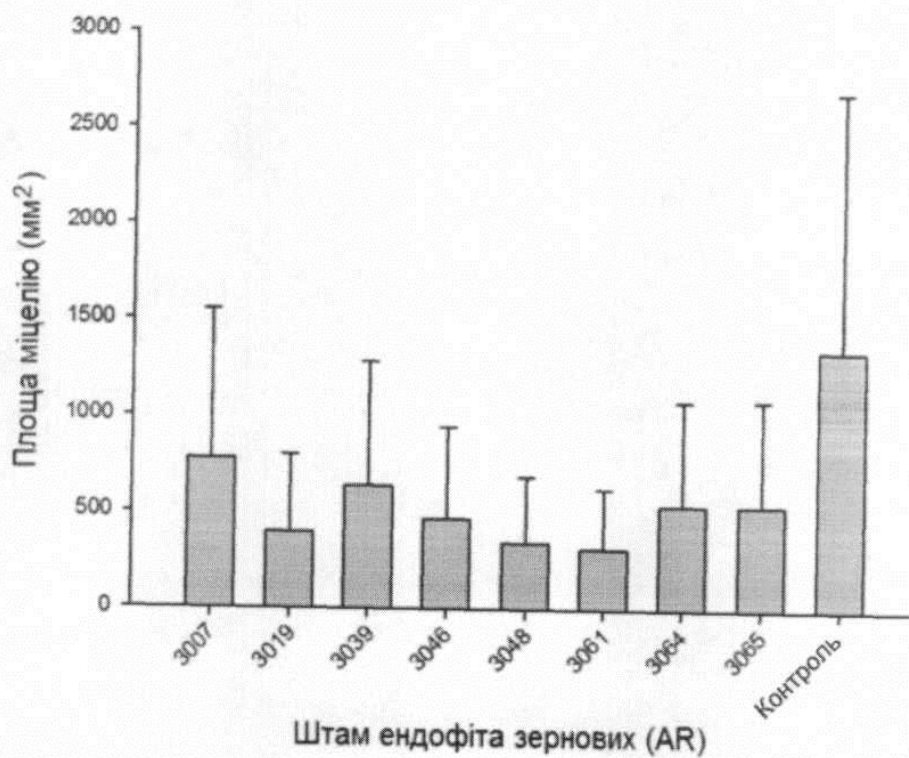
ФІГ. 1



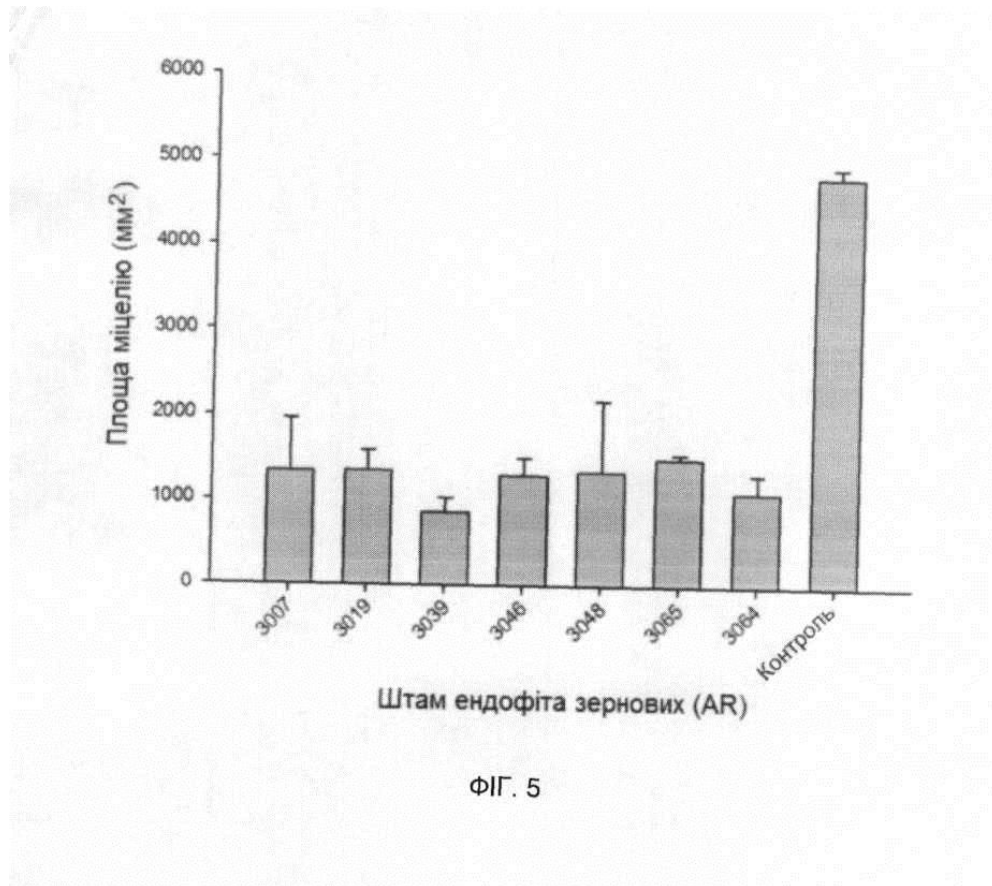
ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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

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