



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **113743**

(13) **C2**

(51) МПК

A01N 43/16 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 04367	(72) Винахідник(и):	Сміт Р. Стюарт (US), Хабіб Ахсан (US)
(22) Дата подання заявки:	24.09.2012	(73) Власник(и):	НОВОЗАЙМС БІОАГ А/С, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark (DK), НОВОЗАЙМС БАЙОЛОДЖИКАЛС, ІНК., 5400 Corporate Circle, Salem, Virginia 24153, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.03.2017	(74) Представник:	Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/538,325	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 01/26465 A1, 19.04.2001 WO 00/04778 A1, 03.02.2000 WO 2005/062899 A2, 14.07.2005 WO 2008/085958 A1, 17.07.2008 WO 2009/049747 A2, 23.04.2009
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	23.09.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.06.2014, Бюл.№ 11		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.03.2017, Бюл.№ 5		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/US2012/056885, 24.09.2012		

(54) КОМБІНАЦІЇ ЛІПОХІТООЛІГОСАХАРИДІВ І СПОСОБИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ ПРИ СТИМУЛЮВАННІ РОСТУ РОСЛИН

(57) Реферат:

Розкрито способи стимулювання росту рослин, які включають обробку насіння або рослини, що проростає з насіння, ефективною кількістю щонайменше двох ліпохітоолігосахаридів (LCO), причому при одержанні рослина характеризується щонайменше одним зі збільшеної врожайності рослини, вимірюваної в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з необробленими рослинами або рослинами, одержаними з необробленого насіння.

UA 113743 C2

[0001] Симбіоз між грамнегативними ґрунтовими бактеріями, Rhizobiaceae і Bradyrhizobiaceae, та бобовими рослинами, такими як соя, є переконливо підтвердженим документальними доказами. Біохімічна основа цих взаємозв'язків включає обмін молекулярними сигналами, де сигнальні сполуки, що передаються від рослини до бактерій, включають флавоноїди, ізофлавоноїди та флаванони, а сигнальні сполуки, що передаються від бактерій до рослини та включають кінцеві продукти експресії генів под брадиризобій та ризобій, відомі як ліпохітоолігосахариди (LCO). Симбіоз між цими бактеріями та бобовими рослинами дозволяє бобовим рослинам фіксувати атмосферний азот, необхідний для росту рослин, таким чином, усувається потреба в азотних добривах. Оскільки азотні добрива можуть зумовлювати значне збільшення вартості сільськогосподарських культур і пов'язані з рядом ефектів забруднення, у сільськогосподарській промисловості тривають спроби використання цих біологічних взаємозв'язків та розробки нових засобів та способів для поліпшення врожайності рослин без збільшення використання добрив на основі азоту.

[0002] У патенті США № 6979664 описується спосіб стимулювання проростання насіння або появи паростків рослинної культури, що включає етапи забезпечення композиції, яка містить ефективну кількість щонайменше одного ліпохітоолігосахариду та придатний з погляду сільського господарства носій, і застосування композиції в безпосередній близькості від насіння або паростка в ефективній кількості для стимулювання проростання насіння або появи паростків порівняно з необробленим насінням або паростком.

[0003] Подальший розвиток цієї ідеї описується у WO 2005/062899, спрямованому на комбінації щонайменше одного індуктора для рослин, а саме LCO, у комбінації з фунгіцидом, інсектицидом або їх комбінацією для поліпшення характеристики рослин, такої як густина стояння, ріст, потужність та/або врожайність рослин. Ці композиції та способи, як описано, застосовуються як до бобових рослин, так і до рослин, що не належать до бобових, та їх можна застосовувати для обробки насіння (безпосередньо перед посівом), паростка, кореня або рослини.

[0004] Аналогічно, у WO 2008/085958 описуються композиції для стимулювання росту рослин і підвищення врожайності культур як бобових рослин, так і рослин, що не належать до бобових, і при цьому композиції містять LCO у комбінації з іншим активним засобом, таким як хітин або хітозан, флавоноїдна сполука або гербіцид, та їх можна наносити на насіння та/або рослини одночасно або послідовно. Як і у випадку публікації '899, у публікації '958 описується обробка насіння безпосередньо перед посівом.

[0005] Останнім часом у Halford, "Smoke Signals", Chem. Eng. News (12 квітня 2010 р.), на сторінках 37-38, повідомлялося, що карикіни або бутеноліди, які містяться в димі, діють як стимулятори росту та сприяють проростанню насіння після лісової пожежі, і можуть активувати насіння, наприклад, кукурудзи, різновидів томату, латук та різновидів цибулі, яке зберігали. Ці молекули є об'єктом патенту США № 7576213.

[0006] Проте все ще існує потреба в системах для поліпшення або стимулювання росту рослин.
КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

[0007] Перший аспект даного винаходу спрямований на спосіб стимулювання росту рослин, що включає а) обробку (наприклад, нанесення на) насіння або рослини, що проростає з насіння, ефективною кількістю щонайменше двох ліпохітоолігосахаридів (LCO), де при одержанні рослина характеризується щонайменше одним зі збільшеної врожайності рослини, вимірюваної в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з необробленими рослинами або рослинами, одержаними з необробленого насіння.

[0008] Як видно з контексту, два LCO є відмінними один від одного. У деяких варіантах здійснення обробка насіння передбачає безпосереднє нанесення щонайменше двох LCO на насіння, яке потім можна висівати або зберігати протягом періоду часу до посіву. Обробка насіння також може передбачати опосередковану обробку, наприклад, шляхом введення активних засобів у ґрунт (відомого в даній галузі техніки як нанесення в борозну). В інших варіантах здійснення щонайменше два LCO можна наносити на рослину, яка проростає з насіння, наприклад, за допомогою розпилення на листя. Дані способи додатково можуть передбачати застосування інших агрономічно корисних засобів, як наприклад, поживних мікроелементів, сигнальних молекул для рослин (наприклад, ліпохітоолігосахаридів, хітинових сполук (наприклад, СО), флавоноїдів, жасмонової кислоти, лінолевої кислоти та ліноленової кислоти та їх похідних і карикінів), гербіцидів, фунгіцидів та інсектицидів, мікроорганізмів, що солюбілізують фосфати, діазотрофів (ризобіальних інокулянтів) і/або мікоризних грибів.

[0009] Способи за даним винаходом застосовуються до бобових рослин так само, як і до рослин, що не належать до бобових. У деяких варіантах здійснення насіння бобової рослини являє собою насіння сої. У деяких інших варіантах здійснення насіння, яке обробляють, являє собою насіння рослини, що не належить до бобових, таке як насіння польової культури, наприклад, зернової культури, такої як кукурудза, або насіння овочевої культури, такої як картопля.

Короткий опис графічних матеріалів

[0010] На Фіг. 1a і 2a показані хімічні структури ліпохітоолігосахаридних сполук, придатних при здійсненні даного винаходу.

[0011] На Фіг. 1b і 2b показані хімічні структури відповідних хітоолігосахаридних сполук (СО), які відповідають LCO на Фіг. 1a і 2a, і які також є придатними при здійсненні даного винаходу.

[0012] На Фіг. 3a і 4a показані хімічні структури ліпохітоолігосахаридних сполук, придатних при здійсненні даного винаходу.

[0013] На Фіг. 3b і 4b показані хімічні структури CO, що відповідають Мус, які також є придатними при здійсненні даного винаходу.

[0014] На Фіг. 5 показана хімічна структура ліпохітоолігосахариду, придатного при здійсненні даного винаходу.

5 [0015] Фіг. 6 являє собою стовпчасту діаграму, на якій проілюстрований вплив комбінацій LCO за даним винаходом, якими обробляли насіння *Macroptilium atropurpureum*, порівняно з контролем, виражений через показник довжини проростків (корінь плюс пагін у мм).

[0016] Фіг. 7 і 8 являють собою стовпчасті діаграми, на яких проілюстрований вплив комбінацій LCO за даним винаходом порівняно з окремим LCO і контролем, якими обробляли рослини *Macroptilium atropurpureum*, виражений через показник зеленості листя.

10 [0017] Фіг. 9 являє собою стовпчасту діаграму, на якій проілюстрований вплив комбінації LCO за даним винаходом порівняно з окремим LCO і контролем, якими обробляли рослини *Macroptilium atropurpureum*, виражений через показник загальної кількості квіток на обробку.

15 [0018] Фіг. 10 являє собою стовпчасту діаграму, на якій проілюстрований вплив комбінації LCO за даним винаходом порівняно з окремим LCO і контролем, якими обробляли рослини *Macroptilium atropurpureum*, виражений через показник загальної кількості плодів на обробку.

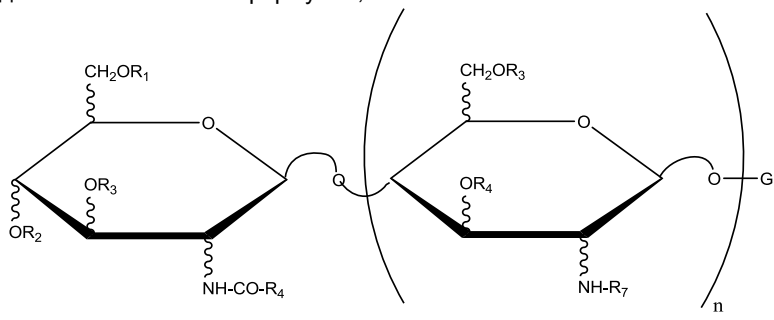
[0019] Фіг. 11 являє собою стовпчасту діаграму, на якій проілюстрований вплив комбінації LCO за даним винаходом порівняно з окремим LCO і контролем, якими обробляли рослини *Macroptilium atropurpureum*, виражений через показник середньої кількості плодів на рослину.

20 [0020] Фіг. 12 являє собою стовпчасту діаграму, на якій проілюстрований вплив комбінації LCO за даним винаходом порівняно з окремим LCO і контролем, якими обробляли рослини *Macroptilium atropurpureum*, виражений через показник загальної кількості відносно середнього врожаю (у грамах) на рослину.

25 [0021] Фіг. 13 являє собою стовпчасту діаграму, на якій проілюстрований вплив комбінації LCO за даним винаходом порівняно з окремими LCO і контролем (вода), якими обробляли насіння томату, виражений через показник середньої довжини коренів.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

[0022] Ліпохітоолігосахаридні сполуки (LCO), також відомі у даній галузі техніки як симбіотичні Nod-сигнали або Nod-фактори, складаються з олігосахаридного кістяка із залишків N-ацетил-D-глюкозаміну ("GlcNAc"), зв'язаних β -1,4-зв'язком, з N-зв'язаним ланцюгом жирного ацилу, конденсованим на невідновлювальному кінці. LCO відрізняються за числом залишків GlcNAc у кістяку, за довжиною та ступенем насиченості ланцюга жирного ацилу та за заміщенням відновлювальних та невідновлювальних цукрових залишків. Див., наприклад, Denarie, et al., Ann. Rev. Biochem. 65:503-35 (1996), Hamel, et al., Planta 232:787-806 (2010) (наприклад, Фіг. 1 у цьому документі, на якій показані структури хітину, хітозану, CO і відповідних Nod-факторів (LCO)); Prome, et al., Pure & Appl. Chem. 70(1):55-60 (1998). Приклад LCO представлений нижче як формула I,



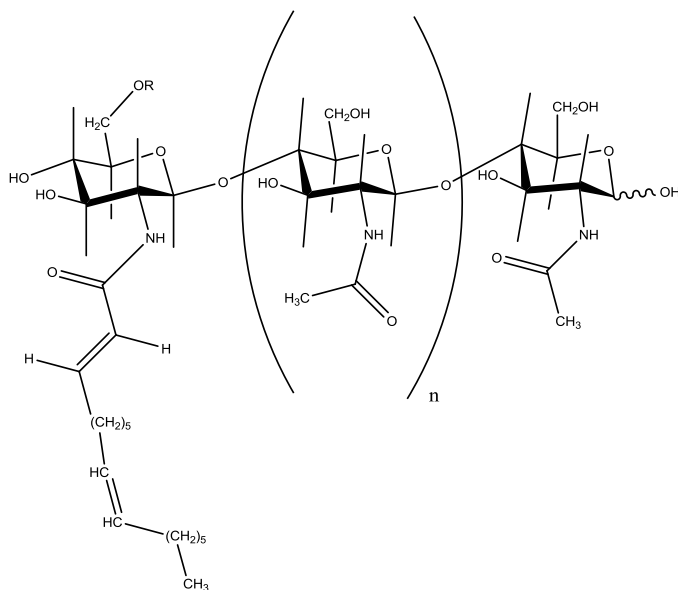
де

40 G являє собою гексозамін, який може бути заміщений, наприклад, ацетильною групою за азотом, сульфатною групою, ацетильною групою та/або ефірною групою за киснем,

R₁, R₂, R₃, R₅, R₆ і R₇, які можуть бути ідентичними або різними, являють собою H, CH₃CO-, C_xH_yCO-, де x являє собою ціле число від 0 до 17, а y являє собою ціле число від 1 до 35, або будь-яку іншу ацильну групу, таку як, наприклад, карбамоїл,

45 R₄ являє собою аліфатичний ланцюг з одним, двома або трьома ненасиченими зв'язками, який містить щонайменше 12 атомів вуглецю, а n являє собою ціле число від 1 до 4.

[0023] LCO можна одержувати (наприклад, виділяти та/або очищувати) з бактерій, таких як ризобії, наприклад, *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp. та *Azorhizobium* sp. Структури LCO є характерними для кожного такого виду бактерій, і кожний штам може продукувати декілька LCO з різними структурами. Наприклад, конкретні LCO з *S. meliloti* також були описані в патенті США № 5549718, причому вони мають формулу II,



де R являє собою H або $\text{CH}_3\text{CO}-$, а n дорівнює 2 або 3.

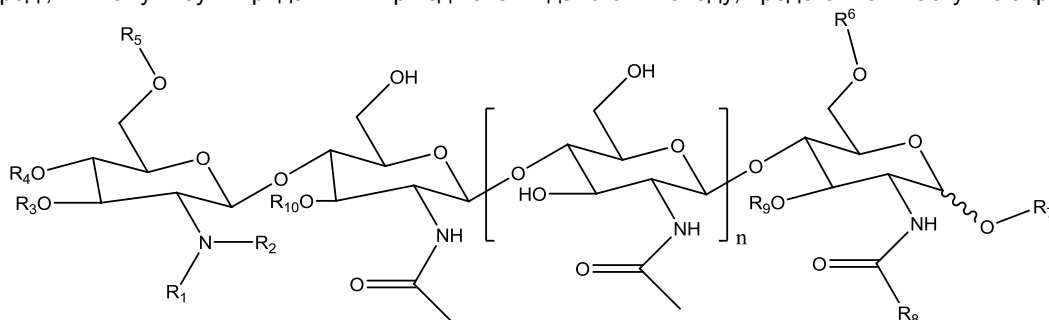
[0024] Ще більш конкретні LCO включають NodRM, NodRM-1, NodRM-3. Під час ацетилювання ($\text{R}=\text{CH}_3\text{CO}-$) вони перетворюються на AcNodRM-1 і AcNodRM-3, відповідно (патент США № 5545718).

[0025] LCO з *Bradyrhizobium japonicum* описані у патентах США №№ 5175149 і 5321011. Загалом, вони являють собою пентасахаридні фітогормони, що містять метилфукозу. Описана низка цих LCO, одержаних з *B. japonicum*: BjNod-V ($\text{C}_{18:1}$); BjNod-V (Ac , $\text{C}_{18:1}$), BjNod-V ($\text{C}_{16:1}$) і BjNod-V (Ac , $\text{C}_{16:0}$), при цьому "V" позначає наявність п'яти N-ацетилглюкозамінів; "Ac" - ацетилювання; число після "C" позначає число атомів вуглецю у бічному ланцюзі жирної кислоти; і число після ":" - число подвійних зв'язків.

[0026] LCO, що застосовуються у варіантах здійснення даного винаходу, можна одержувати (тобто виділяти та/або очищувати) зі штамів бактерій, які продукують LCO, таких як штами *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (у тому числі *B. japonicum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium* (у тому числі *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (у тому числі *S. meliloti*), і штамів бактерій, сконструйованих за допомогою генної інженерії так, що вони продукують LCO. Комбінації двох або більше LCO, одержаних із цих мікроорганізмів, що належать до ризобій та брадиризобій, включені в обсяг даного винаходу.

[0027] LCO є головними визначними чинниками для специфічності щодо хазяїна у симбіозі з бобовими рослинами (Diaz, et al., Mol. Plant-Microbe Interactions 13:268--276 (2000)). Таким чином, у межах родини бобових у певних родів і видів ризобій виникають симбіотичні взаємозв'язки, пов'язані з фіксацією азоту, з певним хазяїном, що належить до бобових рослин. Ці комбінації рослина-хазяїн/бактерії описані в Hungria, et al., Soil Biol. Biochem. 29:819-830 (1997), при цьому приклади цих симбіотичних партнерських відносин бактерія/бобова рослина включають *S. meliloti*/люцерна та буркун білий; *R. leguminosarum* біовар *viciae*/різновиди гороху та різновиди сочевиці; *R. leguminosarum* біовар *phaseoli*/різновиди квасолі; *Bradyrhizobium japonicum*/різновиди сої та *R. leguminosarum* біовар *trifolii*/червона конюшина. Hungria також перераховує ефективні флавоноїдні індуктори генів Nod з видів ризобій і структури конкретних LCO, які продукують різні види ризобій. Проте, специфічність LCO необхідна тільки для забезпечення утворення бульбочок у бобових рослин. У здійсненні даного винаходу застосування даного LCO не обмежується обробкою насіння його симбіотичного партнера, що належить до бобових рослин, для досягнення збільшеної врожайності рослин, що вирощується в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з рослинами, одержаними з необробленого насіння, або порівняно з рослинами, одержаними з насіння, обробленого сигнальною молекулою безпосередньо перед посівом або в межах тижня до посіву або менше.

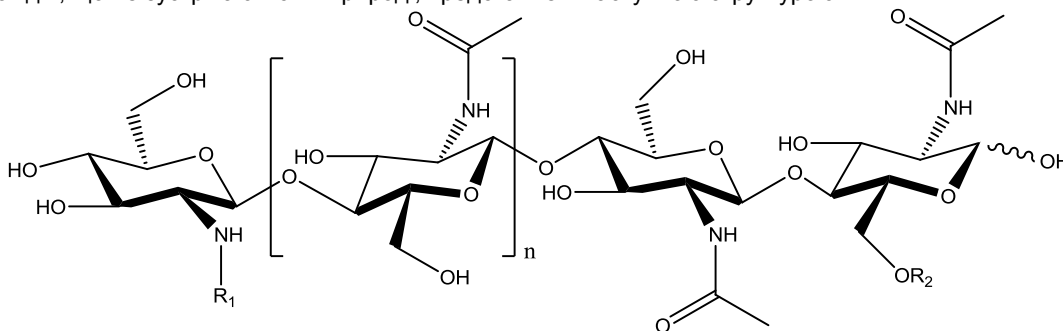
[0028] Таким чином, у якості додаткових прикладів, LCO і їх похідні, що не зустрічаються в природі, які можуть бути придатними при здійсненні даного винаходу, представлені наступною формулою:



де R_1 являє собою C14:0, 3ОН-C14:0, ізо-C15:0, C16:0, 3-ОН-C16:0, ізо-C15:0, C16:1, C16:2, C16:3, ізо-C17:0, ізо-C17:1, C18:0, 3ОН-C18:0, C18:0/3-ОН, C18:1, ОН-C18:1, C18:2, C18:3, C18:4, C19:1, карбамоїл, C20:0, C20:1, 3-ОН-C20:1, C20:1/3-ОН, C20:2, C20:3, C22:1 і C18-26(ω-1)-ОН (що згідно із D'Haese, et al., Glycobiology 12:79R-105R (2002), включає C18, C20, C22, C24 і C26 гідроксильовані групи та C16:1Δ9, C16:2 (Δ2,9) і C16:3 (Δ2,4,9)); R_2 являє собою водень або метил; R_3 являє собою водень, ацетил або карбамоїл; R_4 являє собою водень, ацетил або карбамоїл; R_5 являє собою водень, ацетил або карбамоїл; R_6 являє собою водень, арабінозил, фукозил, ацетил, естер сірчаної кислоти, 3-О-S-2-О-MeFuc, 2-О-MeFuc і 4-О-AcFuc; R_7 являє собою водень, манозил або гліцерин; R_8 являє собою водень, метил або $-CH_2OH$; R_9 являє собою водень, арабінозил або фукозил; R_{10} являє собою водень, ацетил або фукозил; і n дорівнює 0, 1, 2 або 3. Структури ризобіальних LCO, що зустрічаються в природі, які охоплені цією структурою, описані в D'Haese, et al., вище.

[0029] У якості додаткових прикладів, LCO, одержаний з *B. japonicum*, проілюстрований на Фіг. 1a, можна застосовувати для обробки насіння бобової рослини, що відрізняється від сої, та насіння рослини, що не належить до бобових, наприклад, кукурудзи. Як інший приклад, LCO для гороху, який одержують із *R. leguminosarum*, проілюстрований на Фіг. 2a (позначений LCO-V (C_{18:1}), SP104), можна застосовувати для обробки насіння бобової рослини, що відрізняється від гороху, а також рослин, що не належать до бобових. Таким чином, у деяких варіантах здійснення комбінацію двох LCO, проілюстрованих на Фіг. 1a і 2a, застосовують у способах за даним винаходом.

[0030] Даний винахід також охоплює застосування LCO, одержаних (тобто виділених і/або очищених) із мікоризних грибів, таких як гриби з групи Glomeromycota, наприклад, *Glomus intraradicus*. Структури типових LCO, одержаних із цих грибів, описані в WO 2010/049751 і WO 2010/049751 (LCO, описані в цих документах, також мають назву "Мус-факторів"). Типові LCO, одержані з мікоризних грибів, і їх похідні, що не зустрічаються в природі, представлені наступною структурою:



де $n = 1$ або 2 ; R_1 являє собою C16, C16:0, C16:1, C16:2, C18:0, C18:1Δ9Z або C18:1Δ11Z; і R_2 являє собою водень або SO_3H . У деяких варіантах здійснення мікоризні гриби продукують LCO, які проілюстровані на Фіг. 3a і 4a. У деяких варіантах здійснення ці LCO застосовують у способах за даним винаходом.

[0031] У деяких інших варіантах здійснення один із двох LCO, застосовуваних у способах за даним винаходом, одержаний із *S. melliloti* і проілюстрований на Фіг. 5. Таким чином, у деяких варіантах здійснення даного винаходу LCO включають щонайменше два з LCO, проілюстрованих на Фіг. 1a, 2a, 3a, 4a і 5. В цілому, даний винахід передбачає застосування будь-яких двох або більше LCO, у тому числі їх похідних, що зустрічаються в природі (наприклад, ризобіальних, брадиризобіальних і грибних), рекомбінантних, синтетичних похідних та похідних, що не зустрічаються в природі. У деяких варіантах здійснення обидва з щонайменше двох LCO є рекомбінантними.

[0032] Даний винахід додатково охоплює застосування синтетичних LCO сполук, наприклад, тих, які описані у WO 2005/063784, і рекомбінантних LCO, одержаних за допомогою генної інженерії. Базова структура LCO, які зустрічаються в природі, може містити модифікації або заміщення, що виявляються в LCO, які зустрічаються в природі, наприклад, тих, які описані в Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54:257-288 (2000); і D'Haese, вище. Олігосахаридні молекули-попередники (CO, які описані нижче, також є придатними як сигнальні молекули для рослин за даним винаходом), для конструювання LCO також можуть бути синтезовані організмами, сконструйованими за допомогою генної інженерії, наприклад, як описано в Samain, et al., Carbohydrate Res. 302:35-42 (1997); Cottaz, et al., Meth. Eng. 7(4):311-7 (2005); і Samain, et al., J. Biotechnol. & Biotechnol. 72:33-47 (1999) (наприклад, Фіг. 1 у цьому документі, на якій показані структури CO, які можна одержувати за допомогою технології рекомбінантної ДНК із *E. coli*, що містять різні комбінації генів подBCHL). Таким чином, у деяких варіантах здійснення комбінації щонайменше двох LCO включають комбінації LCO, вибраних з LCO, проілюстрованих на Фіг. 1a, 2a, 3a, 4a і 5.

[0033] LCO можна використовувати у різних формах чистоти та можна застосовувати окремо або у формі культури бактерій або грибів, що продукують LCO. Наприклад, OPTIMIZE® (комерційно доступний від Novozymes BioAg Limited) містить культуру *B. japonicum*, яка продукує LCO (LCO-V (C_{18:1}, MeFuc), MOR116), проілюстрований на Фіг. 1a. Способи для забезпечення фактично чистих LCO включають лише видалення мікробних клітин із суміші LCO та мікроба або продовження виділення та очищення молекул LCO за допомогою розділення фаз LCO-розчинник із наступною ВЕРХ-хроматографією, як описано, наприклад, у патенті США № 5549718. Очищення можна поліпшити за допомогою повторної ВЕРХ, і очищені молекули LCO можна ліофілізувати для довготермінового зберігання. Хітоолігосахариди (CO), описані вище, можна використовувати як вихідні матеріали для

одержання синтетичних LCO. Для цілей даного винаходу рекомбінантні LCO, що підходять для застосування за даним винаходом, є щонайменше на 60% чистими, наприклад, щонайменше на 60% чистими, щонайменше на 65% чистими, щонайменше на 70% чистими, щонайменше на 75% чистими, щонайменше на 80% чистими, щонайменше на 85% чистими, щонайменше на 90% чистими, щонайменше на 91% чистими, щонайменше на 92% чистими, щонайменше на 93% чистими, щонайменше на 94% чистими, щонайменше на 95% чистими, щонайменше на 96% чистими, щонайменше на 97% чистими, щонайменше на 98% чистими, щонайменше на 99% чистими, аж до 100% чистоти.

[0034] Насіння можна обробляти щонайменше двома LCO у декілька способів, наприклад, за допомогою розпилення або розбризкування. Обробку за допомогою розпилення та розбризкування можна проводити шляхом складання ефективної кількості щонайменше двох LCO у сільськогосподарськи прийнятному носії, звичайно водному за своєю природою, і розпилення або розбризкування композиції на насіння за допомогою системи для безперервної обробки (відрегульованої для застосування обробки із заздалегідь заданою нормою пропорційно до постійного розходу насіння), наприклад, обладнання для обробки барабанного типу. У цих способах переважно використовують порівняно невеликі об'єми носія для того, щоб забезпечити порівняно швидке висушування обробленого насіння. У такий спосіб можна ефективно обробляти більші обсяги насіння. Також можна використовувати системи для роботи з партіями, у яких попередньо визначений розмір партії насіння і композицій на основі сигнальної молекули доставляють у мішалку. Системи та установки для здійснення цих способів є комерційно доступними від численних постачальників, наприклад, Bayer CropScience (Gustafson).

[0035] В іншому варіанті здійснення обробка передбачає покриття насіння щонайменше двома LCO. Один такий спосіб включає покривання внутрішньої стінки сферичного контейнера композицією, додавання насіння, потім обертання контейнера для приведення насіння у контакт зі стінкою та композицією, при цьому спосіб відомий у даній галузі техніки як "нанесення покриття за допомогою контейнера". На насіння можна наносити покриття за допомогою комбінацій способів нанесення покриття. Просочування звичайно передбачає застосування водного розчину, що містить засіб, який стимулює ріст рослин. Наприклад, насіння можна просочувати протягом періоду від приблизно 1 хвилини до приблизно 24 годин (наприклад, протягом щонайменше 1 хв., 5 хв., 10 хв., 20 хв., 40 хв., 80 хв., 3 год., 6 год., 12 год., 24 год.). Деякі типи насіння (наприклад, насіння сої) виявляють чутливість до вологості. Таким чином, просочування такого насіння протягом тривалого періоду часу може бути небажаним, у цьому випадку просочування звичайно здійснюють протягом від приблизно 1 хвилини до приблизно 20 хвилин.

[0036] У тих варіантах здійснення, які передбачають зберігання насіння після нанесення щонайменше двох LCO, прилипання LCO до насіння протягом будь-якого періоду часу, що перевищує період зберігання, не є вирішальним. Не бажаючи обмежуватися будь-якою конкретною теорією дій, заявники припускають, що навіть у тих випадках, коли обробка може не викликати те, що сигнальна молекула для рослин залишається в контакті з поверхнею насіння після обробки та під час будь-якого періоду зберігання, LCO може забезпечувати досягнення передбачуваного ефекту внаслідок явища, відомого як пам'ять насіння або сприйняття насіння. Див., Macchiavelli, et al., J. Exp. Bot. 55(408):1635-40 (2004). Заявники також припускають, що після обробки LCO дифундують в напрямку до молодого зародкового кореня, що розвивається, і активує гени, пов'язані із симбіозом і розвитком, що зумовлює зміну будови коренів рослини. Проте, у випадках, коли це бажано, композиції, що містять LCO, можуть додатково містити клейкий або покривний засіб. З естетичною метою композиції можуть додатково містити покривний полімер та/або барвник.

[0037] У деяких варіантах здійснення щонайменше два LCO наносять на насіння (безпосередньо або опосередковано) або рослину в одній і тій же композиції (тобто вони складені разом). В інших варіантах здійснення їх складають окремо, при цьому обидві композиції на основі LCO наносять на насіння або рослину, або в деяких варіантах здійснення один з LCO наносять на насіння, а інший наносять на рослину.

[0038] Загальна кількість щонайменше двох LCO є ефективною для стимулювання росту, так що при одержанні рослина характеризується щонайменше одним зі збільшеної врожайності рослини, вимірюваної в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з необробленими рослинами або рослинами, одержаними з необробленого насіння (не обробленого жодним з активних засобів). Ефективна кількість щонайменше двох LCO, використовуваних для обробки насіння, яка виражена в одиницях концентрації, як правило, знаходиться в діапазоні від приблизно 10^{-5} до приблизно 10^{-14} M (молярна концентрація), і в деяких варіантах здійснення від приблизно 10^{-5} до приблизно 10^{-11} M, і в деяких інших варіантах здійснення від приблизно 10^{-7} до приблизно 10^{-8} M. Ефективна кількість, виражена в одиницях маси, як правило, знаходиться в діапазоні від приблизно 1 до приблизно 400 мкг/хандредвейт (cwt) насіння, і в деяких варіантах здійснення від приблизно 2 до приблизно 70 мкг/cwt, і в деяких інших варіантах здійснення від приблизно 2,5 до приблизно 3,0 мкг/cwt насіння.

[0039] Для цілей опосередкованої обробки насіння, тобто обробки в борозні, ефективна кількість щонайменше двох LCO, як правило, знаходиться в діапазоні від 1 мкг/акр до приблизно 70 мкг/акр і в деяких варіантах здійснення від приблизно 50 мкг/акр до приблизно 60 мкг/акр. Для цілей нанесення на рослину ефективна кількість LCO, як правило, знаходиться в діапазоні від 1 мкг/акр до приблизно 30 мкг/акр і в деяких варіантах здійснення від приблизно 11 мкг/акр до приблизно 20 мкг/акр.

[0040] Насіння можна обробляти щонайменше двома LCO безпосередньо перед або під час посіву. Обробка під час посіву може передбачати безпосереднє нанесення на насіння, як описано вище, або в деяких інших варіантах здійснення застосування шляхом введення активних засобів у ґрунт, відоме

в даній галузі техніки як обробка в борозні. У тих варіантах здійснення, які передбачають обробку насіння з наступним зберіганням, насіння потім можна пакувати, наприклад, у мішки на 50 фунтів або 100 фунтів, або мішки для сипких матеріалів, або контейнери відповідно до стандартних методик. Насіння можна зберігати протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 місяців і навіть довше, наприклад, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 місяців або навіть довше у відповідних умовах зберігання, відомих у даній галузі техніки. У той час як насіння сої може підлягати посіву в наступний сезон, насіння кукурудзи можна зберігати протягом набагато триваліших періодів часу, у тому числі понад 3 роки.

Інші агрономічно корисні засоби

[0041] Даний винахід додатково може передбачати обробку насіння або рослин, які проростають із насіння, корисним з погляду сільського господарства/агрономічно корисним засобом. Використовуваний у даному документі та у даній галузі техніки вираз "корисний з погляду сільського господарства або агрономічно корисний" стосується засобів, які у випадку застосування до насіння або рослин зумовлюють стимулювання (яке може бути статистично значущим) характеристик рослин, таких як густина стояння, ріст (наприклад, як визначено щодо LCO) або потужність, порівняно з необробленим насінням або рослинами. Ці засоби можна складати разом із щонайменше двома LCO або наносити на насіння або рослину в окремому складі. Типові приклади цих засобів, які можуть бути придатними при здійсненні даного винаходу, включають поживні мікроелементи (наприклад, вітаміни та слідові елементи), сигнальні молекули для рослин (відмінні від LCO), гербіциди, фунгіциди й інсектициди, мікроорганізми, що солубілізують фосфати, діазотрофи (ризобіальні інокулянти) і/або мікоризні гриби.

Поживні мікроелементи

[0042] Типові вітаміни, які можуть бути придатними при здійсненні даного винаходу, включають пантотенат кальцію, фолієву кислоту, біотин і вітамін С. Типові приклади слідових елементів, які можуть бути придатними при здійсненні даного винаходу, включають бор, хлор, марганець, залізо, цинк, мідь, молибден, нікель, селен і натрій.

[0043] Кількість щонайменше одного поживного мікроелемента, використовуваного для обробки насіння, яка виражена в одиницях концентрації, як правило, знаходиться в діапазоні від 10 частин на мільйон до 100 частин на мільйон і в деяких варіантах здійснення від приблизно 2 частин на мільйон до приблизно 100 частин на мільйон. В одному варіанті здійснення ефективна кількість, виражена в одиницях маси, як правило, знаходиться в діапазоні від приблизно 180 мкг до приблизно 9 мг/хандредвейт (cwt) насіння і в деяких варіантах здійснення від приблизно 4 мкг до приблизно 200 мкг/рослина при нанесенні на листя. Інакше кажучи, для цілей обробки насіння ефективна кількість щонайменше одного поживного мікроелемента, як правило, перебуває в діапазоні від 30 мкг/акр до приблизно 1,5 мг/акр і в деяких варіантах здійснення від приблизно 120 мкг/акр до приблизно 6 г/акр при позакореновому внесенні.

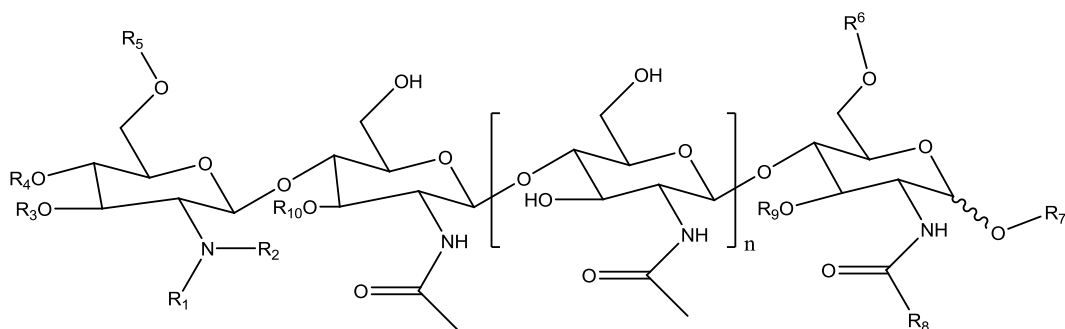
Сигнальні молекули для рослин

[0044] Даний винахід також може передбачати обробку насіння або рослини сигнальною молекулою для рослин, що відрізняється від LCO. Для цілей даного винаходу вираз "сигнальна молекула для рослин", який можна використовувати взаємозамінно із "засобом, що стимулює ріст рослин", в цілому, стосується будь-якого засобу, як того, що зустрічається в природі у рослин або мікробів, так і синтетичного (який може бути таким, що не зустрічається в природі), який безпосередньо або опосередковано активує біохімічний шлях рослин, що зумовлює збільшений ріст рослин, вимірюваний щонайменше в показниках щонайменше одного зі збільшеної врожайності, що вимірюється в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з необробленими рослинами або рослинами, одержаними з необробленого насіння. Типові приклади сигнальних молекул для рослин, які можуть бути придатними при здійсненні даного винаходу, включають хітинові сполуки, флавоноїди, жасмонову кислоту, лінолеву кислоту та ліноленову кислоту та їх похідні (вище), а також карикіни.

Хітоолігосахариди

[0045] СО відомі в даній галузі техніки як структури на основі N-ацетилглюкозамінів, зв'язаних β-1,4-зв'язками, визначені як олігомери хітину, а також як N-ацетилхітоолігосахариди. СО мають унікальні та різні фрагменти бічного ланцюга, які відрізняють їх від молекул хітину [(C₈H₁₃NO₅)_n, № згідно із CAS 1398-61-4], і молекул хітозану [(C₅H₁₁NO₄)_n, № згідно із CAS 9012-76-4]. СО за даним винаходом також є відносно водорозчинними порівняно із хітином і хітозаном, і в деяких варіантах здійснення, описаних нижче в даному документі, вони є пентамерними. Типова література, у якій описана структура та одержання СО, які можуть бути підходящими для застосування згідно із даним винаходом, являє собою наступне: Muller, et al., Plant Physiol. 124:733-9 (2000); Van der Holst, et al., Current Opinion in Structural Biology, 11:608--616 (2001) (наприклад, Фіг. 1 в цьому документі); Robina, et al., Tetrahedron 58:521--530 (2002); D'Haese, et al., Glycobiol. 12(6):79R-105R (2002); Hamel, et al., Planta 232:787--806 (2010) (наприклад, Фіг. 1, на якій показані структури хітину, хітозану, СО та відповідних Nod-факторів (LCO)); Rouge, et al. Глава 27, "Молекулярна імунологія складних вуглеводів" ("The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates") в Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science; Wan, et al., Plant Cell 21:1053-69 (2009); патентний документ PCT/F100/00803 (9/21/2000); і Demont-Caulet, et al., Plant Physiol. 120(1):83--92 (1999).

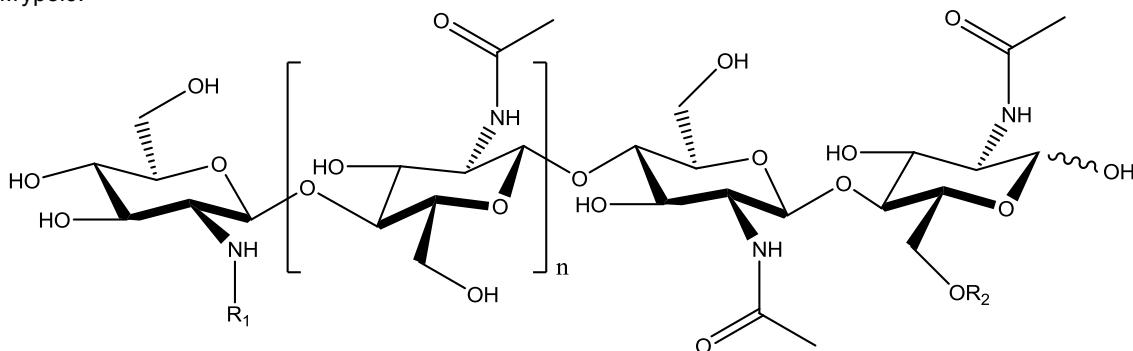
[0046] У тому, що стосується структури, СО відрізняються від LCO, головним чином, тим, що вони не містять бічний ланцюг жирної кислоти. СО, одержані з ризобій, та їх синтетичні похідні, що не зустрічаються в природі, які можуть бути придатними при здійсненні даного винаходу, можуть бути представлені наступною формулою:



[0047] де кожний з R_1 та R_2 незалежно являє собою водень або метил; R_3 являє собою водень, ацетил або карбамоїл; R_4 являє собою водень, ацетил або карбамоїл; R_5 являє собою водень, ацетил або карбамоїл; R_6 являє собою водень, арабінозил, фукозил, ацетил, естер сірчаної кислоти, 3-O-S-2-O-MeFuc, 2-O-MeFuc і 4-O-AcFuc; R_7 являє собою водень, манозил або гліцерин; R_8 являє собою водень, метил або CH_2OH ; R_9 являє собою водень, арабінозил або фукозил; R_{10} являє собою водень, ацетил або фукозил; та n дорівнює 0, 1, 2 або 3. Структури відповідних ризобіальних LCO описані в D'Haese, et al., вище.

[0048] Два CO, придатних для застосування згідно із даним винаходом, проілюстровані на Фіг. 1b і 2b. Вони відповідають LCO, які продукують *Bradyrhizobium japonicum* і *R. leguminosarum* біовар *visciae*, відповідно, які вступають у симбіотичну взаємодію із соєю та горохом, відповідно, але не містять ланцюги жирної кислоти.

[0049] Структури інших CO, які можуть бути придатними для застосування згідно із даним винаходом, можна легко одержувати з LCO, одержаних (тобто виділених і/або очищених) з мікоризних грибів, таких як гриби із групи *Glomeromycota*, наприклад, *Glomus intraradices*. Див., наприклад, патентний документ WO 2010/049751 та Mailet, et al., Nature 469:58-63 (2011) (LCO, описані у цих документах, також називаються "Мус-факторами"). Типові CO, одержані з мікоризних грибів, представлені наступною структурою:



де $n = 1$ або 2 ; R_1 являє собою водень або метил; та R_2 являє собою водень або SO_3H . Два інших CO, придатних для застосування згідно із даним винаходом, один з яких є сульфатованим, а інший не є сульфатованим, проілюстровані на Фіг. 3b і 4b, відповідно. Вони відповідають вищезгаданим двом різним LCO, що продукуються мікоризними грибами *Glomus intraradices*, які проілюстровані на Фіг. 3a і 4a.

[0050] CO можуть бути синтетичними або рекомбінантними. Способи одержання синтетичних CO описані, наприклад, в Robina, вище. Способи одержання рекомбінантних CO, наприклад, із використанням *E. coli* у якості хазяїна, відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Dumon, et al., ChemBioChem 7:359-65 (2006), Samain, et al., Carbohydrate Res. 302:35-42 (1997); Cottaz, et al., Meth. Eng. 7(4):311-7 (2005); і Samain, et al., J. Biotechnol. & Biotechnol. 72:33-47 (1999) (наприклад, Фіг. 1 у цьому документі, на якій показані структури CO, які можна одержувати за допомогою технології рекомбінантної ДНК з *E. coli*, що містять різні комбінації генів *podBCHL*). Для цілей даного винаходу рекомбінантні CO, придатні для застосування за даним винаходом, є щонайменше на 60% чистими, наприклад, щонайменше на 60% чистими, щонайменше на 65% чистими, щонайменше на 70% чистими, щонайменше на 75% чистими, щонайменше на 80% чистими, щонайменше на 85% чистими, щонайменше на 90% чистими, щонайменше на 91% чистими, щонайменше на 92% чистими, щонайменше на 93% чистими, щонайменше на 94% чистими, щонайменше на 95% чистими, щонайменше на 96% чистими, щонайменше на 97% чистими, щонайменше на 98% чистими, щонайменше на 99% чистими, аж до 100% чистоти.

[0051] Інші хітинові сполуки, які включають хітини та хітозани, що є основними компонентами клітинних стінок грибів і екзоскелетів комах і ракоподібних, також складаються із залишків GlcNAc. Хітинові сполуки включають хітин (IUPAC: N-[5-[[3-ацетиламіно-4,6-дигідрокси-6-(гідроксиметил)оксан-2-іл]метоксиметил]-2-[[5-ацетиламіно-4,6-дигідрокси-2-(гідроксиметил)оксан-3-іл]метоксиметил]-4-гідрокси-6-(гідроксиметил)оксан-3-іл]етанамід) і хітозан (IUPAC: 5-аміно-6-[5-аміно-6-[5-аміно-4,6-дигідрокси-2-(гідроксиметил)оксан-3-іл]окси-4-гідрокси-2-(гідроксиметил)оксан-3-іл]окси-2-(гідроксиметил)оксан-3,4-діол). Ці сполуки можна одержувати комерційно, наприклад, від Sigma-Aldrich, або одержувати з комах, панцирів ракоподібних або клітинних стінок грибів. Способи одержання хітину та хітозану відомі в даній галузі техніки та були описані, наприклад, у патенті США № 4536207 (одержання з панцирів ракоподібних),

Pochanavanich, et al., Lett. Appl. Microbiol. 35:17-21 (2002) (одержання з грибних клітинних стінок) і патенті США № 5965545 (одержання з панцирів крабів і гідроліз комерційного хітозану). Також див. Jung, et al., Carbohydrate Polymers 67:256-59 (2007); Khan, et al., Photosynthetica 40(4):621-4 (2002). Можна одержувати деацетилювані хітини та хітозани, ступінь деацетилювання яких варіює від менше 35% до більше 90%, і при цьому охоплюється широкий спектр молекулярних мас, наприклад, олігомери хітозану з низькою молекулярною масою менше 15 кДа та олігомери хітину 0,5-2 кДа; хітозан "практичного ступеня чистоти" з молекулярною масою приблизно 15 кДа та хітозан з високою молекулярною масою до 70 кДа. Композиції на основі хітину та хітозану, складені для обробки насіння, також є комерційно доступними. Комерційні продукти включають, наприклад, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) і BEYOND™ (Agrihouse, Inc.).

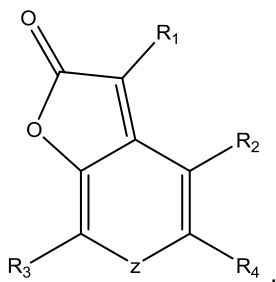
[0052] Флавоноїди являють собою фенольні сполуки, що мають загальну структуру з двох ароматичних кілець, з'єднаних тривуглецевим містком. Флавоноїди продукуються рослинами та мають багато функцій, наприклад, як корисні сигнальні молекули і як засоби захисту від комах, тварин, грибів і бактерій. Класи флавоноїдів включають халкони, антоціанідини, кумарини, флаволи, флаванолі, флавонолі, флаванони та ізофлаволи. Див. Jain, et al., J. Plant Biochem. & Biotechnol. 11:1-10 (2002); Shaw, et al., Environmental Microbiol. 11:1867-80 (2006).

[0053] Типові флавоноїди, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають геністеїн, даїдзеїн, формононетин, нарингенін, гесперетин, лютеолін та апігенін. Флавоноїдні сполуки є комерційно доступними, наприклад, від Natland International Corp., Research Triangle Park, Північна Кароліна; MP Biomedicals, Ірвайн, Каліфорнія; LC Laboratories, Вобурн, Массачусетс. Флавоноїдні сполуки можна виділяти з рослин або насіння, наприклад, як описано в патентах США №№ 5702752; 5990291 і 6146668. Флавоноїдні сполуки також можуть продукувати організми, сконструйовані за допомогою генної інженерії, наприклад, дріжджі, як описано в Ralston, et al., Plant Physiology 137:1375-88 (2005).

[0054] Жасмонову кислоту (JA, [1R-[1 α ,2 β (Z)]]-3-оксо-2-(пентеніл)циклопентаноцтову кислоту) та її похідні (які включають лінолеву кислоту та ліноленову кислоту (які описані вище у зв'язку з жирними кислотами і їх похідними) можна використовувати при здійсненні даного винаходу. Жасмонова кислота та її метиловий естер, метилжасмонат (MeJA), разом відомі як жасмонати, являють собою октадеканойдні сполуки, які зустрічаються в природі у рослин. Жасмонову кислоту продукують корені паростків пшениці та грибіні мікроорганізми, наприклад, Botryodiplodia theobromae і Gibberella fujikuroi, дріжджі (Saccharomyces cerevisiae) та патогенні і непатогенні штами Escherichia coli. Лінолева кислота та ліноленова кислота утворюються в ході біосинтезу жасмонової кислоти. Як повідомляється, подібно до лінолевої кислоти та ліноленової кислоти жасмонати (та їх похідні) є індукторами експресії гена nod або утворення LCO ризобактеріями. Див., наприклад, Mabood, Fazli, Jasmonates induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum, May 17, 2001.

[0055] Придатні похідні жасмонової кислоти, лінолевої кислоти та ліноленової кислоти, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають естери, аміді, глікозиди та солі. Типові естери являють собою сполуки, у яких карбоксильна група жасмонової кислоти, лінолевої кислоти та ліноленової кислоти була замінена на групу -COR, де R являє собою групу -OR¹, у якій R¹ являє собою алкільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C₁-C₈алкільну групу, наприклад, метильну, етильну або пропільну групу; алкенільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C₂-C₈алкенільну групу; алкінільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C₂-C₈алкінільну групу; арильну групу, що має, наприклад, 6-10 атомів вуглецю; або гетероарильну групу, що має, наприклад, 4-9 атомів вуглецю, де гетероатоми в гетероарильній групі можуть являти собою, наприклад, N, O, P або S. Типові аміді являють собою сполуки, у яких карбоксильна група жасмонової кислоти, лінолевої кислоти та ліноленової кислоти була замінена на групу -COR, де R являє собою групу NR²R³, у якій R² та R³ незалежно являють собою водень, алкільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C₁-C₈алкільну групу, наприклад, метильну, етильну або пропільну групу; алкенільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C₂-C₈алкенільну групу; алкінільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C₂-C₈алкінільну групу; арильну групу, що має, наприклад, 6-10 атомів вуглецю; або гетероарильну групу, що має, наприклад, 4-9 атомів вуглецю, де гетероатоми в гетероарильній групі можуть являти собою, наприклад, N, O, P або S. Естери можна одержувати за допомогою відомих способів, наприклад, каталізованого кислотою нуклеофільного приєднання, де здійснюють реакцію карбонової кислоти зі спиртом за присутності каталітичної кількості мінеральної кислоти. Аміді також можна одержувати за допомогою відомих способів, наприклад, шляхом реакції карбонової кислоти з відповідним аміном за присутності сполучної речовини, такої як дициклогексилкарбодіімід (DCC), у нейтральних умовах. Придатні солі жасмонової кислоти, лінолевої кислоти та ліноленової кислоти включають, наприклад, солі приєднання основи. Основи, які можна застосовувати як реактиви для одержання метаболічно прийнятних основних солей цих сполук, включають ті, які одержані з катіонами, наприклад, катіонами лужних металів (наприклад, калію та натрію) і катіонами лужноземельних металів (наприклад, кальцію та магнію). Ці солі можна легко одержувати за допомогою змішування розчину лінолевої кислоти, ліноленової кислоти або жасмонової кислоти з розчином основи. Цю сіль можна осаджувати з розчину та збирати за допомогою фільтрації або можна витягувати за допомогою інших засобів, наприклад, за допомогою випарювання розчинника.

[0056] Карикіни являють собою вінілогічні 4H-пірони, наприклад, 2H-фуоро[2,3-с]піран-2-они, у тому числі їх похідні й аналоги. Приклади цих сполук представлені наступною структурою:



де Z являє собою O, S або NR₅; кожний з R₁, R₂, R₃ і R₄ незалежно являє собою H, алкіл, алкеніл, алкініл, феніл, бензил, гідроксі, гідроксіалкіл, алкокси, фенілокси, бензилокси, CN, COR₆, COOR₇, галоген, NR₆R₇ або NO₂; і кожний з R₅, R₆ і R₇ незалежно являє собою H, алкіл або алкеніл, або їх біологічно прийнятною сіллю. Приклади біологічно прийнятних солей цих сполук можуть включати солі приєднання кислоти, утворені біологічно прийнятними кислотами, приклади яких включають гідрохлорид, гідробромід, сульфат або бісульфат, фосфат або гідрофосфат, ацетат, бензоат, сукцинат, фумарат, малеат, лактат, цитрат, тарtrat, глюконат; метансульфонат, бензенсульфонат і п-толуенсульфонову кислоту. Додаткові біологічно прийнятні солі металів можуть включати солі лужних металів, одержані з основами, приклади яких включають натрієві та калієві солі. Приклади сполук, які охоплюються структурою та можуть бути придатними для застосування за даним винаходом, включають наступні: 3-метил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H), 2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁, R₂, R₃, R₄=H), 7-метил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁, R₂, R₄=H, R₃=CH₃), 5-метил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁, R₂, R₃=H, R₄=CH₃), 3,7-диметил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁, R₃=CH₃, R₂, R₄=H), 3,5-диметил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁, R₄=CH₃, R₂, R₃=H), 3,5,7-триметил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁, R₃, R₄=CH₃, R₂=H), 5-метоксиметил-3-метил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁=CH₃, R₂, R₃=H, R₄=CH₂OCH₃), 4-бром-3,7-диметил-2H-фууро[2,3-с]піран-2-он (де R₁, R₃=CH₃, R₂=Br, R₄=H), 3-метилфууро[2,3-с]піридин-2(3H)-он (де Z=NH, R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H), 3,6-диметилфууро[2,3-с]піридин-2(6H)-он (де Z=N-CH₃, R₁=CH₃, R₂, R₃, R₄=H). Див. патент США № 7576213. Ці молекули також відомі як карікіни. Див. Halford, вище.

[0057] Кількість щонайменше однієї сигнальної молекули для рослин, використовуваної для обробки насіння, яка виражена в одиницях концентрації, як правило, знаходиться в діапазоні від приблизно 10⁻⁵ до приблизно 10⁻¹⁴ M (молярна концентрація), і в деяких варіантах здійснення від приблизно 10⁻⁵ до приблизно 10⁻¹¹ M, і в деяких інших варіантах здійснення від приблизно 10⁻⁷ до приблизно 10⁻⁸ M. Ефективна кількість, виражена в одиницях маси, як правило, знаходиться в діапазоні від приблизно 1 до приблизно 400 мкг/хандредвейт (cwt) насіння, і в деяких варіантах здійснення від приблизно 2 до приблизно 70 мкг/cwt, і в деяких інших варіантах здійснення від приблизно 2,5 до приблизно 3,0 мкг/cwt насіння.

[0058] Для цілей опосередкованої обробки насіння, тобто обробки в борозні, ефективна кількість щонайменше однієї сигнальної молекули для рослин, як правило, знаходиться в діапазоні від 1 мкг/акр до приблизно 70 мкг/акр і в деяких варіантах здійснення від приблизно 50 мкг/акр до приблизно 60 мкг/акр. Для цілей нанесення на рослини ефективна кількість щонайменше однієї сигнальної молекули для рослин, як правило, знаходиться в діапазоні від 1 мкг/акр до приблизно 30 мкг/акр і в деяких варіантах здійснення від приблизно 11 мкг/акр до приблизно 20 мкг/акр.

Гербіциди, фунгіциди й інсектициди

[0059] Придатні гербіциди включають бентазон, ацифлуорфен, хлоримурон, лактофен, кломазон, флуазифоп, глюфосинат, гліфосат, сетоксидим, імазетапір, імазамокс, фомесаф, флуміклорак, імазаквін і клетодим. Комерційні продукти, що містять кожну з цих сполук, є легкодоступними. Концентрація гербіциду в композиції, як правило, буде відповідати зазначеній нормі застосування для певного гербіциду.

[0060] "Фунгіцид", як використовується в даному документі та у даній галузі техніки, являє собою засіб, який знищує гриби або пригнічує їх ріст. Як використовується в даному документі, фунгіцид "характеризується активністю щодо" певних видів грибів, якщо обробка фунгіцидом зумовлює знищення або пригнічення росту популяції грибів (наприклад, у ґрунті) порівняно з необробленою популяцією. Ефективні фунгіциди згідно з даним винаходом, відповідно, будуть характеризуватися активністю щодо широкого спектра патогенів, у тому числі, але без обмеження, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* або *Sclerotinia* і *Phakopsora* та їх комбінації.

[0061] Комерційні фунгіциди можуть бути придатними для застосування у даному винаході. Придатні комерційно доступні фунгіциди включають PROTÉGÉ, RIVAL або ALLEGIANCE FL або LS (Gustafson, Плейно, Техас), WARDEN RTA (Agrilance, Сент-Пол, Міннесота), APRON XL, APRON MAXX RTA або RFC, MAXIM 4FS або XL (Syngenta, Вілмінгтон, Делавер), CAPTAN (Arvesta, Гвелф, Онтаріо) і PROTREAT (Nitragin Argentina, Буенос-Айрес, Аргентина). Активні інгредієнти в цих та інших комерційних фунгіцидах включають, але без обмеження, флудіоксоніл, мефеноксам, азоксистробін і металаксил. Комерційні фунгіциди найдоцільніше застосовують згідно з інструкціями виробника в рекомендованих концентраціях.

[0062] Як використовується в даному документі, інсектицид "характеризується активністю щодо" певних видів комах, якщо обробка інсектицидом зумовлює знищення або пригнічення популяції комах порівняно з необробленою популяцією. Ефективні інсектициди згідно з даним винаходом, відповідно, будуть характеризуватися активністю щодо широкого спектра комах, у тому числі, але без обмеження,

дротяників, совок, червоподібних личинок, кукурудзяного жука, личинок мухи паросткової, земляних білош, клопів-наземників, попелиць, листоїдів і щитників.

[0063] Комерційні фунгіциди можуть бути придатними для застосування у даному винаході. Придатні комерційно доступні інсектициди включають CRUISER (Syngenta, Вілмінгтон, Делавер), GAUCHO і PONCHO (Gustafson, Плейно, Техас). Активні інгредієнти в цих та інших комерційних інсектицидах включають тіаметоксам, клотіанідин та імідаклопід. Комерційні інсектициди найдоцільніше застосовують згідно з інструкціями виробника в рекомендованих концентраціях.

Мікроорганізми, що солюбілізують фосфати, діазотрофи (ризобіальні інокулянти) і/або мікоризні гриби

[0064] Даний винахід додатково може передбачати обробку насіння мікроорганізмом, що солюбілізує фосфати. Як використовується в даному документі, "мікроорганізм, що солюбілізує фосфати" являє собою мікроорганізм, який здатний збільшувати кількість фосфору, доступного для рослини. Мікроорганізми, що солюбілізують фосфати, включають штами грибів і бактерій. У варіанті здійснення мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, являє собою споротвірний мікроорганізм.

[0065] Необмежувальні приклади мікроорганізмів, що солюбілізують фосфати, включають види з роду, вибраного з групи, що включає *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathania*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter* і *Xanthomonas*.

[0066] Необмежувальні приклади мікроорганізмів, що солюбілізують фосфати, вибрані з групи, яка включає *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissi*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium* sp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., *Swaminathania salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis* і *Xanthomonas campestris*.

[0067] У конкретному варіанті здійснення мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, являє собою штам гриба *Penicillium*. Штами гриба *Penicillium*, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають *P. bilaiae* (раніше відомий як *P. bilaii*), *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gastrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P. raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variable*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus* і *P. expansum*.

[0068] В одному конкретному варіанті здійснення вид *Penicillium* являє собою *P. bilaiae*. В іншому конкретному варіанті здійснення штами *P. bilaiae* вибрані з групи, що включає ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162 (Wakelin, et al., 2004. *Biol Fertil Soils* 40:36-43). В іншому конкретному варіанті здійснення вид *Penicillium* являє собою *P. gastrivorus*, наприклад, NRRL 50170 (див., Wakelin, вище).

[0069] У деяких варіантах здійснення використовують більш ніж один мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, наприклад, щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять, щонайменше 6, у тому числі будь-яку комбінацію *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathania*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter* і *Xanthomonas*, у тому числі один вид, вибраний зі наступної групи: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissi*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium* sp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., *Swaminathania salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis* і *Xanthomonas campestris*.

[0070] У деяких варіантах здійснення також можна комбінувати два різні штами того самого виду, наприклад, використовують щонайменше два різні штами *Penicillium*. Застосування комбінації із щонайменше двох різних штамів *Penicillium* має наступні переваги. У разі внесення в ґрунт, що вже містить нерозчинні (або помірно розчинні) фосфати, застосуванням комбінованих штамів грибів буде зумовлювати збільшення кількості фосфору, доступного для поглинання рослинами, порівняно із застосуванням тільки одного штаму *Penicillium*. Це, у свою чергу, може зумовлювати збільшення поглинання фосфатів та/або

підвищення врожайності рослин, вирощених на ґрунті, порівняно з роздільним використанням окремих штамів. Комбінація штамів також дає можливість застосовувати нерозчинні фосфорити як ефективне добриво для ґрунтів, які характеризуються недостатніми кількостями доступного фосфору. Таким чином, у деяких варіантах здійснення використовують один штам *P. bilaiae* та один штам *P. gaestrivorus*. В інших варіантах здійснення ці два штами являють собою NRRL 50169 і NRRL 50162. В додаткових варіантах здійснення щонайменше два штами являють собою NRRL 50169 і NRRL 50170. В додаткових варіантах здійснення щонайменше два штами являють собою NRRL 50162 і NRRL 50170.

[0071] Мікроорганізми, що солюбілізують фосфати, можна одержувати з використанням будь-якого придатного способу, відомого фахівцеві в даній галузі техніки, наприклад, твердофазного культивування або культивування на рідкому середовищі з використанням придатного джерела вуглецю. Мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, переважно одержують у формі стабільних спор.

[0072] У варіанті здійснення мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, являє собою гриб *Penicillium*. Гриб *Penicillium* згідно з даним винаходом можна вирощувати з використанням твердофазного культивування або культивування на рідкому середовищі та придатного джерела вуглецю. Ізоляти *Penicillium* можна вирощувати за допомогою будь-якого придатного способу, відомого фахівцеві в даній галузі техніки. Наприклад, гриб можна культивувати на твердому поживному середовищі, такий як картопляно-декстрозний агар або солодово-пептонний агар, або у колбах, що містять придатні рідкі середовища, наприклад, середовище Чапека-Докса або картопляно-декстрозний бульйон. Ці способи культивування можна використовувати при одержанні інкуляту *Penicillium* spp. для обробки насіння (наприклад, нанесення покриття) та/або застосування з агрономічно прийнятним носієм для внесення в ґрунт. Вираз "інкулят", використовуваний в даному описі, як передбачається, стосується будь-якої форми мікроорганізму, що солюбілізує фосфати, а саме клітини гриба, міцелію або спор, клітини бактерій або спор бактерій, який здатний розмножуватися на ґрунті або в ґрунті, якщо умови температури, вологості тощо сприяють росту грибів.

[0073] Одержання спор *Penicillium* під час твердофазного культивування, наприклад, можна досягти шляхом інкуляції твердого середовища, наприклад, субстрату на основі торфу або вермікуліту, або зерна, у тому числі, але без обмеження, різновидів вівса, пшениці, ячменю або рису. Стерилізоване середовище (одержане за допомогою автоклавування або опромінення) інкулюють суспензією спор (1×10^2 - 1×10^7 КУО/мл) відповідного *Penicillium* spp. і вологість доводять до 20-50% залежно від субстрату. Цей матеріал інкубують протягом 2-8 тижнів за кімнатної температури. Спори також можна одержувати за допомогою культивування на рідкому середовищі (Cunningham et al., 1990. Can J Bot. 68:2270-2274). Одержання на рідкому середовищі можна досягти шляхом культивування гриба в будь-яких придатних середовищах, таких як картопляно-декстрозний бульйон або середовища із сахарозою та дріжджовим екстрактом, при відповідному значенні pH і температурних умовах, які можна визначити відповідно до стандартних методик в даній галузі техніки.

[0074] Одержаний у результаті матеріал можна використовувати відразу або спори можна збирати, концентрувати за допомогою центрифугування, складати та потім сушити за допомогою методик сушіння на повітрі, ліофілізації або сушіння у псевдозрізженому шарі (Friesen, et al., 2005, Appl. Microbiol. Biotechnol. 68:397-404) з одержанням змочуваного порошку. Змочуваний порошок потім суспендують у воді, наносять на поверхню насіння і забезпечують його висушування до посіву. Змочуваний порошок можна використовувати в комбінації з іншими видами обробки насіння, наприклад, але без обмеження, видами хімічної обробки насіння, носіями (наприклад, тальк, глина, каолін, силікагель, каолініт) або полімерами (наприклад, метилцелюлоза, полівінілпіролідон). У альтернативному випадку, суспензію спор відповідного *Penicillium* spp. можна застосовувати із придатним сумісним із ґрунтом носієм (наприклад, порошком або гранулами на основі торфу) при відповідному кінцевому вмісті вологи. До використання матеріал можна інкубувати при кімнатній температурі, як правило, протягом від приблизно 1 дня до приблизно 8 тижнів.

[0075] Окрім інгредієнтів, використовуваних для культивування мікроорганізму, що солюбілізує фосфати, у тому числі, наприклад, інгредієнтів, згаданих вище стосовно до культивування *Penicillium*, мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, можна складати з використанням інших агрономічно прийнятних носіїв. Використовуваний в даному документі разом із виразом "носій" вираз "агрономічно прийнятний" стосується будь-якого матеріалу, який можна використовувати для доставки активних засобів до насіння, ґрунту або рослини, і переважно цей носій можна додавати (до насіння, ґрунту або рослини) без небажаного впливу на ріст рослин, структуру ґрунту, дренажність ґрунту або подібне. Придатні носії включають, але без обмеження, пшеничну полову, висівки, подрібнену пшеничну солому, порошки або гранули на основі торфу, гіпсові гранули та глини (наприклад, каолін, бентоніт, монтморилоніт). У разі додавання спор у ґрунт гранульований склад буде переважним. Склади у формі рідини, торф'яного порошку або змочуваного порошку будуть придатними для нанесення покриття на насіння. У разі використання для нанесення покриття на насіння матеріал можна змішувати з водою, наносити на насіння і забезпечувати висушування. Приклад інших носіїв включає змочені висівки, висушені, просіяні та наносяться на насіння, попередньо покриті клейкою речовиною, наприклад, гуміарабіком. У варіантах здійснення, у яких передбачається склад з активних засобів в одній композиції, агрономічно прийнятний носій може бути водним.

[0076] Кількість щонайменше одного мікроорганізму, що солюбілізує фосфати, варіює залежно від виду насіння або ґрунту, виду культурних рослин, кількості джерела фосфору та/або поживних мікроелементів, які присутні у ґрунті або, що додаються у ґрунт тощо. Для кожного конкретного випадку придатну кількість можна визначити за допомогою простих експериментів із використанням емпіричних

методик. Звичайно, для *Penicillium*, наприклад, кількість, що наноситься, знаходиться в діапазоні 0,001-1,0 кг спор та міцелію грибів (сиря вага) на гектар або 10^2 - 10^6 колонієутворювальних одиниць (КУО) на насінину (якщо використовується насіння з нанесеним покриттям), або на гранульованому носії вносять від 1×10^6 до 1×10^{11} колонієутворювальних одиниць на гектар. Клітини грибів у формі, наприклад, спор і носій можна додавати в борозну для насіння у ґрунті на рівні коренів або можна використовувати для нанесення покриття на насіння до посіву.

[0077] У варіантах здійснення, наприклад, у яких передбачається застосування щонайменше двох штамів мікроорганізму, що солюбілізує фосфати, наприклад, двох штамів *Penicillium*, у ґрунт замість природного фосфориту (або навіть на додаток до нього) можна додавати комерційні добрива. Джерело фосфору може включати джерело фосфору, нативне щодо ґрунту. В інших варіантах здійснення джерело фосфору можна додавати в ґрунт. В одному варіанті здійснення джерело являє собою фосфорит. В іншому варіанті здійснення джерело являє собою штучне добриво. Комерційно доступні штучні фосфатні добрива поділяються на багато видів. Деякі типові добрива являють собою такі, які містять монофосфат амонію (MAP), потрійний суперфосфат (TSP), діамонійфосфат, простий суперфосфат і поліфосфат амонію. Усі з цих добрив одержують шляхом хімічної обробки нерозчинних природних фосфоритів на устаткуванні для виробництва добрив у великому масштабі, і цей продукт є дорогим. За допомогою даного винаходу можливо зменшити кількість цих добрив, які вносять в ґрунт, при цьому усе ще зберігається така ж кількість фосфору, що поглинається з ґрунту.

[0078] У додатковому варіанті здійснення джерело фосфору є органічним. Органічне добриво стосується ґрунтополіпшувача, одержаного із природних джерел, що забезпечує щонайменше мінімальний відсотковий вміст азоту, фосфату та карбонату калію. Приклади включають рослинні відходи та відходи тваринництва, кам'яний пил, водорості, інокулянти та поліпшувачі. Конкретні типові приклади включають кісткове борошно, м'ясне борошно, тваринний гній, компост, осад стічних вод або гуано.

[0079] Інші добрива, наприклад, джерела азоту або інші ґрунтополіпшувачі, звичайно, також можна додавати в ґрунт приблизно одночасно з мікроорганізмом, що солюбілізує фосфати, або в інший час за умови, що інші матеріали не є токсичними для гриба.

[0100] Діазотрофи являють собою бактерії та археї, які фіксують атмосферний газоподібний азот з утворенням форми, придатної для використання, наприклад, амонію. Приклади діазотрофів включають бактерії з родів *Rhizobium* spp. (наприклад, *R. cellulosilyticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. meliloti*, *R. mongolense*, *R. miluonense*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. undicola* та/або *R. yanglingense*), *Bradyrhizobium* spp. (наприклад, *B. betae*, *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamiae*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizii* та/або *B. yuanmingense*), *Azorhizobium* spp. (наприклад, *A. caulinodans* та/або *A. doebereineriae*), *Sinorhizobium* spp. (наприклад, *S. abri*, *S. adhaerens*, *S. americanum*, *S. aboris*, *S. fredii*, *S. indiaense*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. mexicanus*, *S. morelense*, *S. saheli*, *S. terangae* та/або *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium* spp. (*M. albiziae*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. pluviarum*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* та/або *M. tianshanense*) та їх комбінації. У конкретному варіанті здійснення діазотроф вибраний з групи, яка включає *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *S. meliloti* та їх комбінації. В іншому варіанті здійснення діазотроф являє собою *B. japonicum*. В іншому варіанті здійснення діазотроф являє собою *R. leguminosarum*. В іншому варіанті здійснення діазотроф являє собою *R. meliloti*. В іншому варіанті здійснення діазотроф являє собою *S. meliloti*.

[0101] Мікоризні гриби утворюють симбіотичні асоціації з корінням судинних рослин і забезпечують, наприклад, здатність до поглинання води та мінеральних поживних речовин завдяки порівняно великій площі поверхні міцелію. Мікоризні гриби охоплюють ендомікоризні гриби (що також мають назву везикулярно-арбускулярних мікоризних грибів, VAM, арбускулярних мікоризних грибів або AM), ектомікоризні гриби або їх комбінацію. В одному варіанті здійснення мікоризні гриби являють собою ендомікоризу з типу *Glomeromycota* і родів *Glomus* і *Gigaspora*. У додатковому варіанті здійснення ендомікоризний гриб являє собою штам *Glomus aggregatum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus clarum*, *Glomus deserticola*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus monosporum* або *Glomus mosseae*, *Gigaspora margarita* або їх комбінацію.

[0102] Приклади мікоризних грибів включають ектомікоризні гриби з типів *Basidiomycota*, *Ascomycota* і *Zygomycota*. Інші приклади включають штами *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon amylopogon*, *Rhizopogon fulvigleba*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon villosuli*, *Scleroderma cepa*, *Scleroderma citrinum* або їх комбінацію.

[0103] Мікоризні гриби включають ерикоїдні мікоризи, арбутоїдні мікоризи або монотропоїдні мікоризи. Арбускулярні мікоризні та ектомікоризні гриби утворюють ерикоїдну мікоризу з багатьма рослинами, що належать до порядку *Ericales*, тоді як у деяких *Ericales* утворюється арбутоїдна та монотропоїдна мікориза. В одному варіанті здійснення мікориза може являти собою ерикоїдну мікоризу, переважно з типу *Ascomycota*, наприклад, *Hymenoscyphus ericae* або *Oidiodendron* sp. В іншому варіанті здійснення мікориза також може являти собою арбутоїдну мікоризу, переважно з типу *Basidiomycota*. У ще одному варіанті здійснення мікориза може являти собою монотропоїдну мікоризу, переважно з типу *Basidiomycota*. У ще одному варіанті здійснення мікориза може являти собою орхідну мікоризу, переважно з роду *Rhizoctonia*.

[0080] Способи за даним винаходом застосовуються до насіння бобової рослини, типові приклади якої включають сою, люцерну, арахіс, горох, сочевицю, квасолю та конюшину. Способи за даним винаходом також є застосовними до насіння рослини, що не належить до бобових, наприклад, *Roaseae*,

Cucurbitaceae, Malvaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae і Solonaceae. Типові приклади насіння рослини, що не належить до бобових, включають польові культури, наприклад, кукурудзу, рис, овес, жито, ячмінь і пшеницю, бавовник та канолу, і овочеві культури, як наприклад, різновиди картоплі, різновиди томату, різновиди огірка, різновиди буряка, латук і канталупу.

- 5 [0081] Даний винахід тепер буде описано за допомогою наступних необмежувальних прикладів. Якщо не зазначено інше, воду використовували як контроль (позначено як "контроль").

Приклади

Експерименти в теплиці

Приклад 1. Ріст проростків сиратро *in vitro*, що стимулюється комбінаціями LCO

- 10 [0082] Поверхню насіння сиратро (*Macroptilium atropurpureum*) стерилізували за допомогою 10% дезінфікуючого розчину протягом 10 хвилин з наступними 3 промиваннями стерилізованою дистильованою водою. Насіння потім поміщали в пробірки, що містять 15 мл стерильного середовища із затверділим агаром, доповненим LCO, проілюстрованими на Фіг. 1а і 2а (і які в прикладах називають "LCO для сої" та "LCO для гороху") (із загальною концентрацією 10^{-8} М або окремо, або в комбінації). Два інших LCO, тобто LCO для гороху або LCO, проілюстрований на Фіг. 5 (який у прикладах називають "LCO для люцерни") додавали до LCO для сої для вивчення ефекту їх комбінацій. Насіння пророщували протягом 7 днів при освітленні для вирощування при 20°C із циклом день/ніч 16/8 год., а потім збирали для визначення довжини проростків.

- 20 [0083] На основі порівняння LCO для сої в комбінації з іншим LCO (варіант здійснення даного винаходу) і LCO для сої окремо (не відноситься до даного винаходу та призначений для порівняння), комбінація LCO для сої та LCO для люцерни була ефективнішою, ніж LCO для сої окремо або його комбінація з LCO для гороху (Фіг. 6). LCO для сої в комбінації з LCO для люцерни давали найвищі проростки при підсумовуванні загальної довжини кореня та пагона. Ця відмінність була статистично значущою.

- 25 Приклад 2. Позакореневе нанесення LCO на вишнеподібний томат

- [0084] Виходячи з даних, що стосуються комбінації LCO для сої та LCO для люцерни до сиратро (приклад 1), проводили додаткове дослідження на томаті. Рослини вишнеподібного томату Florida petite вирощували з насіння у пластикових контейнерах у теплиці й обприскували LCO для сої або його комбінацією з LCO для люцерни під час закладки квіткових бруньок при нормі внесення 5 мл/рослина. Друге обприскування також здійснювали через один тиждень після першого внесення. На різних стадіях дозрівання вимірювали зеленість листя, кількість квіток, кількість плодів і кінцеву сиру вагу плодів.

- [0085] Результати, досягнуті у варіанті здійснення даного винаходу (LCO для сої + LCO для люцерни), продемонстрували, що спостерігалось незначне підвищення зеленості листя при застосуванні комбінації LCO порівняно із LCO для сої, що не відноситься до даного винаходу та призначений для порівняння, (Фіг. 7 і 8). Виходячи із загальної кількості квіток, утворених протягом періоду у п'ять днів, комбінація LCO приводила до значно вищого результату, ніж LCO для сої, що не відноситься до даного винаходу. Аналогічно, коли підраховували кількість плодів за період шість днів, комбінація LCO для сої та LCO для люцерни продемонструвала значно вищий результат, ніж LCO для сої (Фіг. 9 і 10). Наприкінці збору середня кількість плодів на рослину з LCO для сої, що не відноситься до даного винаходу, і з комбінацією LCO для сої та LCO для люцерни була значно вищою порівняно з контрольною обробкою. Проте, середній урожай вишнеподібних томатів, виражений через сиру вагу, був значним тільки для комбінації LCO для сої та LCO для люцерни порівняно з контролем і LCO для сої (Фіг. 11 і 12).

Приклад 3. Вплив LCO та їх комбінацій на ріст коренів проростків томату

- [0086] Насіння томату сорту Royal Mounty поміщали в чашки Петрі, що містять вологий (просочений розчинами для обробки) папір для пророщування. Приготували розчини для обробки із чотирма різними LCO, а саме AC LCO для гороху (ацильований), NAC LCO для гороху (що не є ацильованим), LCO для люцерни та LCO для сої. Загальну концентрацію LCO, використовувану для одержання водного розчину для обробки, підтримували на рівні 10^{-9} М. Чашки Петрі потім поміщали в темряву при кімнатній температурі для проростання насіння. Через вісім днів після проростання вимірювали довжину коренів проростків за допомогою ручної лінійки.

- [0087] Результати, одержані в цьому експерименті, вказують на те, що всі окремі види LCO приводили до підвищеної довжини коренів проростків томату порівняно з контролем, але тільки певні комбінації LCO, тобто NAC LCO для гороху та LCO для сої, AC LCO для гороху плюс LCO для сої та NAC LCO для гороху плюс LCO для люцерни давали значне стимулювання коренів порівняно з окремими видами LCO, що не відносяться до даного винаходу та призначені для порівняння (Фіг. 8). У результаті експерименту виявилось, що для проростків томату комбінація NAC LCO для гороху та LCO для сої була найкращою із усіх комбінацій. Результати також вказують на те, що комбінації певних LCO були кориснішими для проростків томату, ніж інші, і можна виключити те, що комбінація всіх чотирьох LCO була кращою.

- 60 [0088] Усі патентні та непатентні публікації, що цитуються в даному описі, свідчать про рівень компетентності фахівців у галузі, до якої належить даний винахід. Усі ці публікації включені в даний документ за допомогою посилання тією самою мірою, як якщо кожна окрема публікація або патентна заявка була спеціально й окремо зазначена як включена за допомогою посилання.

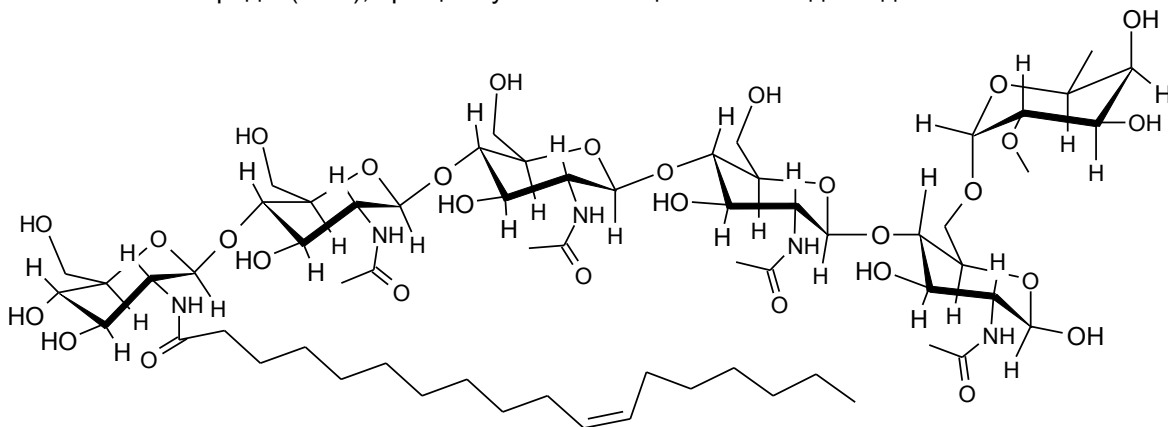
- [0089] Хоча в даному документі даний винахід був описаний з посиланням на конкретні варіанти здійснення, слід розуміти, що дані варіанти здійснення є тільки ілюстраціями принципів і шляхів застосування даного винаходу. Отже, слід розуміти, що можна здійснювати численні модифікації

ілюстративних варіантів здійснення і що можна розробити інші засоби без відступу від сутності й обсягу даного винаходу, як визначено в формулі винаходу, що додається.

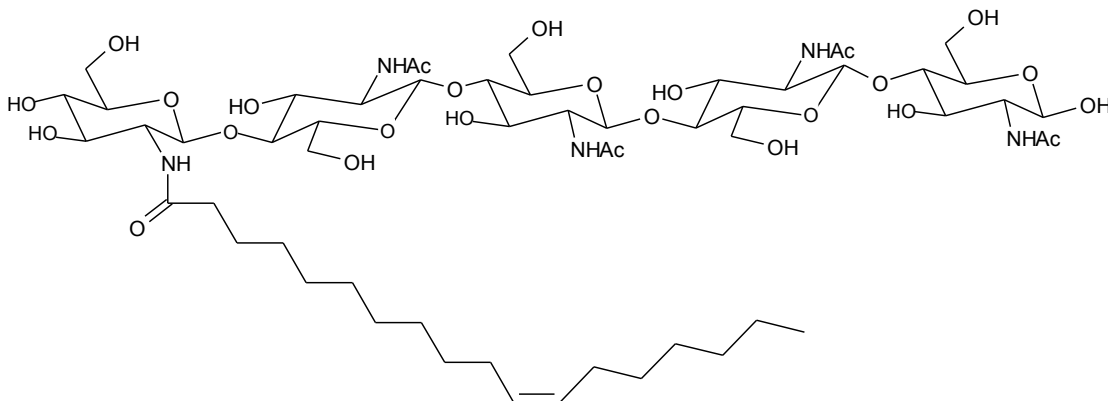
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

5

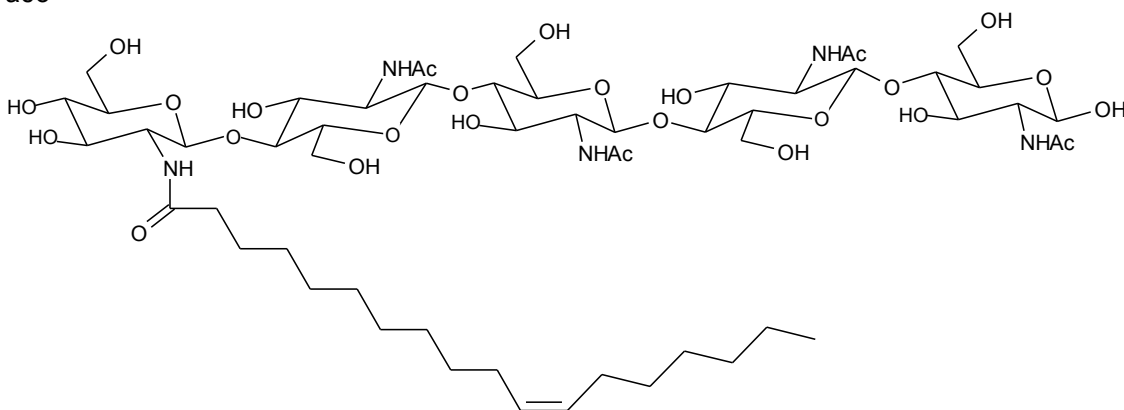
1. Спосіб стимулювання росту рослин, що включає обробку насінини рослини та/або листя рослини, що проростає з насінини, ефективною кількістю щонайменше двох відмінних ліпохітоолігосахаридів (LCO), при цьому зазначені щонайменше два відмінних LCO включають:



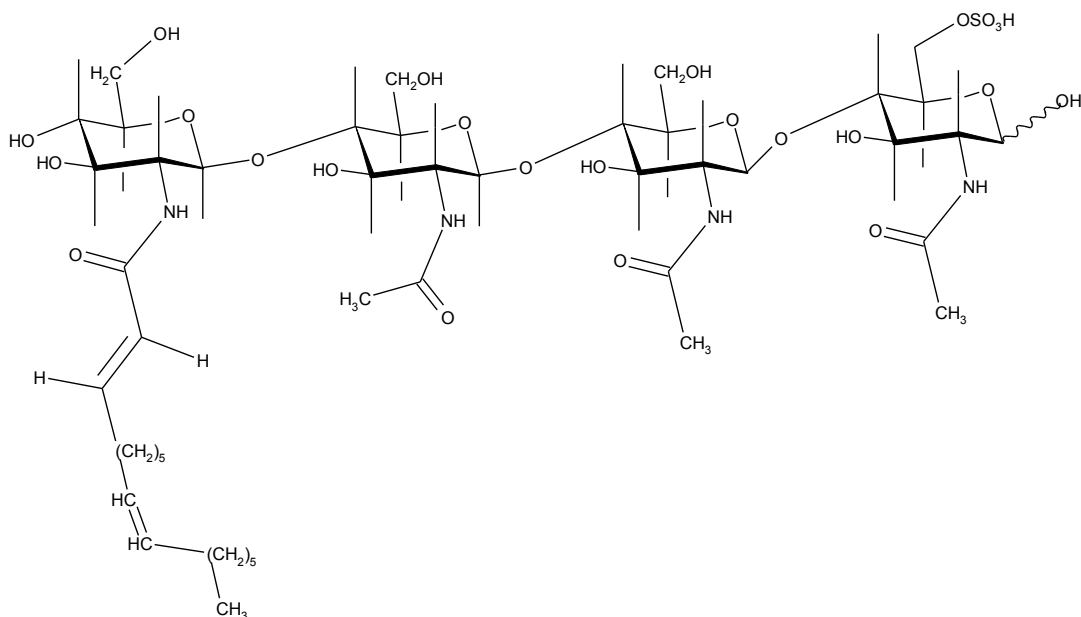
10 та



або



15 та



причому при одержанні рослина характеризується щонайменше одним зі збільшеної врожайності рослин, вимірюваної в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з необробленими рослинами та/або рослинами, одержаними з необробленого насіння.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один LCO, одержаний зі штаму ризобій.

3. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один LCO, одержаний зі штаму ризобій, вибраного з групи, яка включає *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp. і *Azorhizobium* sp.

4. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один LCO, одержаний зі штаму *Bradyrhizobium japonicum*.

5. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один LCO, одержаний зі штаму *Rhizobium leguminosarum*.

6. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один LCO, одержаний зі штаму *Sinorhizobium meliloti*.

7. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один LCO, одержаний зі штаму *Glomus intraradiceus*.

8. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один рекомбінантний LCO.

9. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що рекомбінантний LCO характеризується чистотою щонайменше 60 %.

10. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що рекомбінантний LCO характеризується чистотою щонайменше 70 %.

11. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що рекомбінантний LCO характеризується чистотою щонайменше 80 %.

12. Спосіб за п. 8, який **відрізняється** тим, що рекомбінантний LCO характеризується чистотою щонайменше 90 %.

13. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO включають щонайменше один синтетичний LCO.

14. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять на насінину до посіву та/або приблизно у час посіву.

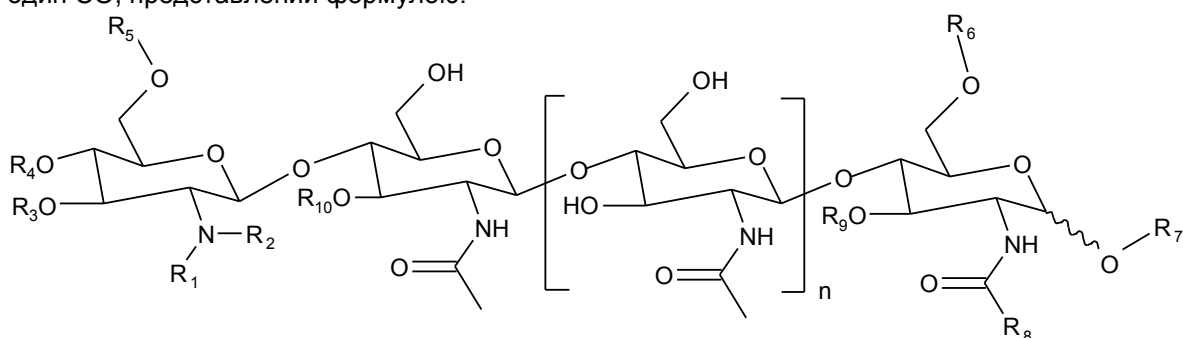
15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за один місяць до посіву.

16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за два місяці до посіву.

17. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за три місяці до посіву.

18. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за шість місяців до посіву.

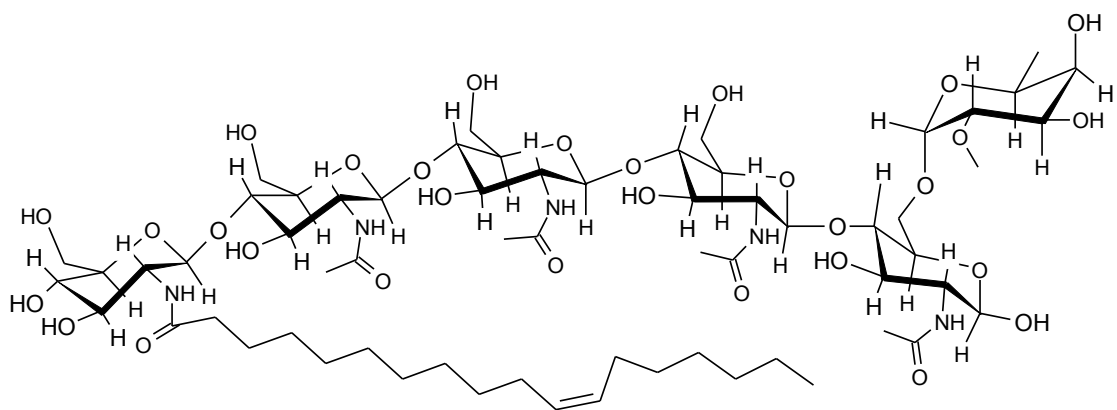
19. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за рік до посіву.
20. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за вісімнадцять місяців до посіву.
- 5 21. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за два роки до посіву.
22. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять щонайменше за три роки до посіву.
23. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що ефективна кількість щонайменше двох відмінних LCO становить від приблизно 10^{-5} до приблизно 10^{-14} М.
- 10 24. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять на насінину у борозні.
25. Спосіб за п. 24, який **відрізняється** тим, що ефективна кількість щонайменше двох відмінних LCO становить від 1 мкг/акр до приблизно 70 мкг/акр.
- 15 26. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що щонайменше два відмінні LCO наносять на рослину шляхом позакореневої обробки.
27. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що ефективна кількість щонайменше двох відмінних LCO становить від 1 мкг/акр до приблизно 30 мкг/акр.
28. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насінину та/або рослину, що проростає з насінини, щонайменше одного агрономічно корисного засобу.
- 20 29. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насінину та/або рослину, що проростає з насінини, щонайменше одного поживного мікроелемента.
30. Спосіб за п. 29, який **відрізняється** тим, що поживний мікроелемент вибраний із групи, що включає вітаміни та слідові елементи.
- 25 31. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насінину та/або рослину, що проростає з насінини, щонайменше однієї сигнальної молекули для рослин.
32. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насінину та/або рослину, що проростає з насінини, щонайменше одного хітоолігосахариду (CO).
33. Спосіб за п. 32, який **відрізняється** тим, що щонайменше один CO включає щонайменше один CO, представлений формулою:
- 30



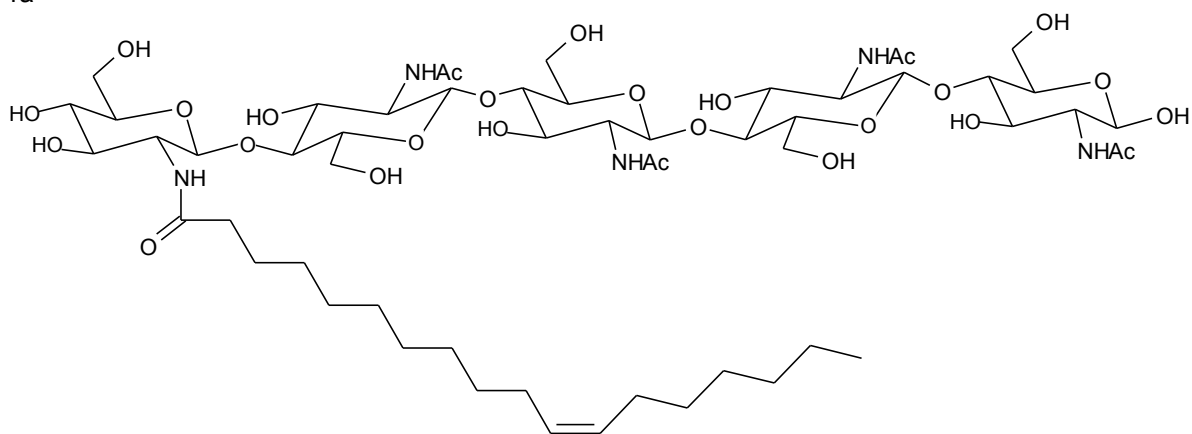
у якій:

- R₁ являє собою водень або метил;
- R₂ являє собою водень або метил;
- 35 R₃ являє собою водень, ацетил або карбамоїл;
- R₄ являє собою водень, ацетил або карбамоїл;
- R₅ являє собою водень, ацетил або карбамоїл;
- R₆ являє собою водень, арабінозил, фукозил, ацетил, естер сірчаної кислоти, 3-O-S-2-O-MeFuc, 2-O-MeFuc та 4-O-AcFuc;
- 40 R₇ являє собою водень, манозил або гліцерин;
- R₈ являє собою водень, метил або -CH₂OH;
- R₉ являє собою водень, арабінозил або фукозил;
- R₁₀ являє собою водень, ацетил або фукозил; та
- n дорівнює 0, 1, 2 або 3.
- 45 34. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення сигнальної молекули для рослин, вибраної з групи, яка включає хітинові сполуки, флавоноїди, жасмонову кислоту та її похідні, лінолеву кислоту та її похідні, ліноленову кислоту та її похідні та карикіни та їхні похідні.

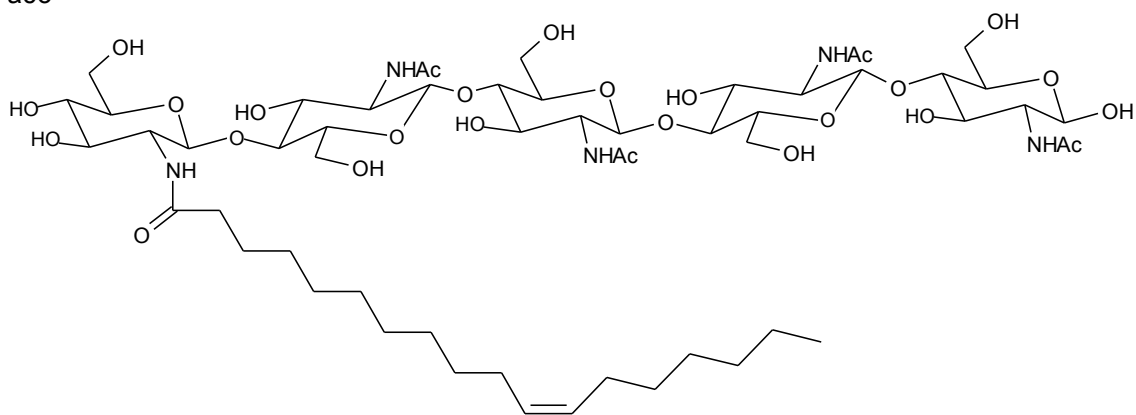
35. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насініну та/або рослину, що проростає з насініни, одного або декількох гербіцидів, інсектицидів та/або фунгіцидів.
- 5 36. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насініну та/або рослину, що проростає з насініни, одного або декількох мікроорганізмів, що солюбілізують фосфати, діазотрофів та/або мікоризних грибів.
37. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насініну та/або рослину, що проростає з насініни, одного або декількох штамів гриба *Penicillium*, що солюбілізують фосфати.
- 10 38. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насініну та/або рослину, що проростає з насініни, одного або декількох штамів *Penicillium bilaiae*, що солюбілізують фосфати.
39. Спосіб за п. 38, який **відрізняється** тим, що штам *Penicillium bilaiae* вибраний із групи, що включає NRRL 50162, NRRL 50169, ATCC 20851, ATCC 22348 та ATCC 18309.
- 15 40. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який додатково включає нанесення на насініну та/або рослину, що проростає з насініни, одного або декількох штамів *Penicillium gaestrivorus*, що солюбілізують фосфати.
41. Спосіб за будь-яким із попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою бобову рослину або її насініну.
- 20 42. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою рослину, яка не належить до бобових, або її насініну.
43. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою кукурудзу або її насініну.
44. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою сорго або її насініну.
- 25 45. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою кvasолю або її насініну.
46. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою сою або її насініну.
- 30 47. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою овес або його насініну.
48. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою пшеницю або її насініну.
49. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою люцерну або її насініну.
- 35 50. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою плодову рослину або її насініну.
51. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою ячмінь або його насініну.
- 40 52. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою картоплю або її насініну.
53. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою томат або його насініну.
54. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою сочевицю або її насініну.
- 45 55. Спосіб за будь-яким із пп. 1-40, який **відрізняється** тим, що рослина або її насінина являє собою рис або його насініну.
56. Насінина, оброблена згідно зі способом за будь-яким із пп. 1-55, що містить щонайменше два відмінних LCO, при цьому зазначені щонайменше два відмінних LCO включають:



та

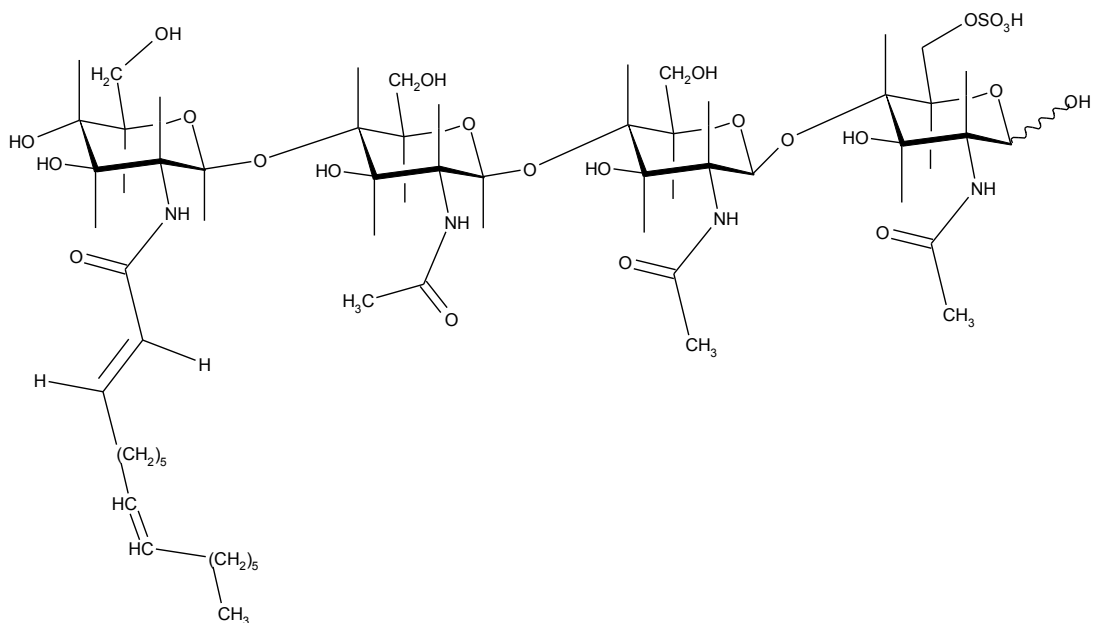


або



5

та



Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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