



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126391** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)**A01C 1/06** (2006.01)**A01H 5/00****A01H 5/10** (2018.01)**A01N 25/02** (2006.01)**A01N 25/08** (2006.01)**A01N 63/00****A01N 63/10** (2020.01)НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2019 07582**

(22) Дата подання заявки: **07.12.2017**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **29.09.2022**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/431,927**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **09.12.2016**

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

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.12.2019, Бюл.№ 23**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **28.09.2022, Бюл.№ 39**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2017/065081, 07.12.2017**

(72) Винахідник(и):
**Ріу Рене А. (US),
МакФатріч Чарлз Майкл (US),
Наннапанені Кішоре (US)**

(73) Володілець (володільці):
**НЬЮЛІФ СІМБАЙОТІКС, ІНК.,
1005 North Warson Road, BRDG Park, St. Louis,
Missouri 63132, United States of America (US)**

(74) Представник:
**Бреус Наталія Володимирівна, реєстр.
№167**

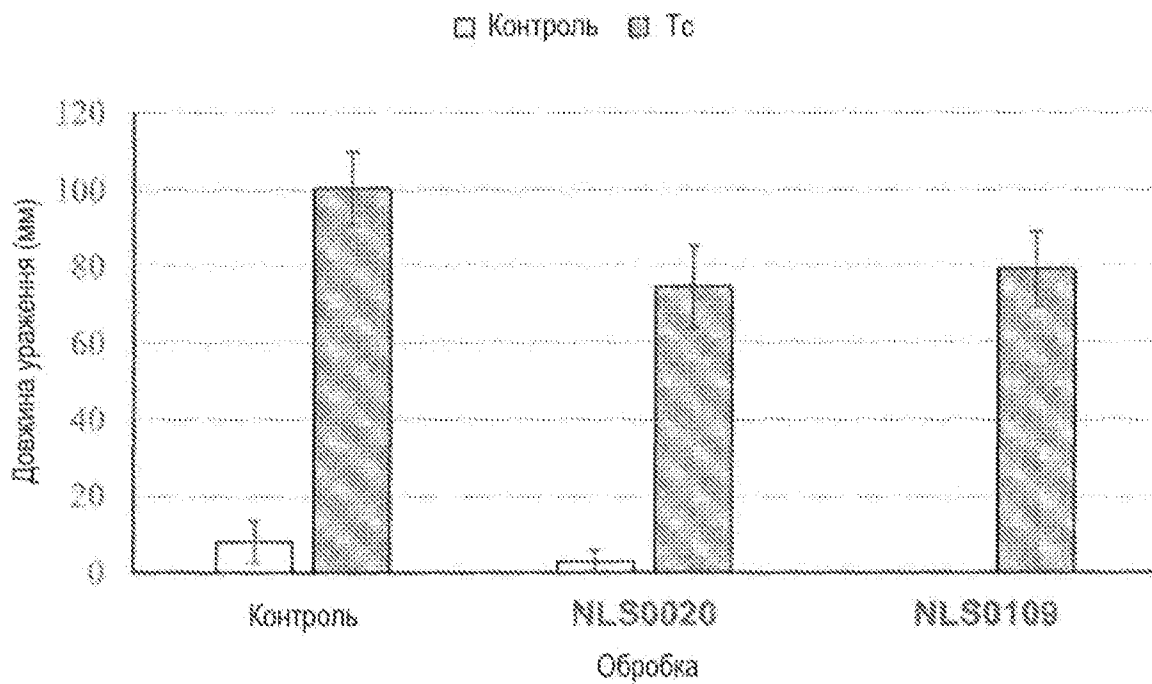
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA 94389 C2, 10.05.2011
WO 2015/142393 A1, 24.09.2015
WO 2015/200902 A2, 30.12.2015
Tani A. High-Throughput Identification and Screening of Novel Methylobacterium Species Using Whole-Cell MALDI-TOF/MS Analysis / A. Tani et al. // PLoS ONE. – 2012, vol. 7, no. 7. – P. 1-13
WO 2015/085063 A1, 11.06.2015
US 6014451 A, 11.01.2000
WO 2016/201284 A2, 15.12.2016
Menpara Endophytic Bacteria-Unexplored Reservoir of Antimicrobials for Combating Microbial Pathogens / Menpara et al. // Microbial Pathogens and Strategies for Combating them: Science, Technology and Education. – 2013, vol. 2. – P. 1095-1103
WO 2016/069564 A1, 06.05.2016
Nascimento S.B. Endophytic Bacteria from Piper tuberculatum Jacq.: Isolation, Molecular Characterization, and in Vitro Screening for the Control of Fusarium solani f. sp. piperis, the Causal Agent of Root Rot Disease in Black Pepper (Piper nigrum L.) / S.B. Nascimento et al. // Genetics and Molecular Research. – 2015, vol. 14, no. 3. – P. 7567-7577
US 2014/0147425 A1, 29.05.2014
Poorniammal R. In Vitro Biocontrol Activity of Methylobacterium Extorquens Against Fungal Pathogens / R. Poorniammal ET AL. // International Journal of Plant Protection. – 2009, vol. 2, no. 1. – P. 59-62
Ardanov P. Effects of Methylobacterium sp. on emergence, yield, and disease prevalence in three cultivars of potato (Solanum tuberosum L.) were associated with the shift in endophytic microbial community / P. Ardanov ET AL. // PLANT AND SOIL, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL. – 2015, vol. 405, no. 1. – P. 299-310

(54) КОМПОЗИЦІЯ МЕТИЛОБАКТЕРІЙ ДЛЯ ПРИГНІЧЕННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ, ВИКЛИКАНИХ ГРИБАМИ

UA 126391 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до сільського господарства. Заявлено композицію і спосіб її одержання, яка містить метилову бактерію, де (i) метилову бактерію має послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 9-11; або (ii) метилову бактерію являє собою NLS0109, яка інгібує ріст патогенного гриба рослин, спосіб застосування композиції для пригнічення інфекцій рослин.



Фіг. 2

Перехресне посилання на пов'язані заявки

Ця заявка заявляє пріоритет заявки U.S. 62/431927, що подана 9 грудня 2016 і включена в даний документ у вигляді посилання у повному обсязі.

Викладення переліку послідовностей

5 Перелік послідовностей, що міститься у файлі з ім'ям "53907-171478_ST25.txt", який має розмір 32768 байтів (вимірюється в MS-Windows®) та створено 1 грудня 2017 року, містить 60 нуклеотидних послідовностей, наведених в даному документі через систему EFS USPTO, і включений в даний документ у вигляді посилання у повному обсязі.

Рівень техніки

10 Одновуглецеві органічні сполуки, такі як метан і метанол, знаходяться в природі широко і використовуються як джерела вуглецю бактеріями, класифікованими як метанотрофи і метилотрофи. Метанотрофні бактерії включають види з родів *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum* та *Methylocella* (Lidstrom, 2006). Метанотрофи мають фермент метанмонооксигеназу, який включає атом кисню з O₂ в метан, утворюючи метанол. Всі метанотрофи є облигатними утилізаторами одновуглецевих сполук, які не можуть використовувати сполуки, що містять вуглець-вуглецеві зв'язки. Метилотрофи, з іншого боку, можуть також використовувати більш складні органічні сполуки, такі як органічні кислоти, вищі спирти, цукри і подібне. Таким чином, метилотрофні бактерії є факультативними метилотрофами. Метилотрофні бактерії включають види з родів

20 *Methylobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylophaga*, *Aminobacter*, *Methylorhabdus*, *Methylopila*, *Methylosulfonomonas*, *Marinosulfonomonas*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Ancylobacter* (також відомий як *Microcycilus*), *Thiobacillus*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*, *Acetobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Arthobacter* та *Nocardia* (Lidstrom, 2006).

Більшість метилотрофних бактерій роду *Methylobacterium* є рожево-пігментованими. Вони

25 традиційно називаються PPFM бактеріями, будучи рожево-пігментованими факультативними метилотрофами. Green (2005, 2006) виявив дванадцять перевірених видів у роді *Methylobacterium*, зокрема *M. aminovorans*, *M. chloromethanicum*, *M. dichloromethanicum*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. organophilum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. rhodinum*, *M. thiocyanatum* та *M. zatmanii*. Однак, *M. nidulans* є азотфіксуючою метилобактерією, яка не є PPFM (Sy et al., 2001). Метилобактерії є розповсюдженими в природі, зустрічаються в ґрунті, пилі, прісній воді, донних відкладеннях, на поверхні листків, а також у промислових та клінічних середовищах (Green, 2006).

30

Біотичний тиск являє собою комбінований вплив патогенів, тварин, комах і бур'янів, що призводить до щорічної втрати в 20-40 % продуктивності культур. Додаткові витрати на боротьбу зі шкідниками, зниження якості врожаю та фінансування досліджень для боротьби з цими тисками, серед інших факторів, ускладнюють точне кількісне визначення витрат, спричинених шкідниками та хворобами (Savary et al. 2012, Food Sec. DOI: 10.1007/s12571-012-0200-5). Біологічні сільськогосподарські культури є новим, захоплюючим і швидко виникаючим

40 варіантом для боротьби з шкідниками та хворобами сільськогосподарських культур таким чином, щоб доповнювати та зберігати нинішні властивості стійкості в зародкових лініях рослин, варіанти хімічного контролю та культурні практики (Schlaeppli and Bulgarelli 2015, MPMI 28(3): 212-217. DOI: 10.1094/MPMI-10-14-0334-FI).

Хвороби, викликані грибами є основною причиною втрати врожайності та якості агрономічно важливих культур, у тому числі кукурудзи, сої, пшениці, бавовни та канолі. Серед цих захворювань виду аскоміцетних грибів у родах *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium* та *Septoria* особливо поширені і сприяють значним втратам врожаю. Лише тільки види роду *Fusarium* спричинили втрати соєвих бобів у розмірі 36,2 мільйонів бушелів на рік у 1994-2010 роках (Wrather et al. 2010). Ці види викликають цілий ряд листкових, паросткових і стеблових хвороб, і, на відміну від іржі або інших захворювань, викликаних облигатними біотрофними патогенами,

50 немає повної генетичної стійкості до цих захворювань. Крім того, хімічні засоби контролю часто повинні застосовуватися в дуже точні моменти часу, щоб успішно перешкоджати прогресу хвороб, максимізуючи прибуток і захищаючи здоров'я рослин. Вузькі пороги та вікна для контролю можуть призвести до неповного або невдалого захисту рослин. Мікробні інокулянти, які можуть колонізувати з насіння і зберігатися на рослинах і в ґрунті протягом усього періоду вегетації, пропонують розширені вікна захисту, можуть компенсувати недостатність хімічного контролю і розширюють переваги фунгіциду шляхом управління опором.

55

Суть винаходу

В даному документі запропоновані композиції, що містять метилобактерію, яка інгібує ріст патогенного гриба рослин, способи застосування композицій для боротьби з інфекціями рослин, викликаними грибами, частинам рослин і рослинам, отриманим з них, і способам одержання

60

композицій. Такі метилобактерії, які інгібують ріст патогенного гриба рослин, в деяких випадках названі в цьому документі як "метилобактерія, яка інгібує патогенні гриби рослин" або, в певних контекстах, просто "Methylobacterium". У певних варіантах здійснення метилобактерію, яка інгібує ріст патогенного гриба рослин, можна відрізнити від інших метилобактерій, які не інгібують патогенні гриби рослин шляхом аналізу на здатність метилобактерії інгібувати захворювання, викликані грибами на рослині або на ізольованій частині рослини.

У даному документі представлені композиції, що містять моно- або сокультуру метилобактерії, яка інгібує ріст патогенного гриба рослин, і сільськогосподарсько прийнятний ексципієнт та/або сільськогосподарсько прийнятний ад'ювант. У певних варіантах здійснення метилобактерія має щонайменше один ген, який кодує 16S PHK, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8, або метилобактерія являє собою NLS0109 або його похідне. У певних варіантах здійснення метилобактерія має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення метилобактерія має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення метилобактерія не являє собою *M. radiotolerans* або *M. oryzae*. У певних варіантах здійснення, патогенний гриб рослини вибирають з групи, що складається з *Blumeria* sp., *Cercospora* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumanomyces* sp., *Mocrophomina* sp., *Magnaporthe* sp., *Microdochium* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenophora* sp., *Pyricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerophthora*, *Sclerospora* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Stagonospora* sp., *Stenocarpella* sp. та *Verticillium* sp. У певних варіантах здійснення *Fusarium* sp. вибирають із групи, що складається з *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium virguliforme* та *Fusarium solani*. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій композиція містить тверду речовину, до якої прикріплена монокультура або сокультура метилобактерії. У певних варіантах здійснення, патогенний гриб рослини являє собою *Rhizoctonia* sp. або *Sclerotinia* sp. У певних варіантах здійснення *Rhizoctonia* sp. являє собою *Rhizoctonia solani* або *Rhizoctonia cerealis*. У певних варіантах здійснення *Sclerotinia* sp. являє собою *Sclerotinia sclerotiorum* або *Sclerotinia homoeocarpa*. У певних варіантах здійснення композиція містить колоїд, утворений твердою речовиною, де до нього прикріплена монокультура або сокультура метилобактерії, і рідину. У певних варіантах здійснення колоїд являє собою гель. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій композиція являє собою емульсію. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій композиція додатково містить другий штам *Methylobacterium*, вибраний з NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідних або *Methylobacterium* sp., споріднених з ними. У певних варіантах здійснення похідні штамів *Methylobacterium* NLS0017, NLS0020, NLS0089 і NLS0109 або *Methylobacterium* sp., споріднених з ними можуть бути ідентифіковані в присутності одного або більше фрагментів маркера, вибраних з групи, що складається з SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37-39 або 49-51, і може бути відокремлені від інших споріднених метилобактерій методом ПЛР-аналізу з використанням специфічних аналізів для виявлення ДНК, які включають, але не обмежуються ними, комбінації ДНК-праймерів і зондів, представлені в даному документі. Використання будь-якої з вищезазначених композицій для покриття або часткового покриття частини рослини (наприклад, насіння) для інгібування росту будь-якої з вищезгаданих патогенних грибів рослин також запропоновані в даному документі.

У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій метилобактерія являє собою NLS0109 або його похідне. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, а патогенний гриб рослини являє собою *Rhizoctonia* sp. або *Sclerotinia* sp. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, а патогенний гриб рослини являє собою *Fusarium graminearum*, *Cercospora zeae-maydis* або *Colletotrichum graminicola*. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, а патогенний гриб рослини являє собою *Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Microdochium nivale*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora sojae*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*

virguliforme, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zeae* або *Pythium* spp. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення патогенний гриб рослин, який інгібується, може мати свою анаморфну форму, свою телеоморфну форму або як свою анаморфну форму, так і свою телеоморфну форму. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення композиція може містити інгібуючу гриб концентрацію моно- або сокультури метилобактерії. Використання будь-якої з вищезазначених композицій для покриття або часткового покриття частини рослини (наприклад, насіння) для інгібування росту будь-якої з вищезгаданих патогенних грибів рослин також запропоновані в даному документі.

У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, а патогенний гриб рослин являє собою *Rhizoctonia* sp. або *Fusarium* sp., а рослина являє собою кукурудзу або сою. У певних варіантах здійснення способів *Fusarium* sp. являє собою один або більше видів, вибраних з *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium virguliforme* та *Fusarium solani*, а *Rhizoctonia* являє собою *Rhizoctonia solani*. У деяких здійснення про обумовлений *Methylobacterium* sp. контроль інфекцій, викликаних грибами *Fusarium* і *Rhizoctonia* свідчить поліпшення проростання та появи насіння після застосування метилобактерії. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, а патогенний гриб рослин являє собою *Pythium* sp., а рослина являє собою кукурудзу або сою. У певних варіантах здійснення способів *Pythium* sp. являє собою один або більше видів, вибраних з *Pythium torulosum*, *Pythium oopapillum*, *Pythium sylvaticum* та *Pythium lutarium*.

У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення композиція може додатково містити фунгіцидну сполуку. У певних варіантах здійснення, фунгіцидна сполука може являти собою азол, дитіокарбамат, стробілури, феніламід, тіазол-карбоксамід, піперидиніл тіазол, ізоксазолін або бензімідазол. У деяких варіантах здійснення азол являє собою іпконазол, тебуконазол, тритіконазол, метконазол, протіконазол, триадименфон, пропіконазол і імазаліл. У певних варіантах здійснення, композиція додатково містить фунгіцид стробілури. У певних варіантах здійснення фунгіцид стробілури вибирають з групи, що складається з азоксистробіну, піраклостробіну, флуоксастробіну і трифлуксистробіну. У певних варіантах здійснення фунгіцид стробілури являє собою піраклостробін. Використання будь-якої з вищезазначених композицій для покриття або часткового покриття частини рослини (наприклад, насіння) для інгібування росту будь-якої з вищезгаданих патогенних грибів рослин також запропоновані в даному документі. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій або застосувань, комбінація метилобактерій, культур, патогенів, захворювань та/або фунгіцидних сполук є таким, як викладено в Таблиці 4.

Також запропоновані рослини або частини рослин, які, щонайменше, частково покриті будь-якою з вищезазначених композицій, що містять моно- або сокультуру метилобактерії. У певних варіантах здійснення метилобактерія має щонайменше один ген, який кодує 16S РНК, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8, або метилобактерія являє собою NLS0109 або його похідне. У певних варіантах здійснення метилобактерія має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення метилобактерія має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення щонайменше частково покрита рослина або частина рослини являє собою рослину зернових або частину рослини зернових. У певних варіантах здійснення щонайменше частково покриті зернову рослину вибирають з групи, що складається з рослин рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса і жита. У певних варіантах здійснення щонайменше частково покриті частини зернової рослини вибирають з групи, що складається з частини рослин рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса і жита. У певних варіантах здійснення щонайменше частково покрита рослина або частина рослини являє собою частину дводольної рослини. У певних варіантах здійснення, дводольна рослина або частина рослини являє собою частину рослини сої, арахісу або томата. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених рослин або частин рослин, метилобактерія в композиції була отримана з роду рослин, виду рослин, підвиду рослин або сорту рослин, що відрізняється від роду, виду, підвиду або сорту рослини або частини рослини, покритої композицією. Також запропоновані оброблені рослинні продукти, які містять визначену кількість будь-якої з метилобактерій з будь-якої з вищезазначених композицій.

Також в даному документі запропоновані способи ідентифікації композицій, включаючи, але не обмежуючись ними, зразки ґрунту, частини рослин, включаючи насіння рослин, або оброблені рослинні продукти, що містять або покриті *Methylobacterium* sp. NLS0109, NL0020, NLS0017 або NLS0089 шляхом аналізу на присутність фрагментів нуклеїнових кислот, що містять щонайменше 40, 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37-39 або 49-51 у композиціях. У певних варіантах здійснення, такі способи можуть включати піддавання зразку, що може містити *Methylobacterium* sp. NLS0109, NL0020, NLS0017 або NLS0089, техніці аналізу нуклеїнової кислоти і визначення того, що зразок містить одну або більше нуклеїнових кислот, що містять послідовність, яка щонайменше, на приблизно 50, 100, 200 або 300 нуклеотидів, ідентична безперервній послідовності в SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37-39 або 49-51, причому наявність послідовності, яка ідентична безперервній послідовності в SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37-39 або 49-51 свідчить про наявність NLS0109 (SEQ ID NO: 9-11), NL0020 (SEQ ID NO: 21-24) NLS0017 (SEQ ID NO: 37-39) або NLS0089 (SEQ ID NO: 49-51) у зразку. Такі аналізи нуклеїнових кислот включають, але не обмежуються ними, методики, засновані на гібридизації нуклеїнових кислот, полімераза ланцюгова реакція, мас-спектроскопія, виявлення на основі нанофор, аналіз розгалуженої ДНК, їх комбінації, та тому подібних. Одним з прикладів такого аналізу нуклеїнової кислоти являє собою тест на основі закритої нуклеїнової кислоти (LNA), описаний в даному документі. Такий аналіз може бути використаний для виявлення штамів *Methylobacterium*, присутніх у концентрації (КУО/г зразка), які дорівнюють 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 або більше.

В даному документі також запропоновані способи ідентифікації та/або виділення *Methylobacterium* sp. що може інгібувати ріст патогенного гриба рослин шляхом аналізу на присутність послідовностей нуклеїнових кислот, що містяться в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37-39 або 49-51 в *Methylobacterium* sp. У певних варіантах здійснення, такі способи можуть включати піддавання кандидата *Methylobacterium* sp. техніці аналізу нуклеїнової кислоти і визначення того, що зразок містить одну або більше нуклеїнових кислот, що містять послідовність, яка щонайменше, на приблизно 50, 100, 200 або 300 нуклеотидів, ідентична безперервній послідовності в SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37-39 або 49-51, причому наявність послідовності, яка ідентична безперервній послідовності в SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37-39 або 49-51 вказує на те, що кандидат *Methylobacterium* sp. є таким, що може пригнічувати ріст патогенного гриба рослин. Такі аналізи нуклеїнових кислот включають, але не обмежуються ними, методики, засновані на гібридизації нуклеїнових кислот, полімераза ланцюгова реакція, мас-спектроскопія, виявлення на основі нанофор, аналіз розгалуженої ДНК, їх комбінації, та тому подібних.

У певних варіантах здійснення метилобактерію, яка являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, використовують в будь-якій з вищезазначених композицій, їх застосування або способи для інгібування росту патогенного гриба рослин, причому застосування та/або спосіб включає контроль будь-якого з патогенів або захворювань, в будь-якій з культур, через будь-який зі способів застосування, викладених у Таблиці 3. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій, їх застосування або способи метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Fusarium graminearum*, *Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Magnaportha grisea*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Microdochium nivale*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* або *Pythium* sp., а рослина або частина рослини являє собою рослину пшениці або її частину. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій, їх застосування або способи метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Cercospora zeae-maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Gibberella zeae*, *Rhizoctonia solani*, *Stenocarpella maydis*, *Pythium* sp., *Sclerospora graminicola* або *Sclerophthora macrospora*, а рослина або частина рослини являє собою рослину кукурудзи або її частину. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій, їх застосування або способи метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora sojae*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Septoria glycines*, *Fusarium virguliforme*, *Pythium* spp., *Peronospora manshurica* або *Phytophthora sojae*, а рослина або частина рослини являє собою рослину сої або її частину.

У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій, їх застосування або способи, метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з ними, і друга метилобактерія, вибрана з NLS0020, NLS0017, NLS0089, похідного

від них або метилобактерії, спорідненої з ними, входять до складу композиції. У певних варіантах здійснення, комбінація NLS0109 з другою метилобактерією, вибраною з NLS0020, NLS0017, NLS0089, їх похідного або метилобактерії, яка споріднених з ними, яка використовується в будь-якій із згаданих вище композицій, їх застосуваннях або способах, включає будь-яку з комбінацій метилобактерій, культурних рослин, патогенів, захворювань та/або способів застосування, викладених в Таблиці 3. Наприклад, в певних варіантах здійснення, наведених у Таблиці 3, метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з ним, а друга метилобактерія являє собою NLS0020, його похідне або метилобактерію, пов'язану з ним, культурна рослина являє собою пшеницю, патоген являє собою *Fusarium graminearum*, *Septoria tritici*; *Stagonospora nodorum*, *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.*, *Blumeria graminis f. sp. tritici*, *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora tritici-repentis* або *Microdochium nivale*, а нанесення відбувається на насіння в борозні на листя, або будь-яку їх комбінацію, причому ізоляти використовують самостійно або в комбінації для будь-якого застосування, включаючи застосування NLS0020 в борозні, і застосування NLS0109 на листя. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з ним, і другу метилобактерію, вибрану з NLS0020, NLS0017, NLS0089, їх похідного або метилобактерію, що споріднена з ними, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Fusarium graminearum*, *Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp.*, *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Microdochium nivale*, *Blumeria graminis f. sp. tritici* або *Pythium sp.*, а рослина або частина рослини являє собою рослину пшениці або її частину. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з ним, і другу метилобактерію, вибрану з NLS0020, NLS0021, NLS0017, NLS0089, їх похідного або метилобактерію, що споріднена з ними, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Cercospora zeae-maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Gibberella zeae*, *Rhizoctonia solani*, *Stenocarpella maydis*, *Pythium sp.*, *Sclerospora graminicola* або *Sclerophthora macrospora*, а рослина або частина рослини являє собою рослину кукурудзи або її частину. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з ним, і другу метилобактерію, вибрану з NLS0020, NLS0064, NLS0017, NLS0089, їх похідного або метилобактерію, що споріднена з ними, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora sojae*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Septoria glycines*, *Fusarium virguliforme*, *Pythium spp.*, *Peronospora manshurica* або *Phytophthora sojae*, а рослина або частина рослини являє собою рослину сої або її частину.

У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій, їх застосування або способів, рослина або частина рослини містить інгібуючої по відношенню до гриба кількість метилобактерії. У певних варіантах здійснення інгібуюча по відношенню до гриба кількість метилобактерії, що застосовується до частини рослини (наприклад, насіння), становить від близько $1,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^4$ або $1,0 \times 10^5$ до близько $1,0 \times 10^7$ або $1,0 \times 10^8$ КУО бактерії PPFM на частину рослини (наприклад, насіння). У певних варіантах здійснення метилобактерія є гетерологічною до рослини або частини рослини. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених частин рослини частина рослини являє собою лист, стебло, квітку, корінь, бульбу або насіння.

Також запропоновані способи виготовлення будь-якої з вищезазначених композицій, що містять метилобактерію, яка інгібує ріст патогенного гриба рослин, які включають комбінування метилобактерії, яка інгібує ріст патогенного гриба рослин з сільськогосподарсько прийнятним ексципієнтом і/або сільськогосподарсько прийнятним ад'ювантом. У певних варіантах здійснення метилобактерія має: (i) щонайменше один ген, який кодує 16S РНК, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8; (ii) має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11 або (iii) має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11, або метилобактерія являє собою NLS0109 або його похідне. У певних варіантах здійснення способів *Methylobacterium sp.* вибирають з групи, що складається з *M. aminovorans*, *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans*, *M. rhodesianum*, *M. nodulans*, *M. phyllosphaerae*, *M. thiocyanatum* та *M. oryzae*. У певних варіантах здійснення способів метилобактерія не являє собою *M. radiotolerans* або *M. oryzae*. У певних варіантах здійснення способів метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів, композиція додатково містить

штам метилових бактерій NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів, метилових бактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилових бактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах здійснення, рослина або частина рослини являє собою рослину сої або частину рослини сої. У певних варіантах здійснення, рослину або частину рослини вибирають з групи, що складається з рослини або частини рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса та жита. У певних варіантах здійснення способів, патогенний грибок рослини вибирають з групи, що складається з *Blumeria* sp., *Cercospora* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumannomyces* sp., *Macrophomina* sp., *Magnaporthe* sp., *Microdochium* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenophora* sp., *Pyricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerophthora*, *Sclerosporea* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Stagonospora* sp., *Stenocarpella* sp. та *Verticillium* sp.

У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій, їх застосування або способів моно- або сокультури метилових бактерії прикріплена до твердої речовини. У певних варіантах реалізації способів метилових бактерію, яка прикріплена до твердої речовини, об'єднують з рідиною для утворення композиції, яка являє собою колоїд. У певних варіантах здійснення способів колоїд являє собою гель. У певних варіантах здійснення способів моно- або сокультури метилових бактерії, яка прикріплена до твердої речовини, забезпечують шляхом культивування метилових бактерії в присутності твердої речовини. У певних варіантах здійснення способів композиція містить емульсію. У певних варіантах здійснення способів метилових бактерію забезпечують шляхом культивування метилових бактерії в емульсії. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення патогенний грибок рослин, який інгібується, може мати свою анаморфну форму, свою телеоморфну форму або як свою анаморфну, так і телеоморфну форми. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення композиція може додатково містити фунгіцидну сполуку, вибрану з групи, що складається з азолу, дитіокарбамату, стробіліурину і бензімідазолу. У деяких варіантах здійснення азол являє собою іпконазол.

Також запропоновані способи боротьби з патогенним грибом рослин, які включають застосування будь-якої з вищезазначених композицій як першої композиції, яка містить одну або більше метилових бактерій, які інгібують ріст патогенного гриба рослин, до рослини або частини рослини, до ґрунту, де рослина вирощується до ґрунту, де розташовується частина рослини, така як насіння, або будь-якої їх комбінації, у кількості, яка забезпечує інгібування інфекції патогенним грибом рослин у рослині, частині рослини або рослині, отриманій з них, у порівнянні з інфекцією контрольної рослини, частини рослини або рослини, отриманій з них, які не отримували застосування композиції або вирощувалися в ґрунті, обробленому композицією. У певних варіантах здійснення метилових бактерія: (i) має щонайменше один ген, який кодує 16S PNH, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8; (ii) має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11 або (iii) має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11, або метилових бактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилових бактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах здійснення метилових бактерія містить у своєму геномі один або більше маркерних фрагментів, що мають послідовність SEQ ID NO: 9-11.

У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів або застосувань, застосування композиції забезпечує щонайменше 40 %, 50 %, 75 %, щонайменше 85 % або щонайменше 95 % інгібування інфекції патогенного гриба рослин в рослині, частині рослини, або рослині, отриманій з них, у порівнянні з інфекцією контрольної рослини, частини рослини або рослини, отриманій з них. У певних варіантах здійснення способів частину рослини вибирають з групи, що складається з листка, стебла, квітки, кореня, бульби і насіння. У певних варіантах здійснення способів, спосіб додатково включає етап збирання щонайменше однієї частини рослини, вибраної з групи, що складається з листка, стебла, квітки, кореня, бульби або насіння з рослини або частини рослини. У певних варіантах здійснення способів рівень мікотоксинів у частині рослини знижується на щонайменше 50 %, на щонайменше 75 %, на щонайменше 85 % або на щонайменше 95 % у порівнянні з частиною рослини, отриманою з контрольної рослини, частини рослини або рослиною, отриманою з них. У певних варіантах здійснення вищезазначених способів, спосіб додатково включає отримання оброблених харчових продуктів або кормової композиції з рослини або частини рослини. У певних варіантах здійснення вищезазначених способів рівні мікотоксинів в обробленому харчовому продукті або кормовій композиції зменшуються на щонайменше 50 %, на щонайменше 75 %, на щонайменше

85 % або на щонайменше 95 % по відношенню до обробленого харчового продукту або кормової композиції, отриманої з контрольної рослини, частини рослини або рослини, отриманої з них. У певних варіантах здійснення, на частину рослини наносять інгібуючу по відношенню до грибів кількість метилобактерії. У певних варіантах здійснення інгібуюча по відношенню до гриба кількість метилобактерії, що застосовується до частини рослини (наприклад, насіння), становить від близько $1,01 \times 10^3$, $1,0 \times 10^4$ або $1,0 \times 10^5$ до близько $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$ або $1,0 \times 10^{10}$ КУО метилобактерії на частину рослини (наприклад, насіння). У певних варіантах здійснення метилобактерія є гетерологічною до рослини або частини рослини. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів частина рослини являє собою лист, стебло, квітку, корінь, бульбу або насіння. У певних варіантах здійснення способів метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів композиція додатково містить штам метилобактерії NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У певних варіантах здійснення похідне NLS0020, NLS0017 або NLS0089 або *Methylobacterium* sp., що споріднена з ним NLS0020, NLS0017 або NLS0089, можуть бути ідентифіковані присутністю одного або більше маркерів, що мають послідовність SEQ ID NO: 21-24, 37-39 або 49-51. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів метилобактерія являє собою NLS0109 або його похідне. У певних варіантах здійснення, рослина або частина рослини являє собою рослину сої або частину рослини сої, або рослину арахісу, або частину рослини арахісу. У певних варіантах здійснення, рослину або частину рослини вибирають з групи, що складається з рослини або частини рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса та жита.

У певних варіантах здійснення способи можуть додатково включати нанесення другої композиції на ґрунт, де вирощують рослину, причому друга композиція містить штам метилобактерії NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У деяких варіантах здійснення другу композицію наносять на ґрунт у борозни з частиною рослини або з насінням, з якого вирощують рослину. У певних варіантах здійснення першу композицію наносять на листя рослини після нанесення другої композиції на ґрунт. У певних варіантах здійснення перша композиція містить NLS0109, його похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ним, а друга композиція містить штам метилобактерії NLS0020, NLS0021, NLS0017, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У певних варіантах здійснення перша композиція містить NLS0109, його похідне або *Methylobacterium* sp. споріднений з ним і фунгіцид стробілури, а друга композиція містить штам метилобактерії NLS0020, NLS0021, NLS0017, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними.

У деяких варіантах здійснення способи можуть додатково включати нанесення фунгіциду на рослину, частину рослини або ґрунт. У таких варіантах здійснення фунгіцид може застосовуватися одночасно з одним або більше з *Methylobacterium* sp. або може бути застосований як окрема композиція для рослини або частини рослини. У деяких варіантах здійснення фунгіцид являє собою стробілури, феніламід, тіазол-карбоксамід або фунгіцид піперидинілітіазол-ізоксазоліну. У певних варіантах здійснення фунгіцид стробілури вибирають з групи, що складається з азоксистробіну, піраклостробіну, флуоксастробіну і трифлюксистробіну. У певних варіантах здійснення фунгіцид стробілури являє собою піраклостробін. У певних варіантах здійснення фунгіцид являє собою металаксил, мефеноксам, етаксам або оксатіапіпролін. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів, комбінація метилобактерій, культур, патогенів, захворювань та/або фунгіцидних сполук є таким, як викладено в Таблиці 4. У певних варіантах здійснення, композиції, представлені в даному документі, або рослини, або частини рослин, оброблені композиціями, можуть додатково містити один або більше з вищезазначених фунгіцидів.

У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, а патогенний гриб рослин являє собою *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora* sp., *Septoria* sp., *Pythium* sp., *Puccinia* sp. або *Sclerotinia* sp. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Fusarium graminearum*, *Septoria tritici*, *Stagonospora nodorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Magnaporthe grisea*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Microdochium nivale*, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* або *Pythium* sp., а рослина або частина рослини являє собою рослину пшениці або її частину. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, патогенний гриб рослин, який

інгібують, являє собою *Cercospora zeae-maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Gibberella zeae*, *Rhizoctonia solani*, *Stenocarpella maydis*, *Pythium* sp., *Sclerospora graminicola* або *Sclerophthora macrospora*, а рослина або частина рослини являє собою рослину кукурудзи або її частину. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне, або метилобактерію, що споріднена з NLS0109, патогенний гриб рослин, який інгібують, являє собою *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora soja*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Septoria glycines*, *Fusarium virguliforme*, *Pythium* spp., *Peronospora manshurica* або *Phytophthora sojae*, а рослина або частина рослини являє собою рослину сої або її частину.

Також запропоновані виділені метилобактерії, які пригнічують ріст патогенного гриба рослин. У певних варіантах здійснення *Methylobacterium* sp. що інгібує ріст патогенного гриба рослин має послідовність нуклеїнової кислоти 16S, яка має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8, або метилобактерія являє собою NLS0109 або його похідне. У певних варіантах здійснення виділена метилобактерія має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення виділена метилобактерія має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення, патогенний гриб рослин вибирають з групи, що складається з *Blumeria* sp., *Cercospora* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumanomyces* sp., *Macrophomina* sp., *Magnaporthe* sp., *Microdochium* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenophora* sp., *Pyricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerophthora*, *Sclerospora* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Stagonospora* sp., *Stenocarpella* sp. та *Verticillium* sp.

У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення патогенні гриби рослин, які інгібуються, можуть мати свою анаморфну форму, свою телеоморфну форму або як свою анаморфну, так і телеоморфну форми. Застосування будь-якої з вищезазначених виділених метилобактерій для інгібування росту будь-якого з вищезазначених патогенних грибів рослини також запропоновані в даному документі. Короткий опис креслень

Супровідні креслення, які включені і є частиною опису, ілюструють певні варіанти здійснення цього винаходу. На кресленнях:

Фіг. 1 являє собою діаграму, що показує пригнічення тяжкості симптому в'янення при білій гnilі сої за рахунок NLS0109. Білі смуги являють собою середнє значення для контрольної-імітаційного контролю; сірі смуги являють собою середнє значення для всіх інокульованих рослин у кожній групі обробки. Засіб розраховують з трьох незалежних експериментів з восьми повторюваних горщиків на експеримент (n=24). Планки похибок представляють $\pm$ один SEM. Тяжкість оцінювали за шкалою 0-5, де 0=відсутність розвитку симптомів, а 5=мертва рослина.

Фіг. 2 являє собою діаграму, що показує пригнічення розвитку довжини ураження при білій гnilі сої за рахунок NLS0109. Білі смуги являють собою середнє значення для контрольної-імітаційного контролю; сірі смуги являють собою середнє значення для всіх інокульованих рослин у кожній групі обробки. Засіб розраховують з трьох незалежних експериментів з восьми повторюваних горщиків на експеримент (n=24). Планки похибок представляють $\pm$ один SEM. Довжину ураження вимірювали до найближчого міліметра, використовуючи лінійку, що тримали напроти зараженої рослини.

Фіг. 3 являє собою діаграму, що показує адитивний вплив на зниження ступеня тяжкості пізнього сірої плямистості листя у кукурудзи за рахунок застосування NLS0020 в борозні із подальшим застосуванням NLS0109 до листя. Застосування проводили під час польового сезону 2015 року на пробному майданчику в місті Бетел, штат Міссурі. NLS0020 застосовували в борозенці в кількості 1250 мл/Акр, а NLS0109 застосовували до листя в кількості 5000 мл/Акр.

Фіг. 4 являє собою лінійний графік, що показує розвиток тяжкості захворювання сірої плямистості у часі в рослинах кукурудзи, оброблених штамами PPFM, різними комерційними фунгіцидами та їх комбінаціями. Групи по десять рослин обробляли різними PPFM і фунгіцидами, що представляють собою стандартні методи лікування хвороб або альтернативні режими лікування PPFM окремо або в поєднанні зі звичайними хімічними речовинами. Дані про захворюваність і тяжкість захворювання були зібрані через 14, 21 і 28 днів після інокуляції і використані для розрахунку значень індексу захворювання $[(\text{частота} \times \text{тяжкість})/100]$.

ОПИС

Визначення

Використані в цьому документі фрази "прикріплений до них" і "прикріплений" відносяться до метилових бактерій, яка зв'язана з твердою речовиною шляхом вирощування або за рахунок попереднього вирощування на твердій речовині.

Використаний в цьому документі термін "сільськогосподарсько прийнятний ад'ювант" відноситься до речовини, що підвищує продуктивність активного агента в композиції, що містить монокультуру або сокультуру метилових бактерій для обробки рослин і/або частин рослин.

Використаний в цьому документі термін "сільськогосподарсько прийнятний ексципієнт" відноситься до по суті інертної речовини, яка може бути використана в якості розріджувача та/або носія для активного агента в композиції для обробки рослин та/або частин рослин. У певних композиціях активний агент може містити монокультуру або сокультуру метилових бактерій.

Використана в даному документі, фраза "їх похідні", коли використовується в контексті штаму метилових бактерій, або ізоляту, відноситься до будь-якого штаму або ізоляту, який отримують з даного штаму метилових бактерій. Похідні штаму метилових бактерій включають, але не обмежуються ними, варіанти штаму, отриманого шляхом відбору, варіанти штаму, вибрані за допомогою мутагенезу і селекції, варіанти штамів, отримані в результаті неселектуєючих мутацій, що виникають в результаті росту культури протягом одного або більше поколінь і генетично трансформовані штами, отримані зі штаму метилових бактерій.

Використаний в даному документі термін "метилових бактерія" відноситься до бактерій, які є факультативними метилотрофами роду *Methylobacterium*. Термін "метилових бактерія", що використовується в даному описі, таким чином, не включає види в родах *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum* та *Methylocella*, які є облигатними метанотрофами.

Використаний в даному документі, фраза "сокультура метилових бактерій" відноситься до культури метилових бактерій, що включає щонайменше два штами метилових бактерій або щонайменше два види метилових бактерій.

Використаний в даному документі, термін "сорт" відноситься до будь-якої рослини, відомої тільки в якості культурної рослини, і включає рослини, які розмножені вегетативно, рослини, які розмножені статевим шляхом, інбредні лінії і гібриди.

Використаний в даному документі, фраза "забруднюючий мікроорганізм" відноситься до мікроорганізмів у культурі, культуральній рідині, продукті культуральної рідини або композиції, яка не була ідентифікована до введення в культуру, культуральну рідину, продукт культуральної рідини або композицію.

Використаний в даному документі термін "емульсія" відноситься до колоїдної суміші двох рідин, які не змішуються, де одна рідина являє собою безперервну фазу, а інша являє собою дисперсну фазу. У певних варіантах здійснення безперервна фаза являє собою водну рідину, а дисперсна фаза являє собою рідину, яка не змішується, або частково змішується з водною рідиною.

У контексті даного опису фраза "по суті вільний від забруднюючих мікроорганізмів" відноситься до культури, культуральної рідини, продукту ферментації або композиції, де щонайменше близько 95 % мікроорганізмів присутні за кількістю або типом культури, у культуральній рідині, продукті ферментації або композиції, є бажаними метилових бактеріями або іншими бажаними мікроорганізмами попередньо визначеної ідентичності.

Використана в даному описі фраза "інгібуюча по відношенню до гриба концентрація моно- або сокультури метилових бактерій" являє собою концентрацію, яка забезпечує щонайменше 40 %, 50 %, 75 %, щонайменше 85 % або щонайменше 95 % інгібування патогенної інфекції, викликані грибом у рослині, частині рослини або рослині, отриманій з них, у порівнянні з інфекцією у контрольній рослині або частині рослини.

Використаний в даному описі, термін "гетерологічний", коли він використовується в контексті метилових бактерій, яка, щонайменше, частково покриває рослину або частину рослини, відноситься до метилових бактерій, яка природно не пов'язана з рослиною або частиною рослини того ж самого виду, що і рослина або частина рослини, яка, щонайменше, частково покрита метилових бактерією. У певних варіантах здійснення гетерологічна метилових бактерія, яка використовується, щоб, щонайменше, частково покривати рослину або частину рослини першого виду рослини, являє собою метилових бактерією, яка була виділена або може бути виділена з другого виду рослин.

Використаний у даному документі термін "нежива тверда речовина" відноситься до речовини, яка нерозчинна або частково розчинна у воді або водному розчині і яка є неживою або яка не є частиною ще живого організму, з якого вона отримана.

Використана в даному документі фраза "метилових бактерія, що споріднена з NLS0109" може посилатися на метилових бактерію, яка: (i) має, щонайменше, один ген, що кодує 16S rRNA, що має

щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8; (ii) має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11 або (iii) має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11.

Використаний в даному документі термін "монокультура метилобактерії" відноситься до культури метилобактерії, що складається з одного штаму метилобактерії.

Використаний в даному документі термін "пестицид" відноситься до агента, який є інсектицидним, фунгіцидним, нематодцидним, бактеріоцидним або будь-якою їх комбінацією.

Використана в даному документі, фраза "бактеріостатичний агент" відноситься до агентів, які інгібують ріст бактерій, але не вбивають бактерії.

Використана в даному описі фраза "пестицид, по суті, не інгібує ріст метилобактерії" відноситься до будь-якого пестициду, який, якщо він передбачений в композиції, яка містить продукт ферментації, що містить тверду речовину, де до неї прикріплена монокультура або сокультура метилобактерії, при використанні приводить до не більш ніж 50 % інгібування росту метилобактерії, коли композицію наносять на рослину або частину рослини порівняно з композицією, яка не має пестициду. У певних варіантах здійснення пестицид призводить до не більш ніж 40 %, 20 %, 10 %, 5 % або 1 % інгібування росту метилобактерій, коли композицію наносять на рослину або частину рослини порівняно з композицією, яка не має пестициду.

Використаний в даному документі термін "бактерії PPFM" відноситься без обмеження до бактеріальних видів роду *Methylobacterium*, відмінних від *M. nodulans*.

Використана в даному документі фраза "тверда речовина" відноситься до речовини, яка є нерозчинною або частково розчинною у воді або водних розчинах.

Використана в даному документі фраза "тверда фаза, яка може бути суспендована в ній" відноситься до твердої речовини, яка може бути розподілена по всій рідині шляхом перемішування.

Використаний в даному документі термін "не здатний до регенерації" відноситься до частини рослини або до обробленого рослинного продукту, який не може бути регенерований в цілу рослину.

Використана в даному документі фраза "по суті вся тверда фаза суспендована в рідкій фазі" відноситься до носія, де щонайменше 95 %, 98 % або 99 % твердої речовини (речовин), що містять тверду фазу, розподілені по всій рідині шляхом перемішування.

Використана в даному документі фраза "по суті вся тверда фаза не суспендована в рідкій фазі" відноситься до середовищ, де менше ніж 5 %, 2 % або 1 % твердої речовини у формі частинок, що розподіляється по всьому носію шляхом перемішування.

У тій мірі, в якій будь-яке з попередніх визначень суперечить визначенням, наведеним у будь-якому патентному або непатентному джерелі, яке включене в даний документ за допомогою посилання, будь-якому патентному або непатентному джерелі, процитоване в даному документі, або будь-якому патентному або непатентному джерелі, знайденому в іншому місці, мається на увазі, що в цьому документі буде використано попереднє визначення.

Метілобактерія, яка інгібує патогенні гриби рослин, композиції, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, способи їх застосування і способи виготовлення

В даному документі представлені різні метилобактерії, які інгібують патогенні гриби рослин, композиції, що містять ці метилобактерії, способи застосування композицій для інгібування патогенних грибів рослин і способи приготування композицій. Використане в даному документі інгібування росту патогенного гриба рослин включає будь-яке вимірюване зниження росту грибів, де ріст грибів включає, без обмеження, будь-яке вимірюване зменшення кількості та/або ступеня клітин, спор, конідій або міцелію грибу. Використане в даному документі інгібування інфекції патогенного грибу рослин та/або інгібування росту патогенного грибу рослин також розуміється як таке, що включає будь-яке вимірюване зниження побічних ефектів, викликаних ростом грибу у рослині. Побічні ефекти росту грибів у рослині включають, без обмежень, будь-який тип пошкодження або некрозу тканини рослин, будь-який тип зменшення врожайності рослин, будь-яке зниження вартості рослинного продукту та/або виробництво небажаних метаболітів грибів або побічних продуктів росту грибів, включаючи, але не обмежуючись ними, мікотоксини. Патогенні гриби рослин, які інгібуються композиціями і метилобактерією, представленими в даному описі, можуть бути в їх анаморфній формі, їх телеоморфній формі або в їх анаморфній і телеоморфній формах.

Метілобактерія і композиції, що її містять, які інгібують ріст патогенних грибів рослин, представлені в даному документі. У певних варіантах здійснення метилобактерія або композиція забезпечують щонайменше близько 25 %, щонайменше близько 40 %, щонайменше

близько 50 % або щонайменше близько 75 % інгібування росту патогенних грибів рослин у порівнянні з контрольною обробкою за умов впливу патогенного гриба рослин. У певних варіантах здійснення, патогенний гриб рослини, який інгібується, вибирають з групи, що складається з *Blumeria* sp., *Cercospora* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp.,

5 *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumanomyces* sp., *Macrophomina* sp., *Magnaporthe* sp., *Microdochium* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenophora* sp., *Pyricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerophthora*, *Sclerospora* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Stagonospora* sp., *Stenocarpella* sp. та *Verticillium* sp.

10 У певних варіантах здійснення патогенний гриб рослин, який інгібується являє собою *Fusarium* sp. У певних варіантах здійснення *Fusarium* sp., який інгібується, вибирають із групи, що складається з *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium virguliforme* та *Fusarium solani*. У певних варіантах здійснення виділена метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з NLS0109. У певних

15 варіантах здійснення метилобактерія, що споріднена з NLS0109, включає без обмеження, (i) *Methylobacterium* sp., який інгібує ріст патогенного гриба рослин і має ген, що кодує послідовність 16S PHK, яка має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 8; (ii) метилобактерію, яка має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300

20 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11; або (iii) метилобактерію, яка має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення композиція додатково містить штам метилобактерії NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднена з ними.

25 Патогенні гриби рослин, які інгібуються композиціями і метилобактерією, представленими в даному описі, можуть бути в їх анаморфній формі, їх телеоморфній формі або в їх анаморфній і телеоморфній формах.

Також запропоновані композиції, які містять метилобактерії, які пригнічують ріст патогенного гриба рослин. У деяких варіантах здійснення композиції додатково містять

30 сільськогосподарсько прийнятний експіцієнт та/або сільськогосподарсько прийнятний ад'ювант. У певних варіантах здійснення композиція забезпечує щонайменше близько 25 %, близько 50 % або близько 75 % інгібування росту патогенних грибів рослин у порівнянні з контрольною обробкою за умов впливу патогенного гриба рослин. У певних варіантах здійснення, патогенний гриб рослини, який інгібується, вибирають з групи, що складається з *Blumeria* sp., *Cercospora* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp.,

35 *Gaeumanomyces* sp., *Macrophomina* sp., *Magnaporthe* sp., *Microdochium* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenophora* sp., *Pyricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerophthora*, *Sclerospora* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Stagonospora* sp., *Stenocarpella* sp. та *Verticillium* sp.

40 У певних варіантах здійснення патогенний гриб рослин, який інгібується являє собою *Fusarium* sp. У певних варіантах здійснення *Fusarium* sp., який інгібується, вибирають із групи, що складається з *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium virguliforme* та *Fusarium solani*. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій композиція містить тверду речовину, до якої прикріплена монокультура або сокультура метилобактерії. У певних варіантах здійснення, в яких метилобактерія прикріплена до твердої речовини, композиція містить колоїд, утворений твердою речовиною, де до нього прикріплена монокультура або сокультура метилобактерії, і рідину. У певних варіантах здійснення колоїд являє собою гель. У певних варіантах здійснення певних вищезгаданих композицій, композиція являє собою емульсію, яка не містить твердої речовини. У певних

45 варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій, *Methylobacterium* sp., який інгібує ріст патогенного гриба рослин має ген, що кодує послідовність 16S PHK, яка має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 8. У певних варіантах здійснення будь-якої з вищезазначених композицій метилобактерія являє собою NLS0109, його похідне або метилобактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах

50 здійснення будь-якого з вищезазначених композицій, композиція додатково містить штам метилобактерії NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення, патогенні гриби рослин, які інгібують, можуть бути в їх анаморфній формі, їх телеоморфній формі або в їх анаморфній і телеоморфній формах.

55 здійснення будь-якого з вищезазначених композицій, композиція додатково містить штам метилобактерії NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення, патогенні гриби рослин, які інгібують, можуть бути в їх анаморфній формі, їх телеоморфній формі або в їх анаморфній і телеоморфній формах.

У певних варіантах здійснення *Methylobacterium* sp. які інгібують патогенні гриби рослин, можна ідентифікувати шляхом тестування нововиділеного кандидата *Methylobacterium* sp. на присутність поліморфних нуклеїнових кислот, ортологічних генів або послідовностей генів, які присутні в *Methylobacterium* sp. представлених в цьому документі, які інгібують деякі патогенні гриби рослин.

5

Різні ізоляти *Methylobacterium* sp., запропоновані в цьому документі, розкриті в таблиці 1.

Таблиця 1

Ізоляти *Methylobacterium* sp.

NLS	Походження	USDA ARS NRRL № ¹
NLS0017	Отриманий з рослини м'яти перцевої, вирощеної в окрузі Сент-Луїс Кантри, штат Міссурі, США	NRRL B-50931
NLS0020	Отриманий з рослини пасліну каролінського, вирощеної в окрузі Сент-Луїс Кантри, штат Міссурі, США	NRRL B-50930
NLS0021	Отриманий з рослини латуку, вирощеної в окрузі Сент-Луїс Кантри, штат Міссурі, США	NRRL B-50939
NLS0042	Отриманий з рослини сої, вирощеної в окрузі Сент-Луїс Кантри, штат Міссурі, США	NRRL B-50932
NLS0064	Отриманий з рослини кукурудзи, вирощеної в окрузі Сент-Луїс Кантри, штат Міссурі, США	NRRL B-50938
NLS0066	Отриманий з гібрида кукурудзи "MC534" (Masters Choice ЗОЮ State Route 146 East Anna, IL 62906)	NRRL B-50940
NLS0089	Отриманий з рослини брокколі, вирощеної в окрузі Сент-Луїс Кантри, штат Міссурі, США	NRRL B-50933
NLS0109	Отриманий з рослини <i>Yucca filamentosa</i> в Сент-Луїс Кантри, штат Міссурі, США	NRRL B-67340

¹ Номер депозиту для штаму, депонованого в КОЛЛЕКЦІЇ КУЛЬТУР СЛУЖБИ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОГО ДОСЛІДЖЕННЯ (NRRL) Національного центру досліджень сільськогосподарського використання, Служби сільськогосподарських досліджень, Міністерства сільськогосподарства США, 1815 North University Street, Пеорія, Іллінойс 61604 США за умовами Будапештського договору про міжнародне визнання родописи мікроорганізмів для цілей патентної процедури. Відповідно до 37 CFR §1.808(б), всі обмеження, які накладаються вкладником на доступ громадськості до депонованого матеріалу, будуть безповоротно скасовані після надання будь-якого патенту за цією заявкою на патент.

В даному документі також запропоновані способи для боротьби з патогенним грибом рослин, які включають застосування будь-якої з вищезазначених композицій, що містять метилобактерію, яка запропонована в даному документі, до рослини або частини рослини в кількості, яка забезпечує інгібування інфекції, викликаній патогенним грибом рослин у рослини, частини рослини, або рослини, отриманої з них, у порівнянні з інфекцією контрольної рослини, частини рослини або рослини, отриманої з них, до яких не застосовували композицію. У певних варіантах застосування композиція забезпечує щонайменше близько 40 %, щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 75 %, щонайменше близько 85 % або щонайменше близько 95 % інгібування інфекції, викликаній патогенним грибом рослин, у рослини, частини рослини, або рослини, отриманої з них, у порівнянні з інфекцією контрольної рослини, частини рослини або рослини, отриманої з них. У певних варіантах здійснення частину рослини вибирають з групи, що складається з листка, стебла, квітки, кореня, бульби і насіння. У певних варіантах здійснення, спосіб додатково включає етап збирання щонайменше однієї частини рослини, вибраної з групи, що складається з листка, стебла, квітки, кореня, бульби або насіння з рослини або частини рослини. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів, рівень мікотоксинів у частині рослини знижується на щонайменше 50 %, на щонайменше 75 %, на щонайменше 85 % або на щонайменше 95 % у порівнянні з частиною рослини, отриманою з контрольної рослини, частини рослини або рослиною, отриманою з них. У певних варіантах здійснення будь-яких з вищезазначених способів, способи додатково включають отримання оброблених харчових продуктів або кормової композиції з рослини або частини рослини. У певних варіантах здійснення вищезазначених способів рівні мікотоксинів в обробленому харчовому продукті або кормовій композиції зменшуються на щонайменше 50 %, на

щонайменше 75 %, на щонайменше 85 % або на щонайменше 95 % по відношенню до обробленого харчового продукту або кормової композиції, отриманої з контрольної рослини, частини рослини або рослини, отриманої з них. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів, композиція містить ізолят метилових бактерій NLS0109, його похідне або метилових бактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів композиція додатково містить штам метилових бактерій NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів композиція містить *Methylobacterium* sp., що споріднений з NLS0109, який: (i) має щонайменше один ген, який кодує 16S PHK, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8; (ii) має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11 або (iii) має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів композиція містить *Methylobacterium* sp., що споріднена з NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066 або NLS0089, що має щонайменше один ген, що кодує 16S PHK, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7, відповідно.

Таблиця 2

Послідовності 16S PHK штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S PHK, що кодує послідовність ДНК
NLS0017	1	ggatgatccagccgaggttccctacggctacgttggtagcattcaccacagtcgctgacccct accgtggctgcctgcctccttgcgggtggcgagcgccgtcgggtaagaccaactcccatggg gtgacggggcggtgtgtacaaggcccggaacgtattcaccgtggcatgctgatccacgattac tagcgattccgcttcatgcactcagagtgtagagtgcaatccgaactgagacggcctttgggg atttgctccagatcgctccttcgctccctcactgtcaccgcatgttagcacgtgtgtagcccatc ccgtaaggggccatgaggacttgacgtcatccacaccttcctcgcggttatcaccggcagtcctc cctagagtgcccaactgaatgatggcaactaaggacgtgggttgcgctcgttcggggacttaa cccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcagcacctgtgtgcgcccaccgaag tggaccccaaatctctctgggtaacacgccaatgtcaaaggatggttaagggttctgcggtgtctt cgaattaaaccacatgctccaccgcttgtgcggggcccccgtcaattcctttgagttttaatcttg cgaccgtactcccaggcggaatgtcaaagcgtagctgcgctactgcgggtgcaagcacccc aacagctggcattcatcgtttacggcgtggactaccagggtatctaactcgtttgtctccac gctttcgcgctcagcgtcagtaatgggtccagttggccgcttcgccaccgggtgtcttgcaat atctacgaatttcacctctacactcgcagttccaccaacctctaccatactcaagcgtccaggt atcgaaggccattctgtggttgagccacagggtttcaccgccgacttaaaacgcccctacgc gccccttacgcccagtgattccgagcaacgctagcccccttcgtattaccggcggtgctggcac gaagtttagccggggcttattcctccggtaccgtcattatcgtcccgataaaaagagctttacaa ccctaaggccttcactcactcagcgggcatgggtggatcaggccttgcgccattgtccaatattc cccactgctgcctccgtaggagctggggcgtgtctcagtcaccagtggtggtgatcatcctctc agaccagctactgatcgtcgccttggtagggcgttaccacccaactagctaatacagacggg gccgatcttcggcagtaaacctttcccaaaaaggcggtatccggtattagccctagttccca gggttattccgaaccagaaggcacgttccacgcgttactcaccggtccgcccgtgaccccgaa aaggccgctcagcttgcattgtgtaagcctgccgagcggttcgctctgagccaggatcaaaa ctctc

Послідовності 16S РНК штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S РНК, що кодує послідовність ДНК
NLS0020	2	ggatgatccagccgaggttcccctacggctaccttggtacgacttcaccccagtcgctgacct accgtggctgcctgccccttgcggttggcgagcgccgctgggtaagaccaactcccatggt gtgacgggagggtgtgtacaaggccggggaacgtattcacccgtggcatgctgatccacgattac tagcgattccgcttcatgcactcgagttgcagagtgcaatccgaactgagacggcctttgggg atttgctccagatcgctccttcgctgccactgtcaccgccattgtagcacgtgtgtagccatc ccgtaaggggccatgaggacttgacgtcatccacaccttctcgcggccttatccgggcagtcctc cctagagtgcccaactgaatgatggcaactaaggacgtgggttgcgctcgttgcgggacttaa cccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcagcacctgtgtgcgcccaccgaag tggaccccaaatctctctgggtaacacgcatgtcaaaggatggtaagggttctgcgctgtgtt cgaattaaaccacatgctccaccgcttgcggtggggcccgctcaattcctttgagtttaatttg cgaccgtactcccaggcggaatgtcaaagcggttagctgcgctactgcggtgcaagcacccc aacagctggcattcatcggttacggcggtggactaccagggtatctaactctgtttgctccccc gctttcgcgctcagcgctcagtaattggctcagttggccgcttcgcccaccgggtgtcttgcgaat atctacgaatttcacctctacactcgagttccaccaacctctaccatactcaagcgctccagt atcgaaggccattctgtggttgagccacaggtttcacccccgacttaaaacgcccctacgc gccctttacggccagtgattccgagcaacgctagcccccttcgtattaccgcggtgctggcac gaagttagccggggcttattcctcgggtaccgtcattatcgctccgggataaaagagctttacaa ccctaaggccttcacactcacgcgcatggctggatcaggttgcgcccattgtccaatattc cccactgctgcctccgtaggagctctgggcccgtgtctcagtcctcagtggtgctgatcatccttc agaccagctactgatcgctgccttggtagggcggttaccaccaccaactagctaatacagacggg gccgatcttcgggcagtaaacctttccccaaaaggcggtatccgggtattagccctagtttccca gggttattccgaaccagaaggcacgttccacgcgttactcacccgtccgctgacccgga agggcccgtcgaattgcatgtgttaagcctgcgcccagcggtcgtctgagccaggatcaaa ctctc

Послідовності 16S РНК штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S РНК, що кодує послідовність ДНК
NLS0021	3	gagtttgatcctggctcagagcgaacgctggcgccaggcttaacacatgcaagtcgaacggg cttcttcggaagtcagtgccagacgggtgagtaaacacgtgggaacgtgcccttcggttcgga taactcagggaaacttgagctaataccggatacggccttatggggaaagggttactgccgaag gatcgggcccgctctgattagcttggtgggtaaacggcctaccaaggcgacgatcagtag ctggtctgagaggatgatcagccacactgggactgagacacggcccagactcctacggagg cagcagtggggaatattggacaatggcgcaagcctgatccagccatgccgctgagtgatg aaggccttaggggtgtaaagctctttgtccgggacgataatgacgggtaccggaagaataagc ccgggctaacttcgtgccagcagccgcggttaatacgaagggggctagcgttgctcggaatca ctgggcgtaaagggcgctaggcgccgattaagtcgggggtgaaagcctgtggctcaacca cagaattgccttcgatactggttggttgagaccggaagaggacagcggaactgcgagtgta gaggtagaaattcgtagataatcgcaagaacaccagtgccgaaggcggtgtctgggtccggttc tgacgctgaggcgcaaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcc gtaaacgatgaatgccagccgttggtctgcttcagggtcagtgccgctaacgcattaagc attccgcctggggagtagcgtcgcaagattaaaactcaaaaggaattgacggggggccgcaca agcggtaggagcatgtggttaattcgaagcaacgcgcagaaccttaccatcccttgacatggc atgttacctcgagagatcggggatcctcttcggaggcggtgcacacaggtgctgcatggctgtc gtcagctcgtgctgagatgttggttaagtcggcaacgagcgcgaacccacgtccttagttg ccatcattcagttgggcactctaggagagactgccgggtgataagccggaggaagggtggat gacgtcaagtcctcatggcccttacgggatgggctacacacgtgctacaatggcggtgacagt gggacgcgaaacccgcgaggttagcaaatccccaaaagcgtctcagttcggattgcactct gcaactcgggtgcatgaaggcggaatcgctagtaatcgtggatcagcagccacgggtgaata cgttccggggccttgtaacacccggcgtcacaccatgggagttggtcttaccggacggcgctg cgccaaccgcaagggggcaggcgaccacggtaggggtcagcgactggggtgaagtcgtaaca aggtagccgtagggggaacctgcggctggatcacct

Послідовності 16S РНК штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S РНК, що кодує послідовність ДНК
NLS0042	4	ggatgatccagccgaggttcccctacggctaccttggtacgacttcaccccagtcgctgacccf accgtgggtcgctgcctccttgcggttggcgagcgccgtcggttaagaccaactcccatggt gtgacgggagggtgtgtacaaggccgggaacgtattcacctggcggtgctgatccacgattac tagcgattccgcttcacgacccgagttgcagagtgcaatccgaactgagacgggttttgggg atttgctccacctcgcggttcgctgccactgtcacggccattgtagcacgtgtgtagcccatc ccgtaagggccatgaggacttgacgtcatccacaccttcctcgcggttatcacgggcagtcctc cctagagtgcccaactgaatgatggcaactaaggacgtgggttcgctcgttcggtgacttaa cccaacatctcacgacacgagctgacgacagccatgcagcacctgtgtgacggcctccgaag aggatccccgatctctcgaggtaacatgcaatgtcaagggatggtaagggttcgcggttgctt cgaattaaaccacatgctccaccgctgtgctggggcccccgtcaattcctttgagtttaactgtg cgaccgtactccccaggcggaatgcttaatgcgttagcgcgccactgacctgcaagcagge caacggctggcattcatcgtttacggcggtgactaccagggtatctaactcgtttgtctccccac gctttcgcgctcagcgtcagaaccggaccagacagccgcttcgccaactgggtgtcttgca atatctacgaatttcacctctacactcgagttccgctgtctcttcgggtctcaagccaaccag tatcgaaggcaattctgtggttgagccacaggctttcaccccgacttaatcggtcgctacgc gccccttacgcccagtgattccgagcaacgctagcccccttcgtattacggcggtgctggcac gaagtttagccggggcttattcttcgggtaccgtcattatcgtccgggacaaaagagctttacaa ccctaaggccttcactcactcacggcgatggctggatcaggcttgcgcccattgtccaatattc cccactgctgctcccgtaggagctggggccgtgtctcagtcacagtggtgctgatcatcctctc agaccagctactgatcgtcgcttggtagggcgttaccacccaacaagctaatacagacggg gccgatccttcggcagtaaacctttcccaaaaaggcgatccgggtattagctcaagtttccct gagttattccgaaccgaagggtacgttccacgtgttactcacccgtctgccactgacaccgga aggtgccggttcgacttgcattgtttaagcctgccgccagcggttcgctctgagccaggatcaaa ctctc

Послідовності 16S РНК штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S РНК, що кодує послідовність ДНК
NLS0064	5	ggatgatccagccgagggttccctacggctaccttggtacgacttcaccccagtcgctgacct accgtggctgcctgccctccagtcgagcaagctcgatttggtggcgagcgccgtcgggtaag accaactcccattgggtgacgggcggtgtgtacaaggccgggaacgtattaccgtggcatg ctgatccacgattactagcgattccgccttcattgcacgaggttgacgctgcaatccgaactg agacggcctttggagattggctccgggtcacccttcgctgccactgtcaccgccattgtagc acgtgtgtagcccatcccgttaagggccatgaggacttgacgtcatccacaccttcctcgggct tatcaccggcagtcctccatagagtgcacaaacaaatgatggcaactaaggacgtgggttgcgc tcgttgcgggacttaacccaacatctcacgacacgagctgacgacgccatgcagcacctgtg tcgctgccccgaaggggacctggaatctctccagtaacacgccatgtcaaaggatggtaa gggtctgctgcttgccttgaattaaaccacatgctccaccgcttgcggggccccgtcaattcc tttgagtttaattcttgcgaccgtactccccaggcggaatgcttaattgcttagctgcgctactg cgggtgcatgcacccaacagctagcattcatcgtttacggcgtggactaccagggtatctaac ctgtttgctccccacgctttcgcgcctcagcgtcagtaatggtccagttggcgcccttcgccacc gggtgtcttgcgaatatctacgaatttcacctctacactcgcagttccaccaacctctaccatac tcaagcgtccagtalcgaaaggccattctgtggttagccacaggtttcaccgccgacttaaa acgcgcctacgcgcctttacgccagtgattccgagcaacgctagcccccttcgtattaccg cggctgctggcacgaagtagccggggcttattcctccggtaccgtcattatcgtccggagaa aagagctttacaaccctaaggcgtcatcactcacgaggcatggctggatcaggcttgcgcc attgtccaatattcccactgctgcctccgtaggagctctgggctgtctcagtcacagtggtg ctgatcatctctcagaccagctactgatcgtcgcttggttaggcccgttaccacccaacaagc taatcagacgcgggcccgtatcctccggcagtaaacctttctgccaagcacgtatccggtatta gccctagtttccagggttatccagaccggaggggcacgttcccaegtggtactcaccgctctg ccactcaccttgcgggtgcgttcgacttgcattgtgttaagcctgccgccagcgttcgctctgagcc aggatcaaactctc

Послідовності 16S РНК штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S РНК, що кодує послідовність ДНК
NLS0066	6	gagtttgatcctggcicagagcgaacgctggcggcaggcttaacacatgcaagtcgaacgca ccgcaagggtgagtgaggcagacgggtgagtaaacacgtgggaacgtgccctccggctctgggataa ccctgggaaactagggctaataccggatacgtgctttggcagaaagggttactgccggaggat cggcccgcgtctgattagcttggtgggtaaacggcctaccaaggcgacgatcagtagctg gtctgagaggatgatcagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggca gcagtggggaatattggacaatgggcgcaagcctgatccagccatgccgctgagtgatgac ggccttaggggtgtaaagctctttctcgggacgataatgacggtaaccggagggaataagccc cggctaacttcgtgccagcagccgcggaataacgaagggggctagcgttgctcggaatcactg ggcgtaaagggcgctaggcggttttaagtcgggggtgaaagcctgtggctcaaccacag aatggccttcgatactgggacgcttgagtaggtgaggggtgggaactgcgagtgtagagg tgaaattcgtagatattcgcaagaacaccgggtggcgaaggcgccaactggaccattactga cgtgagggcgcaaaagcggtgggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgta cgtcaagtcctcatggcccttacgggatgggctacacacgtgctacaatggcggtgacagtg gacgcgaaggggtgacccggagccaatctccaaaagccgtctcagttcggattgcacgctgc aactcgcgtgcatgaaggcggaatcgctagtaaatcggtggatcagcatgccacgggtgaatacg ttccgggcttgtagacacccgctcacaccatgggagttggcttaccgacggcgctgcg ccaaccaaatcgagcttgctcgactggaggcaggcgaccacggtaggggtcagcgactgggg gaagtcgtaacaaggtagccgtaggggaacctgcggctggatcacctc aacgatgaatgctagctgttgggggtgcatgcaccgcagtagcgagctaaccgattaagcatt ccgctggggagtagggcgcgaagattaaaactcaaaggaattgacggggggcccgacaaag cgggtggagcatgtggttaattcgaagcaacgcgcagaaccttaccatccttgacatggcgt gttactgggagagattccagggtcccttcggggggcgcgacacagggtgctgcatggctgtcgt cagctcgtgctgagatgttgggttaagtcggcaacgagcgcaaccacgtccttagttgcc atcatttgggtgggcactctagggagactgccgggtgataagccgcgagggaagggtgagatga

Послідовності 16S РНК штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S РНК, що кодує послідовність ДНК
NLS0089	7	gagtttgatcctggctcagagcgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgaacggg cttcttcggaagtcagtgccagacgggtgagtaaacacgtgggaacgtgcccttcgggttcgga taactcagggaacttgagctaataccggatagcccttacggggaaagggttactgccgaa ggatcgcccgctgctgattagcttggtgggtgggttaacggcctaccaaggcgacgatcagta gctggctgagaggatgatcagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggag gcagcagtggggaatatgtggacaatgggcgcaagcctgatccagccatgcccgctgagtgat gaaggccttaggggtgtaaaagctctttgtccgggacgataatgacggtaccggaagaataag ccccggctaacttcgtgccagcagccgcgtaatacgaagggggctagcgttgctcggaatc gtcagctcgtgctgagatgttgggttaagtcggcaacgagcgcaaccacgctcctagttg ccatcattcagttgggacactctagggagactgccgggtgataagccgaggaagggtggat gacgtcaagtcctcatggcccttacgggatgggctacacacgtgctacaatggcggtgacagt gggacgcgaaacccgaggggtgagcaaatcccaaaagcgtctcagttcggttgacactct gcaactcgggtgcatgaaggcggaatcgctagtaatcggtgacgacgccacgggtgaata cgttcccgggccttgtagacacaccgcccgtcacaccatgggagttggcttaccgacggcgctg cgccaaccgcaagggggcaggcgaccacggtaggggtcagcgactgggggtgaagtcgtaaca aggtagccgtaggggaaacctgcggctggatcacct actgggcgtaaaggcgcgtagggcgccgattaagtcgggggtgaaagcctgtggctcaacc acagaattgccttcgatactgggtgggtgagaccggaagaggacagcggaaactgcgagtg agagggtgaaattcgtagatattcgcaagaacaccagtgggcgaaggcggtgctgtggtccggt ctgacgctgaggcgcgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcc gtaaacgatgaatgccagccgttggctgcttgagggtcagtgccgctaacgcattaagc attccgctggggagtaggctcgcaagattaaaactcaaagggaattgacggggggccgcaca agcgggtggagcatgtggttaattcgaagcaacgcgcagaaccttaccatcccttgacatggc atgttacctcgagagatcggggatcctcttcggaggcgtgcacacagggtgctgcatggctgtc

Послідовності 16S РНК штамів метилових бактерій

NLS	SEQ ID NO	16S РНК, що кодує послідовність ДНК
NLS0109	8	ggatgatccagccgcaggttccctacggctaccttggtacgacttcaccccagtcgctgacct accgtgggtcgctgctcccttgcgggtcgccgcagcgcgcgtcgggtaagaccaactcccatg gtgtgacgggcgggtgtgtacaaggcccggaacgtattcaccgtggcatgctgatccacgatt actagcgattccgcttcacgactcaggttgagagtgcaatccgaactgagacggcttttgg agatttgcttgcctcgcgggttcgctccactgtcaccgcccattgtagcagtggttagccca tccgtaaggccatgaggacttgacgtcatccacaccttctcgcggcttatcaccggcagtc tccccagagtgcccaactgaatgatggcaactgaggacgtgggttgctcgctcggtgcgggactt aaccacaacatctacgacacgagctgacgacagccatgcagcacctgtgtgcgcgtccgga aggagaccgtggatctctccagtaacacgcatgtcaaaggatggtaagggttctgcgcttg cttcgaattaaaccacatgctccaccgcttgcggggcccccgtcaattcctttgagtttaactt tgcgaccgtactccccaggcggaatgctcaaagcggttagctgcgcccactgagagggaagccc cccaacggctggcattcatcggttacggcggtgactaccagggtatctaactcgtgttgcctccc acgcttgcgcctcagcgtcagtgctcggaacaggttggccgcttcgccaccgggtgttcttgcg aatactacgaatttcacctctacactcgcaggttcaccaacctcttcggaactcaagtctcca gtatcgaaggcaattctgtggttgagccacaggcttccaccccgacttaaaagaccgcctac gcgccccttacgcccagtgattccgagcaacgctagcccccttcgtattaccgcggctgctggc acgaagttagccggggcttattcctccggtaccgtcattatcgtccgggataaaagagctttac aaccctaaggccttcactcactcagcggcatggctggatcaggcttgcgccattgtccaatat tccccactgctgctcccgtaggagctggggccgtgtctcagtcaccagtggtgctgatcctc tcagaccagctactgatcgtcgccttggtaggcccgttaccaccaccaactagctaatacagacgc gggcccgatcttcgggcagtaaaccttccccaaaaggcggtatccgggtattagctcaagttcc ctgagttattccgaaccagaaggcacgttcccacgcgttaccacccgtccgccgtgacacc gaagtgcgcgtcgaacttgatgtgttaagcctgccgccagcgttcgtctgagccaggatca aactctc

Також запропоновані способи одержання композицій, прийнятних для боротьби з патогенними грибами рослин, які включають комбінування метилових бактерії, яка інгібує ріст патогенного гриба рослин, з сільськогосподарсько прийнятним ексципієнтом та/або сільськогосподарсько прийнятним ад'ювантом. У певних варіантах здійснення способів метилових бактерія не являє собою *M. radiotolerans* або *M. oryzae*. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів композиція містить *Methylobacterium* sp., що споріднений з NLS0109, який має: (i) щонайменше один ген, який кодує 16S РНК, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8; (ii) в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11 або (iii) у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів, композиція містить ізолят метилових бактерії NLS0109, його похідне або метилових бактерію, що споріднена з NLS0109. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів композиція додатково містить штам метилових бактерії NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними. У певних варіантах здійснення способів композиції забезпечують щонайменше близько 25 %, щонайменше близько 50 % або, щонайменше близько 75 %

інгібування росту патогенних грибів рослин у порівнянні з контрольною композицією, що не містить метилобактерії, яка інгібує патогенний гриб рослин після обробки патогенного гриба рослин. У певних варіантах здійснення способів, патогенний гриб рослини вибирають з групи, що складається з *Bliteria* sp., *Cercospora* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp.,

5 *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumanomyces* sp., *Macrophomina* sp., *Magnaporthe* sp., *Microdochium* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenophora* sp., *Pyricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerophthora*, *Sclerospora* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Stagonospora* sp., *Stenocarpella* sp. та *Verticillium* sp.

10 У певних варіантах здійснення способів *Fusarium* sp. вибирають із групи, що складається з *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* та *Fusarium solani*. У певних варіантах здійснення способів метилобактерія прикріплена до твердої речовини. У певних варіантах реалізації способів метилобактерію, яка прикріплена до твердої речовини, об'єднують з рідиною для утворення композиції, яка являє собою колоїд. У певних варіантах здійснення

15 способів колоїд являє собою гель. У певних варіантах здійснення способів метилобактерію, яка прикріплена до твердої речовини, забезпечують шляхом культивування метилобактерії в присутності твердої речовини. У певних варіантах здійснення способів композиція містить емульсію. У певних варіантах здійснення способів метилобактерію забезпечують шляхом культивування метилобактерії в емульсії. У певних варіантах здійснення будь-якого з

20 вищезазначених способів патогенний гриб рослин являє собою *Fusarium* sp. та/або рослина являє собою злакову рослину. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів патогенний гриб рослин являє собою *Fusarium* sp., а рослина являє собою злакову рослину, вибрану з групи, що складається з рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса і жита. У певних варіантах здійснення будь-якого з вищезазначених способів

25 патогенний гриб рослин являє собою *Fusarium graminearum*, а рослина являє собою злакову рослину, вибрану з групи, що складається з рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса і жита. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення патогенні гриби рослин, які інгібуються, можуть мати свою анаморфну форму, свою телеоморфну форму або як свою анаморфну, так і телеоморфну форми.

30 Було встановлено, що способи, в яких культивують метилобактерію в двофазних середовищах, що містять рідку фазу, і тверду речовину, суттєво збільшують отриманий вихід метилобактерії у порівнянні зі способами, в яких метилобактерію культивують тільки в рідких середовищах. У певних варіантах здійснення способи можуть включати вирощування метилобактерії в рідких середовищах з подрібненою твердою речовиною, яка може бути

35 суспендована в рідині шляхом перемішування в умовах, що забезпечують ріст метилобактерії. У деяких варіантах здійснення, в яких використовують тверді речовини у вигляді частинок, щонайменше, практично вся тверда фаза може бути тим самим суспендована в рідкій фазі при перемішуванні. Такі подрібнені тверді речовини можуть містити матеріали, які мають довжину або діаметр близько 1 міліметра або менше. У певних варіантах здійснення ступінь

40 перемішування є достатньою для забезпечення рівномірного подрібнених твердих речовин у рідкій фазі та/або оптимального рівня аерації культури. Однак, в інших варіантах здійснення, представлених в даному документі, щонайменше практично всю тверду фазу не суспендують в рідкій фазі, або частину твердої фази суспендують в рідкій фазі, а частину твердої фази не суспендують в рідкій фазі. Неподрібнені тверді речовини можуть бути використані в певних

45 двофазних середовищах, в яких тверду фазу не суспендують в рідкій фазі. Такі неподрібнені тверді речовини включають, але не обмежуються ними, матеріали, які мають довжину або діаметр більше ніж близько 1 міліметр. Такі подрібнені та неподрібнені тверді речовини також включають, але не обмежуються ними, матеріали, які є пористими, волокнистими або іншим чином сконфігуровані для забезпечення підвищеної площі поверхні для прикріпленого росту

50 метилобактерії. Двофазні середовища, в яких частини твердої фази суспендовані в рідкій фазі, і частини твердої фази не суспендовані в рідкій фазі, можуть містити суміш подрібнених та неподрібнених твердих речовин. Такі подрібнені та неподрібнені тверді речовини також включають, але не обмежуються ними, матеріали, які є пористими, волокнистими або іншим чином сконфігуровані для забезпечення підвищеної площі поверхні для прикріпленого росту

55 метилобактерії. У деяких варіантах здійснення носій містить колоїд, утворений твердою і рідкою фазою. Колоїд, що містить тверду речовину і рідину, може бути попередньо сформований і доданий до рідких середовищ або може бути сформований у середовищах, що містять тверду речовину і рідину. Колоїди, що містять тверду речовину і рідину, можуть бути утворені шляхом

60 піддавання певних твердих речовин хімічним та/або тепловим змінам. У певних варіантах здійснення колоїд являє собою гель. У деяких варіантах здійснення рідка фаза середовища

являє собою емульсію. У певних варіантах здійснення емульсія містить водну рідину і рідину, яка не змішується, або тільки частково змішується, у водній рідині. Рідини, що не змішуються, або тільки частково змішуються, у воді включають, але не обмежуються ними, будь-яку з наступного: (1) рідини, що мають змішуваність у воді, що дорівнює або менше, ніж така у пентанолу, гексанолу або гептанолу при 25 °C; (2) рідини, що включають спирт, альдегід, кетон, жирну кислоту, фосфоліпід або будь-яку їх комбінацію; (3) спирти, які вибирають з групи, що складається з аліфатичних спиртів, що містять щонайменше 5 атомів вуглецю і стеринів; (4) жири тваринного походження, жири мікробного походження, синтетичні жири, рослинні жири або їх комбінації та/або, (5) рослинна олія, вибрана з групи, що складається з олій кукурудзи, сої, бавовни, арахісу, соняшнику, оливи, льону, кокосу, пальми, ріпаку, кунжуту, сафлору і їх комбінацій. У певних варіантах здійснення, рідини, які не змішуються або частково не змішуються можуть містити від щонайменше близько 0,02 % до близько 20 % рідкої фази за масою. У певних варіантах здійснення способи можуть включати отримання двофазного культурального середовища, що містить рідину, тверду речовину і метилобактерію, і інкубування культури в умовах, що забезпечують зростання метилобактерії. Двофазні культуральні середовища, що містять рідину, тверду речовину і метилобактерію, можуть бути отримані різними способами, які включають, але не обмежуються, будь-яке з: (a) інокуляцію двофазних середовищ, що містять рідину і тверду речовину з метилобактерією; (b) інокуляцію твердої речовини метилобактерією, а потім введення твердої речовини, що містить метилобактерію, в рідке середовище; (c) інокуляцію твердої речовини метилобактерією, інкубування метилобактерії на твердій речовині, а потім введення твердої речовини, що містить метилобактерію, в рідке середовище; або (d) будь-яку комбінацію (a), (b) або (c). Способи і композиції для вирощування метилобактерії в двофазних середовищах, що містять рідину і тверду речовину, розкриті у спільній публікації заявки на патент США № 20130324407, яка повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

Було також встановлено, що способи, в яких культивується метилобактерія в середовищі, що містить емульсію, значно збільшують результуючий вихід метилобактерії у порівнянні зі способами, в яких метилобактерія культивується тільки в рідких середовищах. У певних варіантах здійснення способи створення композицій, представлених в даному документі, можуть включати вирощування метилобактерії в емульсії в умовах, що забезпечують зростання метилобактерії. Середовища, що включають емульсію і метилобактерію, можуть бути отримані різними способами, які включають, але не обмежуються ними, будь-який з: (a) інокуляцію метилобактерією середовища, що містить емульсію; (b) інокуляцію водної рідини метилобактерією, введення неводної рідини і змішування з утворенням емульсії; (c) інокуляцію водної рідини метилобактерією, введення неводної рідини і змішування з утворенням емульсії; або (d) будь-яку комбінацію (a), (b) або (c). У певних варіантах здійснення емульсія містить водну рідину і рідину, яка не змішується, або тільки частково змішується, у водній рідині. Неводні рідини, що не змішуються, або тільки частково змішуються, у воді включають, але не обмежуються ними, будь-яку з наступного: (1) рідини, що мають змішуваність у воді, що дорівнює або менше, ніж така у n-пентанолу, n-гексанолу або n-гептанолу при 25 °C; (2) рідини, що включають спирт, альдегід, кетон, жирну кислоту, фосфоліпід або будь-яку їх комбінацію; (3) спирти, які вибирають з групи, що складається з аліфатичних спиртів, що містять щонайменше 5, 6 або 7 атомів вуглецю і стеринів; (4) жири тваринного походження, жири мікробного походження, синтетичні жири, рослинні жири або їх комбінації та/або, (5) рослинна олія, вибрана з групи, що складається з олій кукурудзи, сої, бавовни, арахісу, соняшнику, оливи, льону, кокосу, пальми, ріпаку, кунжуту, сафлору і їх комбінацій. У певних варіантах здійснення, неводні рідини, які не змішуються або частково не змішуються можуть містити від щонайменше близько 0,02 % до близько 20 % емульсії за масою. У певних варіантах здійснення, неводний розчин, який не змішується або частково не змішується може містити, від щонайменше, близько будь-якого з 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % або 1 % до близько 3 %, 5 %, 10 % або 20 % емульсії за масою. Способи і композиції для вирощування метилобактерії в середовищах, що містять емульсію, розкриті в спільній заявці на патент США №14/894568, що подана 30 травня 2014 року, яка повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

У певних варіантах здійснення культуральне середовище, продукт культурального середовища або композиції, які містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, можуть додатково містити один або більше введених мікроорганізмів з попередньо визначеною ідентичністю, відмінних від метилобактерії. Інші мікроорганізми, які можуть бути додані, включають, але не обмежуються ними, мікроорганізми, які є біопестицидними або забезпечують деякі інші переваги при застосуванні до рослини або частини рослини. Біопестицидні або інакше корисні мікроорганізми, таким чином, включають, але не обмежуються

ними, пізні *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Coniothyrium* sp., *Pantoea* sp., *Streptomyces* sp. та *Trichoderma* sp., а також біоінокулянти для поліпшення фіксації азоту, включаючи види ризобії, такі як з *Rhizobium* або *Brady rhizobium*. Мікробні біопестициди можуть походити від бактерій, грибів, вірусів або найпростіших. Особливо корисні біопестицидні мікроорганізми включають

5 різні штами *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas syringae*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens* та *Streptomyces lydicus*. Інші мікроорганізми, які додають, можуть бути генетично сконструйованими або ізолятами, які доступні як чисті культури. У певних варіантах здійснення передбачається, що бактеріальний або грибний

10 мікроорганізм може бути наданий у культуральну рідину, продукт культуральної рідини або композицію у формі спори.

У певних варіантах здійснення, рідке культуральне середовище готують з недорогих і легкодоступних компонентів, включаючи, але не обмежуючись ними, неорганічні солі, такі як фосфат калію, сульфат магнію і тощо, джерела вуглецю, такі як гліцерин, метанол, глутамінова кислота, аспарагінова кислота, бурштинова кислота тощо, і амінокислотні суміші, такі як пептон,

15 триптон і подібні. Приклади рідких середовищ, які можна використовувати, включають, але не обмежуються ними, середовище на основі амонійних мінеральних солей (AMS) (Whittenbury et al., 1970), мінімальне культуральне середовище Фогеля-Бонера (VB) (Vogel and Bonner, 1956) та бульон LB ("бульон Лурія-Бертані").

В даному документі запропоновані продукти ферментації та композиції з моно- або сокультурами метилових бактерій, які інгібують патогенні гриби рослин при титрі більше, ніж близько 5×10^7 колонієутворюючих одиниць на мілілітр, при титрі більше, ніж близько 1×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр, при титрі більше, ніж близько 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр, при титрі більше, ніж близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на мілілітр, при титрі більше, ніж близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр, при титрі більше,

20 ніж близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, можуть містити метилову бактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 5×10^7 , 1×10^8 або 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр, від щонайменше близько 5×10^8

25 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 4×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр або від щонайменше близько 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, можуть містити метилову бактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 3×10^{10}

30 колонієутворюючих одиниць на мілілітр, від щонайменше близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 4×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр або від щонайменше близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, будуть містити метилову бактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр, від щонайменше близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 4×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр або від щонайменше

35 близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, будуть містити метилову бактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 4×10^{10} або від щонайменше

40 близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр. У будь-якому з вищезазначених продуктів ферментації або композицій зазначені концентрації можуть являти собою концентрації, що інгібують гриб. У будь-якому з вищезгаданих продуктів ферментації або композицій продукти ферментації або композиції можуть бути по суті вільними від забруднюючих мікроорганізмів, можуть містити метилову бактерію, яка прикріплена до та/або пов'язана з матеріалами, які не прикріплені до

45 метилових бактерій та/або пов'язані з нею в природних умовах, або будь-яку їх комбінацію.

В даному документі запропоновані продукти ферментації та композиції з метилових бактерій, які інгібують патогенні гриби рослин при титрі більше, ніж близько 5×10^7 , 1×10^8 або 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на грам, при титрі більше, ніж близько 1×10^9 колонієутворюючих

одиниць на грам, при титрі більше, ніж близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам, при титрі більше, ніж близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, можуть містити метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 5×10^7 , 1×10^8 або 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам, від щонайменше близько 5×10^7 , 1×10^8 або 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 4×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам або від щонайменше близько 5×10^7 , 1×10^8 або 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, можуть містити метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам, від щонайменше близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 4×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам або від щонайменше близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, будуть містити метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам, від щонайменше близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 4×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам або від щонайменше близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам. У певних варіантах здійснення продукти ферментації і композиції, запропоновані в цьому документі, будуть містити метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 4×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам або від щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на грам до щонайменше близько 6×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} або 5×10^{13} колонієутворюючих одиниць на грам. У будь-якому з вищезазначених продуктів ферментації або композицій продукт ферментації або композиція може містити моно- або сокультуру метилобактерії, яка приєднана до твердої речовини. У будь-якому з вищезазначених продуктів ферментації або композицій зазначені концентрації можуть являти собою концентрації, що інгібують гриб. У будь-якому з вищезазначених продуктів ферментації або композицій зазначені концентрації можуть являти собою концентрації, що інгібують гриб. У будь-якому з вищезгаданих продуктів ферментації або композицій продукти ферментації або композиції можуть бути по суті вільними від забруднюючих мікроорганізмів, можуть містити метилобактерію, яка прикріплена до та/або пов'язана з матеріалами, які не прикріплені до метилобактерії та/або пов'язані з нею в природних умовах, або будь-яку їх комбінацію.

Метилобактерія, яка інгібує патогенні гриби рослин, може бути отримана, оскільки продукти ферментації можуть бути використані для виготовлення різних композицій, корисних для лікування рослин або частин рослин для інгібування інфекції патогенними грибами рослин. Альтернативно, композиції, запропоновані в даному документі, що містять тверді речовини з метилобактерією, які інгібують патогенні гриби рослин або прикріплена метилобактерія, які інгібує патогенні гриби рослин, можуть використовуватися для обробки рослин або частин рослин. Таким чином, запропоновані рослини, частини рослин і, зокрема, насіння рослин, які були щонайменше частково покриті продуктами культуральної рідини або композиціями, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин. Також запропоновані оброблені рослинні продукти, які містять продукти культуральної рідини або композиції з метилобактеріями, які інгібують патогенні гриби рослини або прикріплена метилобактерія, яка інгібує патогенні гриби рослин. Метилобактерія, яка інгібує патогенні гриби рослин, може бути використана для виготовлення різних композицій, які особливо корисні для обробки насіння рослин. Таким чином запропоноване насіння, яке було щонайменше частково покрито продуктами культуральної рідини або композиціями. Також запропоновані продукти обробленого насіння, включаючи, але не обмежуючись ними, борошно грубого помелу, борошно, корм і пластівці, які містять продукти культуральної рідини або композиції, запропоновані в даному документі. У певних варіантах здійснення, перероблений рослинний продукт не буде здатним до регенерації (тобто не буде здатний до розвитку в рослину). У певних варіантах здійснення продукт культуральної рідини або композиція, яка щонайменше частково покриває рослину, частину рослини або насіння рослини, або яка міститься в

обробленій рослині, частині рослини або насіннєвому продукті, містить метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, які можуть бути легко ідентифіковані шляхом порівняння обробленої і необробленої рослини, частини рослини, насіння рослини або їх обробленого продукту. У певних варіантах здійснення ідентифікацію здійснюють шляхом визначення, чи продукт ферментації або композиція, яка, щонайменше, частково покриває рослину, частину рослини або насіння рослини або яка міститься в обробленій рослині, частині рослини або насіннєвому продукті, містить *Methylobacterium* sp., що споріднений з NLS0109, що: (i) має щонайменше один ген, який кодує 16S PHK, що має щонайменше 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8; (ii) має в своєму геномі один або більше фрагментів маркерних полінуклеотидів зі щонайменше 50, 60, 100, 120, 180, 200, 240 або 300 нуклеотидів SEQ ID NO: 9-11 або (iii) має у своєму геномі один або більше фрагментів маркерів, що містять послідовність, що має щонайменше 98 %, 99 % або 99,5 % ідентичності послідовності по всій довжині SEQ ID NO: 9-11. Аналогічні аналізи послідовності 16S PHK можуть бути проведені для визначення того, чи продукт ферментації або композиція, яка щонайменше частково покриває рослину, частину рослини або насіння рослин, або яка міститься в обробленій рослині, частині рослини або продукті насіння, додатково містить NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідне або *Methylobacterium* sp., що споріднений з ними.

Композиції, придатні для лікування рослин або частин рослин, які містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, або тверду речовину з прикріпленими метилобактеріями, які інгібують патогенні гриби рослин, емульсії, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, або їх комбінації, можуть також містити сільськогосподарсько прийнятний ад'ювант або сільськогосподарсько прийнятний ексципієнт. Сільськогосподарсько прийнятний ад'ювант або сільськогосподарсько прийнятний ексципієнт зазвичай є інгредієнтом, який не викликає надмірної фітотоксичності або інших несприятливих ефектів при дії на рослину або частину рослини. У певних варіантах здійснення тверда речовина сама може являти собою сільськогосподарсько прийнятний ад'ювант або сільськогосподарсько прийнятний ексципієнт доти, поки вона не є бактеріоцидною або бактеріостатичною до метилобактерії. В інших варіантах здійснення композиція додатково містить щонайменше один із сільськогосподарсько прийнятних ад'ювантів або сільськогосподарсько прийнятних ексципієнтів. Будь-яка з вищезазначених композицій також може додатково містити пестицид. Пестициди, що використовуються в композиції, включають, але не обмежуються ними, інсектицид, фунгіцид, нематодцид і бактеріоцид. У певних варіантах здійснення пестицид, який використовується в композиції, являє собою пестицид, який істотно не інгібує ріст метилобактерії. Оскільки метилобактерії є грамнегативними бактеріями, відповідні бактеріоциди, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ними, бактеріоциди, які проявляють активність проти грамполозитивних бактерій, але не грамнегативних бактерій. Композиції, представлені в цьому документі, можуть також включати бактеріостатичний агент, який істотно не інгібує ріст метилобактерії. Бактеріостатичні агенти, придатні для використання в композиціях, представлених в даному документі, включають, але не обмежуються ними, ті, які проявляють активність проти грамполозитивних бактерій, але не грамнегативних бактерій. Будь-яка з вищезазначених композицій може також являти собою по суті сухий продукт (тобто має близько 5 % або менше вмісту води), суміш композиції з емульсією або суспензією.

Сільськогосподарсько прийнятні ад'юванти, що використовуються в композиціях, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, емульсіях, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, або їх комбінаціях, включають, але не обмежуються ними, компоненти, які підвищують ефективність продукту і/або продукти, що підвищують легкість застосування продукту. Ад'юванти, які підвищують ефективність продукту, можуть включати різні змочувачі/розподілювачі, які сприяють адгезії і поширенню композиції на частинах рослин, прилипачі, які сприяють адгезії до частини рослини, речовини, які підвищують проникність, подовжувачі і зволожувачі, які збільшують щільність або час сушіння розпиленних композицій. Змочувачі/розподілювачі, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ними, неіонні поверхнево-активні речовини, аніонні поверхнево-активні речовини, катіонні поверхнево-активні речовини, амфотерні поверхнево-активні речовини і/або підкислені поверхнево-активні речовини. Прилипачі, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ними, речовини на основі латексу, терпену/пінолену і речовини на основі піролідону. Речовини, які підвищують проникність можуть включати мінеральну олію, рослинну олію, етерифіковану рослинну олію, органо-силікатні поверхнево-активні речовини і підкислені поверхнево-активні речовини. Подовжувачі, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ними, сульфат амонію або речовини на основі ментену.

Зволожувачі, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ними, гліцерин, пропіленгліколь і діетиловий гліколь. Ад'юванти, які поліпшують зручність застосування продукту, включають, але не обмежуються ними, підкислюючі/буферні агенти, анти-піноутворюючі/де-піноутворюючі агенти, агенти сумісності, дрейф-знижуючі агенти, барвники і кондиціонери для води. Анти-піноутворюючі/де-піноутворюючі агенти, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ними, диметополісилоксан. Агенти сумісності, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ним, сульфат амонію. Дрейф-знижуючі агенти, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ними, поліакриламід та полісахариди. Кондиціонери для води, що використовуються в композиціях, можуть включати, але не обмежуються ним, сульфат амонію.

Способи обробки рослин та/або частин рослин культуральною рідиною, продуктами культуральної рідини та композиціями, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, або їх комбінаціями, також запропоновані в даному документі. Рослини, які можуть бути оброблені, а також частини рослин, які можуть бути оброблені, отримані з них, включають, але не обмежуються ними, кукурудзу, *Brassica* sp. (наприклад, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), люцерну, рис, жито, сорго, просо (наприклад, просо африканське (*Pennisetum glaucum*)), просо звичайне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), елевсіну коракана (*Eleusine coracana*), соняшник, сафлор, сою, тютюн, картоплю, арахіс, бавовник, солодку картоплю (*Ipomoea batatas*), маніоку, каву, кокосовий горіх, ананас, цитрусові дерева, какао, чай, банан, авокадо, інжир, гуаву, манго, маслину, папайю, кешью, маकाдамію, мигдаль, цукровий буряк, цукрову тростину, овес, ячмінь, томати, салат, зелену квасолю, квасолю лімську, горох, гарбузові такі, як огірок, канталуп та мускатну диню, декоративні рослини та хвойні рослини. Частини рослин, які обробляли, включають, але не обмежуються ними, листя, стебла, квіти, коріння, насіння, фрукти, бульби, колеоптілі, тощо. Декоративні рослини і частини рослин, які можна обробляти, включають, але не обмежуються ними, азалію, гортензію, гібіскус, троянди, тюльпани, нарциси, петунії, гвоздики, пуансетту і хризантему. Хвойні рослини і частини рослин, які можна обробити, включають, але не обмежуються ними, сосни такі, як сосну ладаневу (*Pinus taeda*), сосну Еліота, сосну жовту, сосну скручену та сосна промениста; псевдотсугу Мензіса; тсугу західну; ялину ситхінську; секвої; пихти такі, як ялиця миловида та ялиця бальзамічна та кедрі такі, як туя велетенська та кипарис аляскінський. Газонні рослини і частини рослин, які можна обробляти, включають, але не обмежуються ними, тонконіг однорічний, пажитницю багатоквіткову, тонконіг стиснутий, кострицю, мітлицю, ростки пшениці, тонконіг лучний, грятницю збірну, пажитницю, мітлицю велетенську, свиновий пальчастий, августинову траву та види роду *zoysia*. У певних варіантах здійснення, рослина або частина рослини, які обробляють, являє собою злакову рослину, або частину рослини, що вибирають з групи, яка складається з рослин або частини рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса та жита. Насіння або інші пропагули будь-якої з вищезазначених рослин можуть бути оброблені культуральними рідинами, продуктами культуральної рідини, продуктами ферментації та/або композиціями, запропонованими в даному документі.

У певних варіантах здійснення рослини та/або частини рослини обробляють шляхом розпилювання культуральних рідин, продуктів культуральної рідини, продуктів ферментації і композицій або їх комбінації, які містять метилобактерії, які інгібують патогенні гриби рослин. Такі способи розпилення включають, але не обмежуються ними, обробку однієї частини рослини або будь-якої комбінації частин рослин. Розпилення може бути досягнуто будь-яким пристроєм, який буде розподіляти культуральну рідину, продукти культуральної рідини, продукти ферментації і композиції на рослину та/або частину рослини. Прийнятні розпилювальні пристрої включають штанговий розпилювач, ручний або заплічний розпилювач, промислові розпилювачі (тобто літак-розпилювач) і подібні. Також можуть бути використані пристрої для розпилення і/або способи, що забезпечують нанесення культуральних рідин, продуктів культуральних рідин, продуктів ферментації і композицій на одну з або обидві адаксіальну і/або абаксіальну поверхню. Також в даному документі запропоновані рослини та/або частини рослини, які, щонайменше, частково покриті будь-якою двофазною культуральною рідиною, продуктом культуральної рідини, продуктом ферментації, або композиціями, які містять тверду речовину з приєднаною до неї метилобактерією, яка інгібує патогенний гриб рослин. Також в даному документі запропоновані оброблені рослинні продукти, які містять тверду речовину з приєднаною до неї метилобактерією, яка інгібує патогенний гриб рослин.

У певних варіантах здійснення насіння обробляють, шляхом нанесення на насіння культуральної рідини, продукту культуральної рідини, продукту ферментації і композицій, або їх

комбінації, які містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин. Насіння можна обробити культуральною рідиною, продуктами культуральної рідини і композиціями, передбаченими в даному документі, способами, включаючи, але не обмежуючись ними, насичення, покриття, розпилення і тому подібне. Обробка насіння може бути здійснена як з безперервними, так і з серійними дозаторами. У певних варіантах здійснення насіння з покриттям можна приготувати шляхом суспендування насіння з композицією покриття, що містить культуральну рідину, продукт культуральної рідини, або композиції, які містять тверду речовину з метилобактерією, що інгібують патогенні гриби рослин і висушування на повітрі отриманого продукту. Сушіння на повітрі може бути здійснено при будь-якій температурі, яка не є шкідливою для насіння або метилобактерії, але зазвичай не перевищує 30 градусів Цельсія. Частина покриття, що містить тверду речовину і метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, включає, але не обмежується, діапазоном 0,1-25 % від маси насіння, 0,5-5 % від маси насіння та 0,5-2,5 % від маси насіння. У певних варіантах здійснення тверда речовина, що використовується в покритті або обробці насіння, матиме прикріплену до неї метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин. У певних варіантах здійснення тверда речовина, що використовують в покритті або обробці насіння, буде зв'язано з метилобактерією, яка інгібує патогенні гриби рослин, і буде являти собою культуральну рідину, продукт культуральної рідини або композицією, отриману способами, запропонованими в даному документі. Різноманітні композиції для обробки насіння і способи обробки насіння розкриті в патентах США № 5106648; 5512069 та 8181388, включені в даний документ у вигляді посилання у всій їх повноті і можуть бути пристосовані для використання з продуктами ферментації або композиціями, запропонованими в даному документі. У певних варіантах здійснення композиція, яку використовують для обробки насіння, може містити сільськогосподарсько прийнятні ексципієнти, які включають, але не обмежуються ними, деревну муку, глини, активоване вугілля, діатомову землю, дрібнозернисті неорганічні тверді речовини, карбонат кальцію і подібне. Глини і неорганічні тверді речовини, які можуть бути використані з культуральною рідиною, продуктами культуральної рідини або композиціями, представленими в даному документі, включають, але не обмежуються ними, бентоніт кальцію, каолін, китайську глину, тальк, перліт, слюду, вермикуліт, кремнезем, кварцовий порошок, монтмориллоніт і їх суміші. Сільськогосподарсько прийнятні ад'юванти, які сприяють прилипанню до насіння, які можуть бути використані, включають, але не обмежуються ними, полівінілацетат, сополімери полівінілацетату, гідролізовані полівінілацетати, сополімери полівінілпіролідон-вінілацетат, полівінілові спирти, сополімери полівінілового спирту, полівінілметиловий ефір, сополімер полівінілметиловий ефір-малеїновий ангідрид, воски, латексні полімери, целюлози, включаючи етилцелюлози і метилцелюлози, гідрокси метилцелюлози, гідроксипропілцелюлози, гідроксиметилпропілцелюлози, полівінілпіролідони, альгірати, декстрини, мальто-декстрини, полісахариди, жири, олії, білки, смола карая, ягуарова камідь, трагакантова камідь, полісахаридні камеді, слиз, гуміарабіки, шелаки, полімери та сополімери вініліденхлориду, білкові полімери і сополімери на основі сої, лігносульфонати, акрилові сополімери, крохмалі, полівінілакрилатів, зеїни, желатин, карбоксиметилцелюлоза, хітозан, поліетиленоксид, акриламідні полімери і сополімери, полігідроксиетилакрилат, метилакриламідних мономерів, альгірат, етилцелюлоза, поліхлоропрен їх концентрати або суміші. Інші корисні сільськогосподарські прийнятні ад'юванти, які можуть сприяти покриттю, включають, але не обмежуються ними, полімери і сополімери вінілацетату, сополімер полівінілпіролідон-вінілацетат і водорозчинні воски. Різні поверхнево-активні речовини, диспергатори, засоби проти ковзання, агенти, що контролюють піну, і барвники, розкриті в даному описі і в патенті США № 8181388, можуть бути пристосовані для використання з продуктами ферментації або композиціями, запропонованими в даному документі.

У даному документі запропоновані композиції, які містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, і яка забезпечує контроль інфекцій, викликаних патогенними грибами рослин, у рослин, частин рослин і рослин, отриманих з них, у порівнянні з необробленими рослинами, частинами рослин і рослинами, отриманими з них, які не піддавали впливу композиції. У певних варіантах здійснення, частини рослин, включаючи, але не обмежуючись ними, насіння, лист, плід, стебло, корінь, бульбу або колеоптіль, можна обробляти композиціями, запропонованими в цьому документі, для контролю захворювання, викликаного грибами. Обробка або застосування можуть включати, але не обмежуючись цим, обприскування, нанесення покриття, часткове нанесення покриття, занурення та/або насичення рослин або частин рослин композиціями, запропонованими в даному документі. У певних варіантах здійснення насіння, лист, плід, стебло, корінь, бульба або колеоптіль можуть бути занурені та/або насичені рідкою, напіврідкою, емульсією або суспензією композиції,

запропонованими в даному документі. Таке занурення або насичення насіння може бути достатнім для забезпечення інгібування захворювання, викликаного грибом, в рослині або частині рослини порівняно з необробленою рослиною або частиною рослини. Таке інгібування захворювань, викликаних грибами, включає, але не обмежується ним, зниження росту грибів та/або несприятливий вплив на рост грибів у порівнянні з необробленими рослинами. У певних варіантах здійснення насіння рослин можна занурювати та/або насичувати протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5 або 6 годин. Таке занурення та/або насичення може, у певних варіантах здійснення, проводитися при температурах, які не є шкідливими для насіння рослини або метилобактерії. У певних варіантах здійснення насіння можна обробляти при від близько 15 до близько 30 градусів Цельсія або при від близько 20 до близько 25 градусів Цельсія. У певних варіантах здійснення насичення та/або занурення насіння можна проводити з легким перемішуванням.

Кількість композицій, які містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, яка є достатньою для забезпечення інгібування інфекції рослини або частини рослини, викликаной грибами, може, таким чином, бути визначена шляхом вимірювання будь-якого або всього росту грибів та/або несприятливого впливу на ріст грибів в обробленій рослині або частині рослини у порівнянні з необробленими рослинами або частинами рослин. Побічні ефекти росту грибів у рослині, які можуть бути виміряні, включають, будь-який тип пошкодження або некрозу тканини рослин, будь-який тип зменшення врожайності рослин, будь-яке зниження вартості рослинного продукту та/або виробництво небажаних метаболітів грибів або побічних продуктів росту грибів, включаючи, але не обмежуючись ними, мікотоксини. Мікотоксини включають ряд токсичних молекул, продукованих видами грибів, включаючи, але не обмежуючись ними, полікетиди (включаючи афлатоксини), деметилстеригматоцистин, О-метилстеригматоцистин і т.п.), фумонізени, альперізени (наприклад, А₁, А₂, В₁, В₂), сфінгофунгіни (А, В, С та D), трихотецени, фуміфунгіни і т.п. Методи кількісного визначення рівня мікотоксинів широко задокументовані. Крім того, також доступні комерційні набори для вимірювання мікотоксинів, таких як афлатоксин, фумонізін, дезоксиніваленон і зеараленон (VICAM, Уотертаун, штат Массачусетс, США).

Тому очікується, що композиції, представлені в даному документі, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, можуть бути прийнятними для інгібування росту та/або інфекції у великій кількості патогенних грибів рослин, включаючи, без обмеження, анаморфні та/або телеоморфні стадії цих фітопатогенних грибів у наступних родах і видах: *Blumeria* (*Blumerio graminis* f. sp. *tritici*), *Cercospora* (*Cercospora kikuchii*; *Cercospora sojae*; *Cercospora zeae-maydis*); *Cochliobolus* (*Colchliobolus maydis*; *Cochliobolus heterostrophus*; *Cochliobolus carbonum*); *Colletotrichum* (*Colletotrichum lindemuthianum*; *Colletotrichum graminicola*; *Colletotrichum cereale*); *Diplodia* (*Diplodia maydis*); *Exserohilum* (*Exserohilum turcicum*); *Fusarium* (*Fusarium nivale*; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium graminearum*; *Fusarium culmorum*; *Fusarium solani*; *Fusarium moniliforme*; *Fusarium virguliforme*); *Macrophomina* (*Macrophomina phaseolina*); *Magnaporthe* (*Magnaporthe oryzae*; *Magnaporthe grisea*); *Phakopsora* (*Phakopsora pachyrhizi*); *Phialopora* (*Phialophora gregata*); *Phymatotrichum* (*Phymatotrichum omnivorum*); *Phytophthora* (*Phytophthora cinnamomi*; *Phytophthora cactorum*; *Phytophthora phaseoli*; *Phytophthora parasitica*; *Phytophthora citrophthora*; *Phytophthora megasperma* f.sp. *sojae*; *Phytophthora infestans*); *Puccinia* (*Puccinia sorghi*; *Puccinia striiformis*; *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*; *Puccinia asparagi*; *Puccinia recondita*; *Puccinia arachidis*; *Puccinia coronata*); *Pythium* (*Pythium aphanidermatum*; *Pythium ultimum*; *Pythium sylvaticum*; *Pythium torulosum*; *Pythium lutarium*; *Pythium oopapillum*); *Pyrenophora* (*Pyrenophora tritici-repentis*); *Rhizoctonia* (*Rhizoctonia solani*; *Rhizoctonia cerealis*); *Sclerotium* (*Sclerotium rolfsii*); *Sclerotinia* (*Sclerotinia sclerotiorum*; *Sclerotinia homoeocarpa*); *Septoria* (*Septoria lycopersici*; *Septoria glycines*; *Septoria nodorum*; *Septoria tritici*); *Setosphaeria* (*Setosphaeria turcica*); *Stagonospora* (*Stagonospora nodorum*); *Verticillium* (*Verticillium dahliae*; *Verticillium albo-atrum*). Також передбачається, що композиції, запропоновані в цьому документі, що містять метилобактерію, яка інгібує патогенні гриби рослин, є корисними для інгібування росту та/або інфекції, викликаной грибами *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium virguliforme* та/або *Fusarium proliferatum*. Композиції, запропоновані в даному документі, що містять метилобактерію, яка інгібує ріст та/або інфекцію, викликаную грибами *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium virguliforme* та/або *Fusarium proliferatum*, можуть бути використані для боротьби з інфекціями злакових рослин, інфікованих цими грибами. Інфекції злакових рослин, вибрані з групи, що складається з рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса та жита рослин, викликані *Fusarium* sp, можна контролювати за допомогою композицій, запропонованих у цьому документі. У будь-якому з вищезазначених варіантів здійснення патогенний гриб рослин, який інгібується, може мати свою анаморфну форму, свою

телеоморфну форму або як свою анаморфну, так і телеоморфну форми. Деякі ізоляти метилових бактерій або комбінації ізолятів також можуть бути використані для інгібування деяких патогенних грибів рослин у певних культурах, як розкрито в Таблиці 3. У певних варіантах здійснення, де використовують комбінацію ізолятів (наприклад, NLS0109, його похідне або Methylobacterium sp., що споріднений з ним, і щонайменше один додатковий штам метилових бактерій, вибраний з групи, що складається з NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідного і Methylobacterium sp., що споріднений з ними), ізоляти можна застосовувати або одночасно, або послідовно. У певних варіантах здійснення, де використовують комбінацію ізолятів (наприклад, NLS0109, його похідне або Methylobacterium sp., що споріднений з ним, і щонайменше один додатковий штам метилових бактерій, вибраний з групи, що складається з NLS0017, NLS0020, NLS0021, NLS0042, NLS0064, NLS0066, NLS0089, їх похідного і Methylobacterium sp., що споріднений з ними), ізоляти можна застосовувати або однаковим шляхом (шляхами) (наприклад, через обробку насіння, нанесення листя або в борозну) або різними шляхами.

Таблиця 3

Ізоляти метилових бактерій та комбінації ізолятів для застосування в композиціях і способах боротьби з певними патогенними грибами рослин в деяких культурах (включаючи похідні ізолятів Methylobacterium або Methylobacterium spp., що споріднені з них)

Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS
NLS0109	Пшениця	Fusarium graminearum	Вигорання колосу; вигорання паростків, викликані Fusarium	Обробка насіння, листя або обидва варіанти
		Pythium spp	Коренева гниль, викликана Pythium	
		Septoria tritici; Stagonospora nodorum	Бородавки, викликані Septoria/ Stagonospora	
		Rhizoctonia solani	Ризоктонієва коренева гниль	
		Fusarium spp.	Гниль кореня, крони та кореневої шийки, викликана Fusarium	
		Magnaporthe grisea	Висушування колосу	
		Pyrenophora tritici-repentis	Піренофороз	
		Microdochium nivale	Сніжна пліснява	
		Blumeria graminis f. sp. tritici	Справжня борошниста роса	
NLS0109	Кукурудза	Cercospora zeae-maydis	Сіра плямистість листя	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або як борозневе застосування, та і застосування на листя
		Colletotrichum graminicola	Антракноз (гниль листя та стебла)	
		Fusarium graminearum	Гниль стебла; гниль початку, викликані Fusarium	
		Fusarium verticillioides	Гниль початку, викликана Fusarium	
		Rhizoctonia solani	Гниль крони та кореня, викликані Rhizoctonia	
		Stenocarpella maydis	Гниль стебла та початку, викликана Diplodia	

Таблиця 3

Ізоляти метилових бактерій та комбінації ізолятів для застосування в композиціях і способах боротьби з певними патогенними грибами рослин в деяких культурах (включаючи похідні ізолятів *Methylobacterium* або *Methylobacterium* spp., що споріднені з них)

Ізолят(и) NLS	Культура	Патоген	Загальна назва хвороби (хвороб)	Шлях(и) застосування
NLS0109	Кукурудза	<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Sclerospora graminicola</i> ; <i>Sclerophthora macrospora</i>	Несправжня борошниста роса; акроманія	
NLS0109	Соя	<i>Cercospora soja</i>	Селенофомозна плямистість злакових трав	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація
		<i>Cercospora kikuchii</i>	Пурпурна плямистість листя та плямистість насіння	
		<i>Septoria glycines</i>	Бура плямистість	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль, вигорання/в'янення насіння, гниль кореня та гниль стручків та кореневого чохла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Біла пліснява	
		<i>Fusarium virguliform</i>	Синдром раптової загибелі	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Вимокання та гниль кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Peronospora manshurica</i>	Несправжня борошниста роса	
		<i>Phytophthora sojae</i>	Гниль кореня та стебла	
NLS0109+ NLS0089	Пшениця	<i>Fusarium graminearum</i>	Вигорання колосу; вигорання паростків, викликані <i>Fusarium</i>	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для кожної обробки
		<i>Septoria tritici</i> ; <i>Stagonospora nodorum</i>	Бородавки, викликані <i>Septoria</i> / <i>Stagonospora</i>	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Ризоктонієва коренева гниль	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль кореня, крони та кореневої шийки, викликана <i>Fusarium</i>	
		<i>Blumeria graminis</i> f. sp. tritici	Справжня борошниста роса	
		<i>Magnaporthe grisea</i>	Висушування колосу	
		<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Піренофороз	
		<i>Microdochium nivale</i>	Сніжна пліснява	

Таблиця 3

Ізоляти метилових бактерій та комбінації ізолятів для застосування в композиціях і способах боротьби з певними патогенними грибами рослин в деяких культурах (включаючи похідні ізолятів *Methylobacterium* або *Methylobacterium* spp., що споріднені з них)

Ізолят(и) NLS	Культура	Патоген	Загальна назва хвороби (хвороб)	Шлях(и) застосування
NLS0109+ NLS0089	Соя	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Біла пліснява	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки
		<i>Cercospora sojina</i>	Селенофомозна плямистість злакових трав	
		<i>Cercospora kikuchii</i>	Пурпурна плямистість листя та плямистість насіння	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль, вигорання/в'янення насіння, гниль кореня та гниль стручків та кореневого чохла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Septoria glycines</i>	Бура плямистість	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Peronospora manshurica</i>	Несправжня борошниста роса	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Вимокання та гниль кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Phytophthora sojae</i>	Гниль кореня та стебла	
		<i>Fusarium virguliform</i>	Синдром раптової загибелі	
NLS0109 + NLS0089	Кукурудза	<i>Pythium</i> spp.	Гниль кореня та стебла, викликані <i>Pythium</i>	Борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки
		<i>Stenocarpella maydis</i>	Гниль стебла та початку, викликана <i>Diplodia</i>	
		<i>Sclerospora graminicola</i> ; <i>Sclerophthora macrospora</i>	Несправжня борошниста роса; акроманія	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Гниль крони та кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль кореня та стебла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Colletotrichum graminicola</i>	Антракноз, вигорання листя та гниль стебла	
		<i>Cercospora zeae-maydis</i>	Сіра плямистість листя	

Таблиця 3

Ізоляти метилових бактерій та комбінації ізолятів для застосування в композиціях і способах боротьби з певними патогенними грибами рослин в деяких культурах (включаючи похідні ізолятів *Methylobacterium* або *Methylobacterium* spp., що споріднені з них)

Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS
NLS0020+ NLS0109	Пшениця	<i>Fusarium graminearum</i>	Вигорання колосу; вигорання паростків, викликані <i>Fusarium</i>	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки, включаючи борозневе застосування NLS0020 та застосування NLS0109 на листя.
		<i>Septoria tritici</i> ; <i>Stagonospora nodorum</i>	Бородавки, викликані <i>Septoria</i> / <i>Stagonospora</i>	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Ризоктонієва коренева гниль	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль кореня, крони та кореневої шийки, викликана <i>Fusarium</i>	
		<i>Blumeria graminis</i> f. sp. tritici	Справжня борошниста роса	
		<i>Magnaporthe grisea</i>	Висушування колосу	
		<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Піренофороз	
		<i>Microdochium nivale</i>	Сніжна пліснява	
NLS0020+ NLS0109	Соя	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Біла пліснява	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки, включаючи борозневе застосування NLS0020 та застосування NLS0109 на листя.
		<i>Cercospora sojina</i>	Селенофомозна плямистість злакових трав	
		<i>Cercospora kikuchii</i>	Пурпурна плямистість листя та плямистість насіння	
		<i>Septoria glycines</i>	Бура плямистість	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль, вигорання/в'янення насіння, гниль кореня та гниль стручків та кореневого чохла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Peronospora manshurica</i>	Несправжня борошниста роса	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Вимокання та гниль кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Phytophthora sojae</i>	Гниль кореня та стебла	
		<i>Fusarium virguliform</i>	Синдром раптової загибелі	

Таблиця 3

Ізоляти метилових бактерій та комбінації ізолятів для застосування в композиціях і способах боротьби з певними патогенними грибами рослин в деяких культурах (включаючи похідні ізолятів *Methylobacterium* або *Methylobacterium* spp., що споріднені з них)

Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS
NLS0020+ NLS0109	Кукурудза	<i>Cercospora zeae-maydis</i>	Сіра плямистість листя	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки, включаючи борозневе застосування NLS0020 та застосування NLS0109 на листя.
		<i>Colletotrichum graminicola</i>	Антракноз (гниль листя та стебла)	
		<i>Fusarium graminearum</i>	Гниль стебла; гниль початку, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Fusarium verticillioides</i>	Гниль початку, викликана <i>Fusarium</i>	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Гниль крони та кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Stenocarpella maydis</i>	Гниль стебла та початку, викликана <i>Diplodia</i>	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Sclerospora graminicola</i> ; <i>Sclerophthora macrospora</i>	Несправжня борошниста роса; акроманія	
NLS0017+ NLS0109	Кукурудза	<i>Pythium</i> spp.	Гниль кореня та стебла, викликані <i>Pythium</i>	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки, включаючи борозневе застосування NLS0017 та застосування NLS0109 на листя.
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Гниль крони та кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Stenocarpella maydis</i>	Гниль стебла та початку, викликана <i>Diplodia</i>	
		<i>Sclerospora graminicola</i> ; <i>Sclerophthora macrospora</i>	Несправжня борошниста роса; акроманія	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль кореня та стебла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Colletotrichum graminicola</i>	Антракноз, вигорання листя та гниль стебла	
		<i>Cercospora zeae-maydis</i>	Сіра плямистість листя	

Таблиця 3

Ізоляти метилових бактерій та комбінації ізолятів для застосування в композиціях і способах боротьби з певними патогенними грибами рослин в деяких культурах (включаючи похідні ізолятів *Methylobacterium* або *Methylobacterium* spp., що споріднені з них)

Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS
NLS0017+ NLS0109	Соя	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Біла пліснява	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки
		<i>Cercospora sojina</i>	Селенофомозна плямистість злакових трав	
		<i>Cercospora kikuchii</i>	Пурпурна плямистість листя та плямистість насіння	
		<i>Septoria glycines</i>	Бура плямистість	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль, вигорання/в'янення насіння, гниль кореня та гниль стручків та кореневого чохла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Peronospora manshurica</i>	Несправжня борошниста роса	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Вимокання та гниль кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Phytophthora sojae</i>	Гниль кореня та стебла	
		<i>Fusarium virguliform</i>	Синдром раптової загибелі	
NLS0017+ NLS0109	Пшениця	<i>Fusarium graminearum</i>	Вигорання колосу; вигорання паростків, викликані <i>Fusarium</i>	Обробка насіння, листя або обидва варіанти
		<i>Pythium</i> spp	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Septoria tritici</i> ; <i>Stagonospora nodorum</i>	Бородавки, викликані <i>Septoria</i> / <i>Stagonospora</i>	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Ризоктонієва коренева гниль	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль кореня, крони та кореневої шийки, викликана <i>Fusarium</i>	
		<i>Magnaporthe grisea</i>	Висушування колосу	
		<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Піренофороз	
		<i>Microdochium nivale</i>	Сніжна пліснява	
		<i>Blumeria graminis</i> f. sp. tritici	Справжня борошниста роса	

Таблиця 3

Ізоляти метилових бактерій та комбінації ізолятів для застосування в композиціях і способах боротьби з певними патогенними грибами рослин в деяких культурах (включаючи похідні ізолятів *Methylobacterium* або *Methylobacterium* spp., що споріднені з них)

Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS	Ізолят(и) NLS
NLS0064+ NLS0109	Соя	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Біла пліснява	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки
		<i>Cercospora sojina</i>	Селенофомозна плямистість злакових трав	
		<i>Cercospora kikuchii</i>	Пурпурна плямистість листя та плямистість насіння	
		<i>Septoria glycines</i>	Бура плямистість	
		<i>Pythium</i> spp.	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль, вигорання/в'янення насіння, гниль кореня та гниль стручків та кореневого чохла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Peronospora manshurica</i>	Несправжня борошниста роса	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Вимокання та гниль кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Phytophthora sojae</i>	Гниль кореня та стебла	
NLS0021+ NLS0109	Кукурудза	<i>Fusarium virguliform</i>	Синдром раптової загибелі	Обробка насіння, борозневе застосування, застосування на листя або будь-яка їх комбінація, в яких ізоляти використовують окремо або в комбінації для будь-якої обробки, включаючи борозневе застосування NLS0021 та застосування NLS0109 на листя.
		<i>Pythium</i> spp.	Гниль кореня та стебла, викликані <i>Pythium</i>	
		<i>Rhizoctonia solani</i>	Гниль крони та кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	
		<i>Stenocarpella maydis</i>	Гниль стебла та початку, викликана <i>Diplodia</i>	
		<i>Sclerospora graminicola</i> ; <i>Sclerophthora macrospora</i>	Несправжня борошниста роса; акроманія	
		<i>Fusarium</i> spp.	Гниль кореня та стебла, викликані <i>Fusarium</i>	
		<i>Colletotrichum graminicola</i>	Антракноз, вигорання листя та гниль стебла	
		<i>Cercospora zeae-maydis</i>	Сіра плямистість листя	

У певних варіантах здійснення кількість композицій, запропонованої в даному документі, яка є достатньою для забезпечення інгібування інфекції, викликаної грибами, в рослині або частині рослини, може являти собою композицію з метилових бактерією, яка інгібує патогенні гриби рослин

при титрі, який дорівнює щонайменше близько 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр, щонайменше близько 1×10^9 колонієутворюючих одиниць на мілілітр, щонайменше близько 1×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр або щонайменше близько 3×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр. У певних варіантах здійснення кількості композиції, запропонованої в даному документі, яка є достатньою для забезпечення інгібування інфекції, викликані грибами, в рослині або частині рослини, може являти собою композицію з метилобактерією, яка інгібує патогенні гриби рослин при титрі, який дорівнює від щонайменше близько 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 6×10^{10} колонієутворюючих одиниць на мілілітр. У певних варіантах здійснення кількості композиції, запропонованої в даному документі, яка є достатньою для забезпечення інгібування інфекції, викликані грибами, в рослині або частині рослини, може являти собою продукт культуральної рідини з метилобактерією, яка інгібує патогенні гриби рослин, з титром твердої фази цього продукту, який дорівнює від щонайменше близько 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 або 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 6×10^{10} , 1×10^{13} або 5×10^{13} колонієутворюючих одиниць метилобактерії на грам твердої фази, де монокультура або сокультура метилобактерії, яка інгібує патогенні гриби рослин прикріплена до неї. У певних варіантах здійснення кількості композиції, запропонованої в даному документі, яка є достатньою для забезпечення інгібування інфекції, викликані грибами, в рослині або частині рослини, може являти собою композицію з титром метилобактерії, який дорівнює від щонайменше близько 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 або 5×10^8 колонієутворюючих одиниць на мілілітр до щонайменше близько 6×10^{10} , 1×10^{13} або 5×10^{13} колонієутворюючих одиниць метилобактерії на грам частинок в композиції, яка містить частинки, що містять тверду речовину, де монокультура або сокультура метилобактерії, яка інгібує патогенні гриби рослин прикріплена до неї. У будь-якій з вищезазначених композицій зазначені концентрації можуть являти собою концентрації, що інгібують гриби.

У певних варіантах здійснення композиції, рослини і частини рослин, оброблені композиціями, і способи, запропоновані в даному описі, можуть містити фунгіциди на додаток до штамів метилобактерії для посилення контролю захворювання. У певних варіантах здійснення фунгіциди, запропоновані в композиціях, що містить метилобактерію, наприклад, у вигляді обробки насіння, як суспензії для борозни або у вигляді листових розпилень. У певних варіантах здійснення, фунгіциди надаються у вигляді окремих композицій для застосування в способах, передбачених в даному документі. Приклади фунгіцидів, які можуть бути використані в композиціях і способах, передбачених в даному документі, для посиленого контролю патогенних грибів рослин, наведено в Таблиці 4.

Таблиця 4

Культура	Культура	Культура	Культура
Пшениця	<i>Fusarium graminearum</i>	Вигорання колосу; вигорання паростків, викликані <i>Fusarium</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол
Пшениця	<i>Pythium spp</i>	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	металаксил, мефеноксам, оксатіапіпролін, етабоксам, тірам, тіофанат-метил
Пшениця	<i>Blumeria graminis f. sp. tritici</i>	Справжня борошниста роса	пропиконазол, триадименфол, флуксапіроксад, (трифлуксистеробин, флуопірам спеціальні культури)
Пшениця	<i>Septoria tritici</i> ; <i>Stagonospora nodorum</i>	Бородавки, викликані <i>Septoria/Stagonospora</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол
Пшениця	<i>Rhizoctonia solani</i>	Ризоктонієва коренева гниль	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, карбоксин, флуксапіроксад
Пшениця	<i>Fusarium spp.</i>	Гниль кореня, крони та кореневої шийки, викликана <i>Fusarium</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, імазаліл, карбоксин,

Таблиця 4

Культура	Культура	Культура	Культура
			тіабендазол, флуксапіроксад
Пшениця	<i>Magnaporthe grisea</i>	Висушування колосу	протіоконазол, трифлуксистробін
Пшениця	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Піренофороз	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол
Пшениця	<i>Microdochium nivale</i>	Сніжна пліснява	диметоморф, боскалід
Кукурудза	<i>Cercospora zeae-maydis</i>	Сіра плямистість листя	азоксистробін, піраклостробін, флуоксастробін та трифлуксистробін, фенамідон
Кукурудза	<i>Colletotrichum graminicola</i>	Антракноз (гніль листя та стебла)	іпконазол, протіоконазол, пропіконазол, азоксистробін, піраклостробін, флуоксастробін та трифлуксистробін
Кукурудза	<i>Fusarium graminearum</i>	Гніль стебла; гніль початку, викликані <i>Fusarium</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, імазаліл, карбоксин, тіабендазол, флуксапіроксад
Кукурудза	<i>Fusarium verticillioides</i>	Гніль початку, викликана <i>Fusarium</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, імазаліл, карбоксин, тіабендазол, флуксапіроксад
Кукурудза	<i>Fusarium spp.</i>	Гніль кореня та стебла, викликані <i>Fusarium</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, імазаліл, карбоксин, тіабендазол, флуксапіроксад
Кукурудза	<i>Stenocarpella maydis</i>	Гніль стебла та початку, викликана <i>Diplodia</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, карбоксин, флуксапіроксад
Кукурудза	<i>Pythium spp.</i>	Гніль кореня та стебла, викликані <i>Pythium</i>	металаксил, мефеноксам, оксатіапіпролін, етабоксам, тірам, тіофанат-метил
Кукурудза	<i>Sclerospora graminicola</i> ; <i>Sclerophthora macrospora</i>	Несправжня борошниста роса; акроманія	пропамокарб, диметоморф, металаксил, мефеноксам
Кукурудза	<i>Rhizoctonia solani</i>	Гніль крони та кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, карбоксин, флуксапіроксад

Таблиця 4

Культура	Патоген	Загальна назва хвороби(хвороб)	Хімічні речовини для комбінування з метилобактеріями для посиленого контролю захворювань
Соя	<i>Cercospora sojina</i>	Селенофомозна плямистість злакових трав	азоксистробін, піраклостробін, флуоксастробін та трифлуксастробін
Соя	<i>Cercospora kikuchii</i>	Пурпурна плямистість листя та плямистість насіння	азоксистробін, піраклостробін, флуоксастробін та трифлуксастробін, фенамідон
Соя	<i>Septoria glycines</i>	Бура плямистість	азоксистробін, піраклостробін, флуоксастробін та трифлуксастробін, флуопірам
Соя	<i>Pythium spp.</i>	Коренева гниль, викликана <i>Pythium</i>	металаксил, мефеноксам, оксатіапіпролін, етаксам
Соя	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Біла пліснява	тебуконазол, протіоконазол, флуопірам
Соя	<i>Fusarium spp.</i>	Гниль, вигорання/в'янення насіння, гниль кореня та гниль стручків та кореневого чохла, викликані <i>Fusarium</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, імазаліл, карбоксин, тіабендазол, флуксапіроксад
Соя	<i>Fusarium virguliform</i>	Синдром раптової загибелі	флуопірам
Соя	<i>Rhizoctonia solani</i>	Вимокання та гниль кореня, викликані <i>Rhizoctonia</i>	тебуконазол, тритиконазол, метконазол, ипконазол, протіоконазол, тірам, каптан, пенфлуфен, карбоксин, флуксапіроксад
Соя	<i>Phytophthora sojae</i>	Гниль кореня та стебла	металаксил, мефеноксам, оксатіапіпролін

Коли хімічні речовини використовують в комбінації з метилобактерією, норми застосування хімічних речовин можуть бути знижені порівняно зі стандартними комерційними нормами застосування для даного виду рослин, забезпечуючи при цьому однаковий або підвищений рівень захисту рослини від патогенних грибів рослин. У певних варіантах здійснення, штами метилобактерії, запропоновані в даному документі, забезпечують посилену активність у поєднанні з фунгіцидами в результаті дії проти певних штамів грибів, для яких хімічні фунгіциди не забезпечують або забезпечують неповний контроль. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109 або NL0089, гриб являє собою *Cercospora*, культура являє собою кукурудзу, хвороба являє собою сіру плямистість листя, а хімічна речовина являє собою стробілуридин, такий як піраклостробін, або азол, такий як тебуконазол. У певних варіантах здійснення, швидкість застосування фунгіциду або кількість застосувань фунгіциду може бути знижена в результаті фунгіцидної активності застосованої метилобактерії. У певних варіантах здійснення метилобактерія являє собою NLS0109, гриб являє собою *Pythium*, культура являє собою сою або кукурудзу, хвороба являє собою кореневу гниль, викликану *Pythium*, а хімічна речовина являє собою металаксил, мефеноксам, оксатіапіпролін або етаксам. У певних варіантах здійснення, швидкість застосування фунгіциду або кількість застосувань фунгіциду може бути знижена в результаті фунгіцидної активності застосованої метилобактерії.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади включені для демонстрації різних варіантів здійснення. Фахівцям в даній галузі техніки повинно бути зрозуміло, що методики, розкриті в наступних прикладах, представляють методики, виявлені заявниками як ті, що ефективно функціонують. Однак фахівці в даній галузі техніки повинні, у світлі цього розкриття, оцінити, що багато конкретних варіантів здійснення можуть бути зроблені в розкритих варіантах, але все ще отримують подібні або аналогічні результати, не відступаючи від обсягу розкриття.

Приклад 1. Польові випробування кукурудзи та сої влітку 2015 року

Влітку 2015 року були проведені польові випробування для оцінки пригнічення захворювання кукурудзи та сої за допомогою PPFM у двох незалежних місцях: Бетел, штат Міссурі і Троя, штат Огайо. Обидва місця проведення досліджень керувалися контрактними дослідними організаціями. Персонал компанії NewLeaf Symbiotics відвідував кожну ділянку принаймні двічі, щоб забезпечити належне впровадження експерименту. Однакові штами і норми застосування були випробувані в обох місцях. Випробування були організовані як розділена ділянка в межах RCBД (рандомізований повноблочний план) з шістьма повторностями на ділянці Бетел і чотирма повторностями на ділянці Троя. Обробка кукурудзи описана в Таблиці 5, а обробка сої описана в Таблиці 6. Внутрішньоборозне застосування використовували з розрахунку 1250 мл 10Х концентрату PPFM на акр, а обробку листя проводили в кількості 5000 мл 10Х концентрату PPFM на акр. Дизайн розділеної ділянки дозволяв оцінювати обробку в борознах, обробку листя, відповідь на послідовну обробку PPFM, а також взаємодію між різними PPFM. Дані дослідів сої Трої, Огайо не аналізували.

Таблиця 5

Польові випробування обробки патології кукурудзи, 2015 рік

Номер обробки	Обробка всієї ділянки	Обробка підділянки
1	Контроль	Контроль
2	NLS0020	Контроль
3	Контроль	NLS0020
4	NLS0020	NLS0020
5	Контроль	NLS0109
6	NLS0020	NLS0109
7	Контроль	NLS0066
8	NLS0020	NLS0066

Таблиця 6

Польові випробування обробки патології сої, 2015 рік

Номер обробки	Обробка всієї ділянки	Обробка підділянки
1	Контроль	Контроль
2	NLS0089	Контроль
3	Контроль	NLS0020
4	NLS0089	NLS0020
5	Контроль	NLS0109
6	NLS0089	NLS0109
7	Контроль	NLS0066
8	NLS0089	NLS0066

На кожній ділянці використовували звичайний міжрядковий інтервал, а також застосовували стандартні агрономічні практики. Гібриди кукурудзи та сої з подібною генетикою, але придатні для конкретних місць випробування, були поставлені для кожного ділянки. Розміри підділянок були не менше чотирьох 20' рядків. Між підділянкою залишилася п'ятиметровий кордон для пом'якшення ефектів сусідів. Крім того, спостереження були взяті лише з центру двох рядків кожної ділянки. Цілі ділянки складалися з чотирьох ділянок плюс п'ять меж між ділянками. Місця випробування були відібрані в районах з природним тиском захворювання і не було зроблено штучних інокуляцій. Як наслідок, однакові захворювання не оцінювалися в кожному місці. Захворювання, оцінені в кукурудзи являли собою антракноз (*Colletotrichum graminicola*), сира плямистість листків (*Cercospora zeae-maydis*) та іржа кукурудзи (*Puccinia sorghi*). Захворювання, оцінені в сої являли собою буру плямистість (*Septoria glycines*) та різноманітні захворювання листя, кільцева плямистість листя (*Cercospora sojina*). Для кожної присутньої хвороби були зібрані та проаналізовані оцінки захворюваності та/або ступеня тяжкості для визначення ефектів лікування.

Оцінки захворювань та результати статистичного аналізу наведені в Таблицях 7-9. Внаслідок різних оцінок захворюваності та кількості повторів на кожній ділянці, дані з двох місць дослідження були проаналізовані окремо. Аналіз даних проводили за допомогою програмного

- забезпечення SAS JMP v11.2 (SAS Institute, Кері, штат Північна Кароліна). Дані аналізувалися відповідно до рекомендацій JMP для аналізу з роздільною ділянкою в межах функції "Fit Model", яка використовує метод REML для змішаних моделей. Для визначення відмінностей між групами обробки застосовувались post hoc тести Студента та HSD-критерія Т'юкі ($\alpha=0,05$).
- 5 Контрасти використовувались для порівняння між окремими групами випробувань.

Таблиця 7

Листова хвороба сої - Бетел, штат Міссурі

Обробка всієї ділянки (в борозну)	Обробка підділянки (на листя)	Тяжкість ранньої бурі плямистості (%)	Тяжкість пізньої бурі плямистості (%)	Тяжкість ранньої плямистості листя (%)	Тяжкість пізньої плямистості листя (%)
Контроль	Контроль	3,00	8,33	1,67	5,50
Контроль	NLS0020	1,33 ^Т	4,17 ^{Т,Н}	0,17 ^{Т,Н}	2,00 ^{Т,Н}
Контроль	NLS0066	1,67 ^Т	4,83 ^Т	0,67 ^Т	4,17
Контроль	NLS0109	1,67 ^Т	5,67 ^Т	0,50 ^{Т,Н}	4,00 ^Т
NLS0089	Контроль	1,17 ^Т	5,00 ^Т	0,17 ^{Т,Н}	2,50 ^{Т,Н}
NLS0089	NLS0020	1,17 ^Т	5,17 ^Т	0,33 ^{Т,Н}	2,50 ^{Т,Н}
NLS0089	NLS0066	1,67	5,17 ^Т	0,33 ^{Т,Н}	4,33
NLS0089	NLS0109	2,00	5,00 ^Т	0,33 ^{Т,Н}	3,00 ^Т

^Т Група обробки істотно відрізняється від контролю (контроль, контроль) при використанні Т-критерія Стюдента ($\alpha=0,05$)

^Н Група обробки істотно відрізняється від контролю (контроль, контроль) при використанні HSD-критерія Т'юкі ($\alpha=0,05$)

Таблиця 8

Листова хвороба кукурудзи - Бетел, штат Міссурі

Обробка всієї ділянки (в борозну)	Обробка підділянки (на листя)	Тяжкість антракноза (%)	Тяжкість ранньої сірої плямистості листя (%)	Тяжкість пізньої сірої плямистості листя (%)	Тяжкість іржі кукурудзи (%)
Контроль	Контроль	21,17	3,17	13,00	12,17
Контроль	NLS0020	18,83	2,00 ^{Т,Н}	11,33	11,67
Контроль	NLS0066	9,50 ^{Т,Н}	1,83 ^{Т,Н}	10,83 ^Т	10,50
Контроль	NLS0109	9,67 ^{Т,Н}	2,50 ^Т	11,00 ^Т	10,00 ^Т
NLS0020	Контроль	18,67	2,17 ^Т	11,83	10,67
NLS0020	NLS0020	17,83	2,00 ^Т	11,50	11,33
NLS0020	NLS0066	9,17 ^Т	1,00 ^{Т,Н}	9,50 ^{Т,Н}	9,67 ^Т
NLS0020	NLS0109	9,17 ^Т	1,17 ^{Т,Н}	9,83 ^{Т,Н}	9,17 ^{Т,Н}

^Т Група обробки істотно відрізняється від контролю при використанні Т-критерія Стюдента ($\alpha=0,05$)

^Н Група обробки істотно відрізняється від контролю при використанні HSD-критерія Т'юкі ($\alpha=0,05$)

Таблиця 9

Листова хвороба кукурудзи - Троя, штат Огайо

Обробка всієї ділянки (в борозну)	Обробка підділянки (на листя)	Тяжкість сірої плямистості листя (%)	Тяжкість всихання кінчика качана (%)	Захворюваність всихання кінчика качана (%)	Тяжкість стеблової гнилі (%)
Контроль	Контроль	67,50	11,00 ⁱ	0,17 ⁱ	1,55
Контроль	NLS0020	67,50	8,25	0,14	1,60
Контроль	NLS0066	62,50	12,50	0,18	1,45
Контроль	NLS0109	60,00	11,75	0,19	1,40
NLS0020	Контроль	65,00	7,50*	0,12*	1,85
NLS0020	NLS0020	67,50	10,00	0,16	1,55
NLS0020	NLS0066	60,00	9,00	0,14	1,45
NLS0020	NLS0109	62,50	9,25	0,14	1,85

ⁱ Середній показник у всіх контрольних обробках у борознах значно відрізнявся від середнього показника всіх обробок NLS0020 у борознах на протигагу ($\alpha=0,05$)

* Група обробки істотно відрізняється від контролю (контроль, контроль) на протигагу ($\alpha=0,10$)

5 Всі способи лікування, застосовані до сої, продемонстрували пригнічення захворювання як від бурі плямистості (*Septoria glycines*), так і від інших хвороб плямистості листя. Застосування NLS0020 на листя без борозневої обробки призвело до найнижчого показника для всіх захворювань і було найбільш ефективним засобом для пригнічення захворювання щодо контролю. Застосування NLS0020 на листя після борозневої обробки NLS0089 також продемонструвало пригнічення захворювання в усіх формах обробки. Застосування NLS0109 на листя значно зменшило всі захворювання і забезпечило більше пригнічення при застосуванні після борозневого застосування NLS0089 для всіх обробок, крім рейтингу ранньої бурі плямистості. Борозневе застосування NLS0089 самостійно істотно знижувало всі захворювання і мало особливо сильний ефект проти хвороб плямистості листя.

15 У кукурудзи на ділянці Бетель, штат Міссурі, застосування NLS0066 і NLS0109 на листя значно пригнічувало всі захворювання, за винятком NLS0066 проти іржі кукурудзи. Борозневе застосування NLS0020 поліпшило пригнічення захворювань, що забезпечувалося застосуванням NLS0066 і NLS0109 на листя у всіх прикладах. Це демонструє підвищену ефективність шляхом багаторазового застосування цих специфічних штамів PPFM. Застосування тільки NLS0020, включаючи застосування на листя, борозневе застосування і борозневе застосування з подальшим застосуванням на листя, призвело до скорочення ранньої тяжкості сірої плямистості листя, але не мало суттєвого впливу на інші захворювання, що тестували.

25 На ділянці Троя, штат Огайо, застосування NLS0066 та NLS0109 на листя призвело до найнижчих рейтингів тяжкості сірої плямистості листя. Це було у відповідності з ефектами застосування, що спостерігалися в штаті Міссурі. Борозневе застосування NLS0020 окремо пригнічувало як тяжкість, так і частоту всихання кінчиків качана, що може свідчити про вплив на хворобу і абіотичні стресори. Крім того, всі борозневі застосування NLS0020 у поєднанні пригнічували метрики всихання кінчиків качана по відношенню до всіх контрольних комбінованих борозневих застосувань, що вказувало на загальний позитивний ефект борозневої обробки NLS0020.

Приклад 2. Пригнічення білої плісняви метилобактерією

35 *Sclerotinia sclerotiorum* являє собою поліфаговий аскоміцетний гриб, який охоплює тисячі дводольних рослин. Біла пліснява на сої та інших бобових культурах має особливе агрономічне значення. У прохолодних, вологих умовах навколишнього середовища біла пліснява викликає передчасне старіння і різко знижує врожайність. Не існує повної генетичної стійкості до білої плісняви, а часткова стійкість лише незначно ефективна. Крім того, застосування фунгіцидів, спеціально для білої форми, застосовується тільки в роки, коли захворювання є дуже вірогідним і має застосовуватися у вузькому вікні для забезпечення ефективного захисту. Застосування

корисних бактерій, які колонізують рослину і забезпечують підвищену стійкість до хвороб, може пом'якшити вплив білої плісняви і підвищити ефективність генетичної та хімічної тактики управління хворобами.

Заморожені вихідні розчини PPFM при концентрації 10X приблизно 1×10^8 КУО/мл розморожували до кімнатної температури безпосередньо перед обробкою листя. Клітини PPFM промивали центрифугуванням для осадження клітин, виливаючи отриманий супернатант, повторно суспендуючи клітини в 1 мл стерильної дистильованої води, центрифугуючи і виливаючи супернатант другий раз, потім повторно суспендуючи другий раз в 1 мл стерильної дистильованої води. Повторно суспендовані, промиті клітини потім розбавляють до концентрації 1X. Протягом двох годин після приготування PPFM аерограф, калібрований до 20 фунт/кв. дюйм, використовувався для нанесення 10 мл розчину 1X PPFM рівномірно по кожній площі рослин, що оброблялися. PPFM застосовували к рослинам тритижневого віку, а інокуляцію проводили наступного тижня, коли рослини були приблизно одномісячного віку.

Насіння висаджували або в середовища для горщиків, в польові ґрунти, або в суміш 50/50 середовища для горщиків і польового ґрунту, залежно від конкретного експерименту. У всіх експериментах використовувалися підноси, що утримували по 18 горщиків, і горщики з індивідуальними обробками були організовані в рандомізовані повні блоки або при посадці, або безпосередньо перед інокуляцією. Відразу після посадки горщики переносили в теплицю (75-80 °F; RH 40-90 %; 16 часовий світловий день) і вирощувалися там протягом місяця. Рослини щодня поливали і обробляли додатковим добривом два рази на тиждень.

Рослини віком один місяць інокулювали 5-7 добовими культурами *Sclerotinia sclerotiorum*, вирощеними на PDA (картопляний агар з декстрозою) в темряві. Використовували модифіковану версію способу інокуляції черешків (Hoffman et al. 2002. Plant Dis. 86:971-980). Коротко, черешок третього вузла вирізали ножицями приблизно на один дюйм від стебла. Широкий кінець наконечника піпетки розміром 1000 мкл використовували для видалення агарового диска з зовнішнього краю культури *S. sclerotiorum*. Потім наконечник поміщали над вирізаним черешком таким чином, щоб широкий кінець наконечника піпетки знаходився в контакт з основою і черешком і розрізаний кінець черешка знаходився в контакт з стороною міцелію агарової пробки. Невеликий шматок парафілму обертали навколо кінчика і стебла, щоб запобігти відпаданню. Інокульовані рослини інкубували в теплиці протягом 7-10 діб, щоб забезпечити розвиток хвороби перед оцінкою.

Тривалість ураження і тяжкість в'янення були зібрані як показники захворювання. Довжину коричневого або вибіленого ураження вимірювали за допомогою лінійки. Тяжкості в'янення оцінювалися за шкалою 0-5 де 0 вказує на повністю здоровий стан, а 5 вказує на мертву рослину.

У цілому 12 різних штамів PPFM у п'яти індивідуальних експериментах, кожен з яких повторювали три рази, тестувалися для пригнічення білої плісняви після застосування PPFM на листя (Таблиця 10). З цих штамів тільки NLS0020 і NLS0109, обидва з яких були в перших двох експериментах, мали значний вплив на довжину ураження або тяжкість в'янення, викликані патогенною інфекцією (Таблиця 11). У першому експерименті, який мав менший розмір вибірки, не було виявлено значних ефектів, але як NLS0020, так і NLS0109 зменшували довжину ураження білої плісняви і тяжкість в'янення на щонайменше 20 % у порівнянні з контролем. У другому експерименті NLS0020 зменшив довжину ураження на приблизно 30 % ($P=0,04$), але не справив значного впливу на тяжкість в'янення (зниження 10 %; $P=0,76$). NLS0109 зменшив довжину ураження на приблизно 40 % ($P<0,01$) та в'янення на приблизно 40 % ($P=0,06$). Для аналізу тест Даннета був проведений у функції "Fit Y by X" програмного забезпечення для статистичного аналізу SAS JMP v12.0. Контрольну групу для обробки листя, яка отримала тільки бактеріальну середовище для росту, було визначено як контрольну групу.

Таблиця 10

Довжина ураження (ДУ) і тяжкість в'янення білої плісняви після нанесення штаму PPFM на листя

Штам	ДУ $\pm$ SE	ДУ RTC (%)	В'янення $\pm$ SE	В'янення RTC (%)
Експеримент 1				
Контроль	100,42 $\pm$ 9,55	100,00	4,46 $\pm$ 0,26	100,00
NLS0020	74,50 $\pm$ 10,65	74,19	3,33 $\pm$ 0,39	74,67
NLS0071	84,79 $\pm$ 12,66	84,44	3,54 $\pm$ 0,41	79,37
NLS0109	79,17 $\pm$ 09,90	78,84	3,58 $\pm$ 0,41	80,26

Таблиця 10

Довжина ураження (ДУ) і тяжкість в'янення білої плісняви після нанесення штаму PPFM на листя

Штам	ДУ±SE	ДУ RTC (%)	В'янення ±SE	В'янення RTC (%)
Експеримент 2				
Контроль	106,04±11,18	100,00	4,13±0,34	100,00
NLS0020	74,17±8,67	69,94	3,71±0,35	89,90
NLS0071	94,38±10,77	89,00	4,12±0,32	101,01
NLS0109	64,38±10,81	60,71	2,92±0,45	70,71
Експеримент 3				
Контроль	45,00±6,12	100,00	2,19±0,33	100,00
NLS0017	55,33±7,12	123,00	2,83±0,32	129,00
NLS0037	50,63±7,02	112,50	2,19±0,38	100,00
NLS0089	45,16±6,52	100,35	1,94±0,33	88,57
Експеримент 4				
Контроль	63,75±8,16	100,00	3,22±0,33	100,00
NLS0046	54,22±9,33	85,05	2,34±0,33	72,82
NLS0064	67,81±9,07	106,37	2,88±0,34	89,32
NLS0066	59,38±9,03	93,13	2,56±0,35	79,61
Експеримент 5				
Контроль	79,38±7,52	100,00	3,72±0,30	100,00
IP0021	97,26±7,35	122,53	4,39±0,21	117,97
IP0121	95,78±6,77	120,67	4,16±0,17	111,76
IP0237	84,38±6,58	106,30	4,16±0,24	111,76

Таблиця 11

Аналіз контролю білої плісняви за допомогою штамів PPFM

Штам	ДУ(% контроль)	ДУ, Р-значення	В'янення (% контроль)	В'янення, р-значення
NLS0071	11,00	0,6975	-1,01	0,9996
NLS0020	30,06	0,0429	10,10	0,7625
NLS0109	39,29	0,0053	29,29	0,0589

Застосування штаму PPFM NLS0109 на листя знижувало симптоми як довжини ураження, так і в'янення сої, викликані патогеном білої плісняви *Sclerotinia sclerotiorum*. Застосування цього штаму може бути використане як автономна обробка для пригнічення білої плісняви. Крім того, NLS0109 може бути змішаний з хімічними або біологічними інструментами управління захворюваннями в рамках комплексного підходу до управління захворюваннями. Такі комбінації можуть бути використані для збільшення та/або продовження ефективності продукту і як частина програми управління стійкістю.

Приклад 3. Пригнічення сірої плямистості листя за рахунок *Methylobacterium* spp. у поєднанні та порівнянні зі звичайними фунгіцидами

Сіра плямистість листя, викликана патогенним аскоміцетним грибом *Cercospora zeae-maydis*, є серйозним захворюванням польової кукурудзи. Хоча в комерційній зародковій плазмі існують різні рівні стійкості до цього захворювання, повної стійкості немає. Сіра плямистість листя є багаторічною проблемою і особливо сильна протягом літ з високою відносною вологістю. Влітку 2016 року було сприятливим для сірої плямистості листя, причому тиск захворювання починався в червні і зберігався протягом всього вегетаційного періоду.

У цьому випробуванні було проведено тепличне дослідження для визначення ефективності штамів PPFM при застосуванні окремо, у поєднанні один з одним, або в поєднанні з низькими показниками мітки листового фунгіциду *Headline™* (активний інгредієнт - піраклостробін); BASF Corporation, Рісерч Трайєнгл, штат Північна Кароліна, США). Ці обробки порівнювали із застосуванням самого головного препарату, а також з іншими сільськогосподарськими відповідними фунгіцидними засобами і комбінаціями лікування, що містять піраклостробін як активний інгредієнт (таблиця 12).

PPFM/Промислові стандартні тепличні випробування

№	Обробка	Кількість	Терміни
1	Необроблений контроль	0 fl oz/акр	Н/Д
2	Headline™ - на листя	6 fl oz/акр	VT
3	Fortix™ ¹ - на листя	4 fl oz/акр	VT
4	Xanthion™ ² - в борозну	0,6 fl oz/акр компонента А 3,0 fl oz/акр компонента В	Посадка
5	Xanthion™ - в борозну Headline™ - на листя	0,6 fl oz/акр компонента А 3,0 fl oz/акр компонента В 6 fl oz/акр	Посадка VT
6	NLS0020 - в борозну	1,250 мл/акр	Посадка
7	NLS0020 - в борозну Headline™ - на листя	1,250 мл/акр 6 fl oz/акр	Посадка VT
8	NLS0109 - на листя	5,000 мл/акр	VT
9	NLS0109 - на листя Headline™ - на листя	5,000 мл/акр 6 fl oz/акр	VT VT
9	NLS0020 - в борозну NLS0109 - на листя	1250 мл/акр 5,000 мл/акр	Посадка VT
10	NLS0020 - в борозну NLS0109 - на листя Headline™ - на листя	1250 мл/акр 5,000 мл/акр 6 fl oz/акр	Посадка VT VT

¹ Fortix™ (Arysta Life Sciences, Кепі, штат Північна Кароліна, США)

² - Xanthion™ (BASF Corporation, Пісєрч Трайєнгл, штат Північна Кароліна, США)

Випробування було проведено у весняно-літньому періоді 2016 року з посівом кукурудзи на початку квітня та інокуляцією за два тижні до початку цвітіння. Інокулят наносили шляхом розміщення інфікованого патогеном кукурудзяного бадилля навколо основи кожної рослини, а потім збільшення відносної вологості всередині теплиці до 60-90 % протягом доби і більше 90 % вночі, причому температура коливалася від 70-82 °F. Для просування інфекції в цілях випробування використовувався гібрид кукурудзи, схильний до сірої плямистості листя (Sun Prairie 617RR). Оцінки захворювання приймали через 14, 21 і 28 діб після інокуляції, і остаточну вагу колосу визначали для кожної рослини.

Випробування було організовано як RCBD з 10 повторами. При обробці в борозну застосовувалися посадки за допомогою ручного розпилювача, а обсяги застосування зменшувалися до загальної площі горщика. Фунгіциди змішували і застосовували у відповідності з інструкціями з маркування. PPFMs поставляли у вигляді замороженого концентрату, який розморожували безпосередньо перед застосуванням. Додаткові насінини висаджували і обробляли для кожної групи обробки, щоб забезпечити наявність всього десяти повторностей для інокуляції. Через два тижні після пророщування розсаду кукурудзи переносили з лотків розсади до 2,5 галонних горщиків, в яких вони вирощувалися до кінця експерименту. Застосування на листя виконували на стадії росту VT з використанням заплічного розпилювача. Для запобігання дрейфу в теплиці, рослини в кожній групі обробки були виведені назовні і лікування було застосовано до всієї групи. Потім рослини повертали в теплицю і рандомізували в десять експериментальних повторностей.

Дані про захворювання були проаналізовані у JMP версії 12.0 (SAS Institute, Кепі, штат Північна Кароліна). Частота захворюваності і значення тяжкості, зібрані при кожній вибірці даних, були використані для розрахунку індексу захворювання [(частота×тяжкість)/100], а кумулятивна площа під кривою прогресування захворювання (AUDPC) була розрахована на три значення індексу захворювання для кожної обробки. Дані були проаналізовані з використанням функції "Fit Model" у JMP з "Rep" як випадковий ефект і "Treatment" як фіксований ефект. Post-hoc тест Т'юкі на рівні альфа 0,05 застосовувався для виконання поділу засобів між обробками (таблиця 13).

Обробку тільки PPFM не виконували на відміну від НОК (необробленого контролю) або від борозневої обробки Xanthion™. Xanthion™ являє собою комбінований продукт піраклостробіну і мікробіологічного інокулюючого штаму *Bacillus subtilis* MBI600; таким чином, штами PPFM

окремо діють аналогічно існуючому в даний час комерційному продукту, який об'єднує хімічний фунгіцид з мікробним агентом. Комбінація NLS0020-IF / NLS0109-F знижує захворюваності щодо НОК і рівні захворювання при цьому лікуванні не були суттєво відмінними від тих, які виникали при застосуванні фунгіциду на основі піраклостробіну (Headline™ та Fortix™) на листя. NLS0020-IF / Headline-F™ пригніченого захворювання до рівнів, аналогічних рівнів Xanthion-IF™/Headline-F™, Headline-F™ та Fortix-F™. Так як комбінація Xanthion™ / Headline™ вимагає двох застосувань піраклостробіну, аналогічних за ефективністю NLS0020 / Headline вказує, що застосування цього активного інгредієнта може бути відкинута на користь застосування PPFM без будь-яких несприятливих впливів на тяжкість захворювання.

Всі обробки NLS0109-F / Headline-F™ та NLS0020-IF / NLS0109-F+Headline-F™ мали найбільший вплив на пригнічення захворювання щодо НОК. Зокрема, ці способи лікування чисельно знижували захворювання до рівнів, більших, ніж при застосуванні Headline™ окремо, на 21- і 14-добових рейтингових інтервалах (Фіг. 4). Це вказує на потенціал застосування PPFM, зокрема, для застосувань NLS0109 на листя, зроблених у поєднанні з Headline™, для розширення вікна захисту, що забезпечується звичайними фунгіцидами, що використовуються для пом'якшення сірої плямистості листя.

Крім пригнічення захворювання, застосування PPFM мало сильний позитивний вплив на вагу качану (таблиця 12). Середня вага для всіх обробок PPFM склала 132,67 грам/качан, що майже на десять грамів вище, ніж у середньому 123,00 грам/качан необробленого контролю та лікування тільки фунгіцидами. Fortix™ окремо був єдиною фунгіцидною обробкою з ефектом аналогічним PPFM-обробці, і застосування NLS0020 в борозенці було особливо сприятливим для збільшення маси врожаю, забезпечуючи три з чотирьох отриманих найвищих мас.

Цей експеримент демонструє потенціал для використання PPFM в поєднанні зі звичайними фунгіцидами. PPFM можуть бути використані для підвищення ефективності продукту шляхом продовження вікна ефективного захисту, пропонованого наявними в даний час хімічними засобами, і шляхом надання альтернативного продукту для використання в управлінні стійкістю. Крім того, PPFM мали позитивний вплив на масу початку, що вказувало на потенціал для підвищення виходу при використанні окремо або в комбінації зі звичайними фунгіцидами.

Таблиця 13

Результати тепличного оцінювання сірої плямистості листя

Обробка	Вихід (грами/початок)	% відмінності від НОК	AUDPC	% відмінності від НОК	Порівняння LSMeans (тестТ'юкі)
НОК	120	0,00	39,55	0,00	A
Headline-F™	121	0,83	5,57	-85,92	BC
Fortix-F™	135	12,50	6,3	-84,07	BC
NLS0109-F	127	5,83	28,49	-27,96	A
NLS0109-F+Headline-F™	129	7,50	3,15	-92,04	C
Xanthion-IF™	116	-3,33	38,64	-2,30	A
Xanthion-IF™ / Headline-F™	123	2,50	5,67	-85,66	BC
NLS0020-IF	135	12,50	35,39	-10,52	A
NLS0020-IF / Headline-F™	138	15,00	7,72	-80,48	BC
NLS0020-IF/ NLS0109-F	131	9,17	16,44	-58,43	B
NLS0020-IF / NLS0109-F+Headline-F™	136	13,33	3,12	-92,11	C

Приклад 4. Польові випробування сірої плямистості листя влітку 2016

У 2016 році було проведено другий рік польових випробувань патології кукурудзи. Випробування були розміщені в місцях з природно високим рівнем інокуляту сірої плямистості листя і сприйнятливим гібридом кукурудзи (Sun Prairie 617RR) для полегшення інфікування сірою плямистістю листя. Було включено два тестові місця: Дана, штат Айова та Бетел, штат Міссурі. На кожній ділянці випробування проводили як рандомізований повний блок з шістьма повторами. Використовували стандартні місцеві агрономічні практики для застосування добрив, обробки ґрунту, міжрядь, популяції та боротьби зі шкідниками. Використовували стандартні методи боротьби з бур'янами та комахами, а насіння постачали кооператорам, попередньо обробленим стандартним пакетом обробки насіння фунгіцидом/інсектицидом (Acceleron™ 2016 Corn, Monsanto, Сент Луїс, штат Міссурі, США). Застосування фунгіцидів на листя проводилося

тільки в тому випадку, якщо вказано в протоколі дослідження. Шістнадцять обробок були включені до випробувань, у тому числі PPFM, застосовані окремо, PPFM, що застосовуються в комбінації, PPFM, що застосовувалися поряд з хімічними фунгіцидами, і тільки стандартні фунгіциди (таблиця 14). Композиції PPFM розбавляли до концентрації приблизно 10^9 КУО/мл і застосовували в кількостях, показаних в таблиці 14. Зібрані оцінки включали в себе ранню стадію та життєздатність, частоту і тяжкість сірої плямистості листя серед сезону, дату цвітіння, діаметр стебла, вилягання, кінцевий стан при збиранні, врожайність та вміст вологи. Дані щодо захворюваності та тяжкості від кожної дати оцінювання були об'єднані, щоб забезпечити значення індексу захворювання $[(\text{частота} \times \text{тяжкість})/100]$. Дані з кожного сайту аналізували окремо з використанням JMP v12.0 (SAS Institute, Кері, штат Північна Кароліна). Ефекти лікування на змінні, що представляють інтерес до відповіді, були визначені з використанням функції "Fit Model" з "Treatment", визначеним як фіксований ефект, і "Rep" як випадковий ефект. Розмежування середніх post-hoc здійснювали, використовуючи опцію "LSMeans Differences Student's T" у межах "Fit Model", а середні значення повідомляються як LSMeans з відповідної моделі. На ділянці Бетел, штат Міссурі, необроблений контроль мав найнижчу врожайність і підтримував найвищі рівні захворюваності та тяжкості захворювання сірої плямистості листя протягом періоду вегетації (таблиця 15). Обробка за допомогою NLS0109 забезпечила більше ніж на 10 бушелів/акр збільшення врожайності у порівнянні з необробленим контролем. Значення індексу захворювання для обох способів обробки з NLS0109 були значно нижчими ($P < 0,05$), ніж на необробленому контролі на перших двох датах оцінювання (12 серпня та 21 серпня), але на кінцеву дату оцінювання (28 серпня) тільки комбінація борозневої обробки NLS0020 з подальшою обробкою NLS0109 на листя, пригнічувало захворювання по відношенню до необробленого контролю (таблиця 15).

Таблиця 14

Польові випробування 2016 обробок сірої плямистості листя

№ обр.	Обробка(и)	Терміни застосування	Кількість
1	Необроблений контроль	Н/Д	Н/Д
2	Headline™	VT ¹	6,0 fl oz/акр
3	Fortix™	VT	4,0 fl oz/акр
4	Xanthion™	Борозневе @ під час посадки	0,6 fl oz/акр компонента А 3,0 fl oz/акр компонента В
	Headline™	VT	6 fl oz/акр
5	NLS0020	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
6	NLS0020	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	NLS0066	VT	5,0 л/акр
7	NLS0020	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	NLS0089	VT	5,0 л/акр
8	NLS0020	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	NLS0109	VT	5,0 л/акр
9	NLS0020	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	Headline™	VT	6 fl oz/акр
10	NLS0020	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	Fortix™	VT	4,0 fl oz/акр
11	NLS0021	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
12	NLS0021	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	NLS0066	VT	5,0 л/акр
13	NLS0021	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	NLS0089	VT	5,0 л/акр

Таблиця 14

Польові випробування 2016 обробок сірої плямистості листя

№ обр.	Обробка(и)	Терміни застосування	Кількість
14	NLS0021	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	NLS0109	VT	5,0 л/акр
15	NLS0021	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	Headline™	VT	6,0 fl oz/акр
16	NLS0021	Борозневе @ під час посадки	1,25 л/акр
	Fortix™	VT	4,0 fl oz/акр

¹ Стадія розвитку VT: остання гілка кисті повністю видна, але шовку не видно

Таблиця 15

Результати польових випробувань сірої плямистості листя влітку 2016 - Бетел, штат Міссурі

Обробка	Врожай	Індекс 12 серпня	Індекс 21 серпня	Індекс 28 серпня
Необроблений контроль	141,77 ¹ C ²	7,25A	20,83 A	24,83 A
NLS0020	149,93 BC	4,85 B	15,27 B	21,33 AB
NLS0020/NLS0066	161,20 AB	2,83 C	12,28 BCD	20,07 BC
NLS0020/NLS0089	159,88 AB	2,08 CD	12,37 BCD	18,53 BC
NLS0020/NLS0109	155,15 ABC	2,65 CD	10,97 CD	19,07 BC
NLS0020/Fortix™	160,32 AB	0,38 F	1,78 E	8,55 D
NLS0020/Headline™	161,62 AB	0,83 EF	2,17 E	5,88 D
NLS0021	157,32 AB	4,00 B	13,15 BC	19,88 BC
NLS0021/NLS0066	159,47 AB	1,57 DE	8,87 D	16,3 C
NLS0021/NLS0089	152,57 BC	2,18 CD	11,3 BCD	20,58 ABC
NLS0021/NLS0109	153,40 ABC	2,45 CD	11,62 BCD	20,88 AB
NLS0021/Fortix™	164,22 AB	0,25 F	1,03 E	6,28 D
NLS0021/Headline™	167,23 A	0,23 F	1,57 E	4,83 D
Fortix™	161,62 AB	0,4 F	1,5 E	7,23 D
Headline™	163,78 AB	0,42 F	1,2 E	5,57 D
Xanthion™	167,27 A	0,17 F	0,9 E	5,52 D

¹ Вказані значення є середнім значенням з шести повторюваних ділянок на одну обробку

² Середні значення, що супроводжуються однією великою літерою, не відрізняються значно один від одного за допомогою різниць LSMeans (альфа=0,05)

Приклад 5 Виявлення метилобактеріальних ізолятів на цільових культурах

Розкрито аналізи для виявлення специфічних штамів *Methylobacterium* і тісно пов'язаних похідних на цільових культурах.

Аналіз заснований на qPCR закритої нуклеїнової кислоти (LNA) для NLS109 проводили наступним чином. Послідовність геномної ДНК NLS109 порівнюють за допомогою аналізу BLAST приблизно 300 п.о. фрагментів з використанням ковзаючого вікна від 1-25 нуклеотидів до цілих геномних послідовностей понад 1000 загальнодоступних і власних ізолятів *Methylobacterium*. Виявлено фрагменти геномної ДНК, які мали слабе вирівнювання BLAST, що свідчить про приблизно 60-95 % ідентичності усього фрагмента, до відповідних фрагментів з NLS0109. Цільові фрагменти з геному NLS0109, що відповідають ідентифікованим слабким областям вирівнювання, які були відібрані для розробки аналізу, представлені як SEQ ID NO: 9-11.

Послідовності цільового фрагмента NLS0109

Фрагмент	SEQ ID NO	Послідовність
refl_135566	g	ACGGTCACCCACGGACTGGGCGAGTACCTCACCGGTGTTCTATCATAAC GCCGAGTTAGTTTTGACCGTCCCTTATGCGATGTACCACCGGTGTCGGC AGCCGATTTCTGTCACCGGGAGCTGGCGTTCCGGTTCAGACCACCATCA TCGGTCACGATGTCTGGATTGGACACGGGGCCCTTCATCTCCCCGGCGTG ACTATAGGAAACGGCGCGATCGTCGGGGCCCAGGCGGTCTGTCACAAGA GATGTCCACCCCTATGCGGTAGTTGCTGGCGTCCCCGCGACCGTACGACG AT
refl_135772	10	CCAATAAAAGCGTTGGCCGCCTGGGCAACCCGATCCGAGCCTAAGACTC AAAGCGCAAGCGAACACTTGGTAGAGACAGCCCGCGACTACGGCGTTC CAGCACTCTCCGGCTTTGATCGGATAGGCATTGGTCAAGGTGCCGGTGG TGATGACCTCGCCCGCCGCAAGCGGCGAATTACTCGGATCAGCGGCCAG CACCTCGACCAAGTGTCGGAGCGCGACCAAAGGGCCACGTTTCGAGGACG TTTGAGGCGCGACCACTCTCGATAGTCTCATCGTCGCGGCGAAGCTGCA CCTCGA
refl_169470	11	CGATGGCACCGACCTGCCATGCCTCTGCCGTCCGCGCCAGAATGGTAAA GAGGACGAAGGGGGTAAGGATCGTCGCTGCAGTGTTGAGCAGCGACCA GAGAAGGGGGCCGAACATCGGCATCAAACCTCGATTGCCACTCGGACGC GAAGCGCGTCTTGAAGGAGGGATGGAAGCGAAACGGCCGAGAGTAAC CGCCGACGAAAGATTGCACCCCTCATCGAGCAGGATCGGAGGTGAAGGC AAGCGTGGGTTATTGGTAAGTGCAAAAAATATAATGGTAGCGTCAGATC TAGCGTTC

Відбирали ділянки в SEQ ID NO: 9-11, де відповідні ділянки в інших штаммах *Methylobacterium* були ідентифіковані як такі, що мають одну або більше невідповідностей нуклеотидів від послідовності NLS109, і праймери qPCR, розроблені з використанням програмного забезпечення Primer3 (Untergasser et al., 2012, Koressaar et al., 2007) для фланкування невідповідностей ділянок, мають температуру плавлення (T_m) в діапазоні 53-58 градусів, і для створення ДНК-фрагментів ПЛР, розміром приблизно 100 п.о. Послідовність зонда була розроблена з репортерним барвником 5' FAM, гасителем 3' Iowa Black FQ і містила від однієї до шести основ LNA (Integrated DNA Technologies, Коралвілл, штат Айова). Шонайменше 1 основа LNA знаходиться в положенні невідповідності, в той час як інші основи LNA використовуються для підняття T_m. T_m послідовності зонда задана таким чином, щоб бути на 10 градусів вище T_m праймерів.

Послідовності праймера і зонда для специфічного виявлення NLS0109 представлені як SEQ. ID NO: 12-20 в таблиці 17. Кожен з зондів містить репортерний барвник 5' FAM та гаситель 3' Iowa Black FQ.

Таблиця 17

Послідовності праймерів і зондів для специфічного виявлення NLS0109

Праймер/Зонд	SEQ ID NO	Послідовність*
NLS0109_refl_135566 _прямий	12	CCTCACCGGTGTTCTATCATAAC
NLS0109_refl_135566 _зворотній	13	CCGATGATGGTGGTCTGAAC
NLS0109_refl_135566 _зонд	14	CGTCCCTTATGCGATGTACCA
NLS0109_refl_135772 _прямий	15	GATCCGAGCCTAAGACTCAAAG
NLS0109_refl_135772 зворотній	16	GACCAATGCCTATCCGATCAA
NLS0109_refl_135772_ зонд	17	AACACTTGGTAGAGACAGCC
NLS0109_refl_169470 _прямий	18	AAGGAGGGATGGAAGCGAAAC
NLS0109_refl_169470 _зворотній	19	ATAACCCACGCTTGCCTTC
NLS0109_refl_169470 _зонд		CGCAGAGTAACCGCCGACGAA

*Жирний шрифт і підкреслені літери являють собою положення основ LNA

Застосування наборів праймерів/зондів на виділеній ДНК для виявлення NLS0109 і розрізнення від споріднених ізолятів *Methylobacterium*

5 Реакцію qPCR проводили в 20 мкл і вона містила 10 мкл 2х зондів KiCqStart™ qPCR ReadyMix™, Low ROX™ від Sigma (кат. № KCQS05-1250RXN), 1 мкл 20х суміші праймера-зонда (кінцева концентрація праймерів становить 0,5 мМ кожного, а кінцева концентрація зонду становить 0,25 мМ) і 9 мкл ДНК-матриці/води. На кожну реакцію використовують приблизно 30-40 нг ДНК-матриці. Реакцію проводять на апараті Stratagene Mx3005P qPCR з наступною

10 програмою: 95 °C протягом 3 хв, потім 40 циклів при 95 °C протягом 15 сек. та 60 °C протягом 1 хв. Програмне забезпечення MxPro на комп'ютері обчислює порогове значення та значення Ct для кожного зразка. Кожен зразок виконували в трьох повторностях на тому же планшеті qPCR. Позитивний результат показують, де дельта Ct між позитивним і негативним контролем дорівнює щонайменше 5.

15 Використання трьох наборів праймер/зонд для розрізнення NLS0109 від споріднених ізолятів шляхом аналізу виділеної ДНК показано в Таблиці 18 нижче. Оцінка подібності, показана для споріднених ізолятів, враховує як середню ідентичність нуклеотидів, так і вирівнювальну фракцію між ізолятами і NLS0109. Один з тестованих штамів NLS0730 використовували в якості додаткового позитивного контролю. Він був виділений з культури

20 NLS0109, підтверджений повним секвенуванням геному як ідентичний NLS0109, і отримав позитивний результат у всіх трьох реакціях. Оцінка подібності, що перевищує 1000 для цього штаму, ймовірно, є результатом децю іншої збірки геному для цього ізоляту порівняно з NLS0109. Дельта Ct, що дорівнює приблизно 15 або більше між ізолятами NLS0109 і NLS0730 і контролем на основі тільки води узгоджується з підтвердженням послідовності ідентичності цих

25 ізолятів. Аналіз інших ізолятів, які менш тісно споріднені з NLS0109, призводить до значень дельта-Ct, аналогічних значенням для контролю на основі тільки води.

Таблиця 18

№ NLS	Оцінка подібності до NLS0109	Середнє значення Ct		
		Refl_135566	Refl_135772	Refl_169470
NLS0730	1,005	21,08	21,31	20,35
NLS0109	1	21,97	22,62	22,08
NLS0731	0,181	Без Ct	37,85	>37,91
NLS0644	0,87	>36,8	>38,31	Без Ct
NLS0700	0,88	>38,36	>38,36	>38,44

Таблиця 18

№ NLS	Оцінка подібності до NLS0109	Середнє значення Ct		
		Refl_135566	Refl_135772	Refl_169470
NLS0710	0,894	Без Ct	>37,47	>38,13
NLS0834	0,852	37,81	Без Ct	37,97
NLS0939	0,862	37,94	38,37	>38,35
NLS0947	0,807	38,44	Без Ct	Без Ct
NLS1015	0,894	38,77	Без Ct	>37,91
NLS1217	0,872	37,64	37,20	37,96
Тільки H ₂ O		>38,14	>35,92	>37,12

Використання праймера/зонда для виявлення NLS109 на оброблених рослинних матеріалах.

Виявлення NLS0109 на змивах насіння з обробленого насіння сої.

- 5 NLS0109 можна виявити і виділити з інших ізолятів метилобактерій на обробленому насінні сої наступним чином. Насіння сої обробляли ізолятами метилобактерій з 10х заморожених гліцеринових стокових культур для отримання кінцевої концентрації, що дорівнює 10⁶ КУО/насіння. Полімер Becker Underwood Flo Rite 1706 використовували для поліпшення адгезії. Використовували неінокульований контроль, що містить полімер і воду. ДНК виділяли з
- 10 насіння наступним чином. Приблизно 25 мл обробленого насіння занурювали протягом 5 хвилин в 20 мл 0,9 % стерильного фізіологічного розчину. Пробірки розкручували на вортексі протягом 15 хвилин, після чого змив з насіння переносили в нову пробірку. До того ж насіння додають 10 мл 0,9 % стерильного фізіологічного розчину, короткочасно розкручують на вортексі об'єднують з попереднім змивом насіння. Рідину змиву насіння центрифугували. Сипучу
- 15 гранулу зберігали і переносили у менші пробірки, при цьому супернатант відкидали. Зразок знову центрифугували, і кінцевий зразок отримували у вигляді приблизно 100 мкл пухкого осаду. 100 мкл осаду використовували як вхідну кількість для екстракції ДНК з використанням комплексу екстракції мікробної ДНК MOBio UltraClean кат. № 12224-250. Як показано в таблиці 19, NLS0109 і NLS0730, виявляються в змивах насіння від обробленого насіння сої з
- 20 використанням всіх 3 наборів зондів та праймерів, як продемонстровано дельта Ct більше 10 порівняно зі значеннями Ct негативних контролів.

Таблиця 19

Обробка	Оцінка подібності до NLS0109	Середнє значення Ct		
		Refl_135566	Refl_135772	Refl_169470
NLS0109	1	18,07	17,49	17,95
контроль (тільки полімер)	Н/Д	34,80	33,72	33,59
NLS0730	1,005	17,76	17,03	17,54
NLS0731	0,181	33,67	32,70	32,43

Виявлення NLS0109 на листках з рослин, вирощених з обробленого насіння сої.

- 25 Насіння сої обробляли ізолятами метилобактерій NLS0109, NS0730 та NLS0731 з 10х заморожених гліцеринових стокових культур для отримання кінцевої концентрації, що дорівнює 10⁶ КУО/насіння. Полімер Becker Underwood Flo Rite 1706 використовували для поліпшення адгезії. Неінокульований контроль містив полімер і воду. Насіння висаджували в польову ґрунтову суміш, поміщали в ростову камеру протягом приблизно двох тижнів і поливали незаплідненою водою RO кожні 1-2 доби, щоб утримувати ґрунт вологим. Після 2 тижнів росту справжні листя з близько 9 рослин збирали в стерильні пробірки. Кожна обробка мала щонайменше 2 повторення в кожному експерименті, і кожен експеримент вирощували щонайменше 3 рази.

- 35 ДНК з бактерій на зібраних листках виділяли наступним чином. Листя занурювали протягом 5 хвилин в буфер, що містить 20 mM Tris, 10 mM EDTA та 0,024 % Triton X-100. Пробірки розкручували на вортексі протягом 10 хвилин і потім обробляли ультразвуком протягом двох 5-хвилинних обробок (всього 10 хвилин). Тканину листя видаляли, а решту рідини центрифугували. Сипучу гранулу зберігали і переносили у менші пробірки, при цьому супернатант відкидали. Зразок знову центрифугували, і кінцевий зразок отримували у вигляді
- 40 приблизно 100 мкл пухкого осаду. 100 мкл осаду використовували як вхідну кількість для

екстракції ДНК з використанням комплексу екстракції мікробної ДНК MOBio UltraClean кат. № 12224-250. Середній вихід ДНК становив 50-60 нг/л в 30 мкл. Як показано в таблиці 20, NLS0109 і NLS0730, виявлені на листках, зібраних з рослин, вирощених з насіння сої, обробленого штамми метилобактерій, з використанням всіх 3 наборів зондів з праймерів, як показано за допомогою значень дельта Ct близько 5.

Таблиця 20

Середнє з 3 експериментів кожен з 3 біологічними повторностями

Обробка	Оцінка подібності до NLS0109	Середнє значення Ct		
		Refl_135566	Refl_135772	Refl_169470
NLS0109	1,000	35,00	34,67	34,00
Контроль (тільки полімер)	Н/Д	39,67	39,67	39,33
NLS0730	1,005	35,00	35,00	34,00
NLS0731	0,181	40,00	39,67	40,00

Для виявлення NLS0109 на листках кукурудзи: Необроблене насіння кукурудзи висаджували в польовий ґрунт у ростовій камері і поливали незаплідненою водою зі зворотного осмосу Після того, як рослини проросли і вирости протягом приблизно 3 тижнів, їх переносили в теплицю. На стадії V5 рослини були розділені на 3 групи для обробки: розпилення на листя NLS0109, розпилення на листя контролем і необроблені. Рослини, які отримували розпилення на листя NLS0109, обробляли 10-кратною гліцериновою стоковою культурою з розрахунку 71,4 мкл на рослину з використанням розпилювачів Solo. Це конвертується на кількість 10 л/акр в полі. Контрольні оброблені рослини обприскували 71,4 мкл води/рослина. Необроблені рослини не отримували розпилення на листя. Листі збирали через два тижні після розпилення на листя в стерильні пробірки і ДНК з бактерій на зібраних листках виділяли, як описано вище. Кожен експеримент вирощували щонайменше 2 рази. Як показано в таблиці 21, NLS0109 виявляється на листках, зібраних з рослин кукурудзи, оброблених методом розпилення на листя штамми метилобактерій, з використанням всіх 3 наборів зондів з праймером, як показано значеннями дельта Ct приблизно 10 між зразком і негативними контролюми.

Таблиця 21

Обробка	Середнє значення Ct		
	Refl_135566	Refl_135772	Refl_169470
Контроль (без обробки)	32,43	32,10	31,55
Контроль (контрольна обробка)	35,54	35,34	34,80
NLS0109 (10 л/еквівалент акрів)	23,36	22,88	22,66

Вищенаведені результати демонструють використання специфічних для генома праймерів і зондів для виявлення штаму метилобактерії NLS0109 на різних тканинах рослин після обробки штамми і передбачають способи для розрізнення NLS0109 від близько споріднених ізолятів. Аналогічні способи розроблені для додаткових штамів метилобактерій, NLS0020, NLS0017 і NLS0089 з використанням фрагментів цільової послідовності і пар праймер/зонд, як показано в таблицях 22-27 нижче.

Таблиця 22

Послідовності цільового фрагмента NLS0020

Фрагмент	SEQ ID NO	Послідовність
ref3_25009	21	GCCCTTCTGTCAGGCGATATTGTATAATGGCGTTGCCCCAATAGAAGCAG CCATTCGTGCGAGGGCAGCAGCGACGCTAGGTCGAAAGAGCATCCTAAT CTCGATCAAGATGCGACTGAGATTCTGATGAAAATATCTAGACACAAGC AAAGCTGGTGAAATTACAACGATCATGGCGACAATTGCGGCCAATTCGG CCGGAACTTGAAGGAACATAAAAAATGAATATTACAAATATACCGCAAAG CATGTAGAGTTGCTACACCAAGGGTTCGGGACGTCCAAAAAACTCACTG AGGA
ref3_25219	22	GGAACATAAAAAATGAATATTACAAATATACCGCAAAGCATGTAGAGTTG CTACACCAAGGGTTCGGGACGTCCAAAAAACTCACTGAGGAAGTCGACT GGAAGCACGAGGGCGCCCCCCCCAGGAGCGGGGCGACCGGCAAGGGGG CCCCGAATTGTCGCCATGATCGACCAGCTTAGGTAGGATCCTCTTCGAC CTAACGAATGGCTGCTTCTATTGGGGCAACGCCATTATACAATATCGCCT GACCATCTGGAACGCGGCCCGGTCCACCGGCAGGTTGGCGACGACAGC GTCGGAG
refl_4361220	23	CGGCGTCGACCAGCCGGGCGAACTGCTTGGGCATGCTCTCCCGCGACGC CGGCCACAGCCGCGTCCCCGTCCCTCCGCACAGGATCATCGGGTGGATTT GAAAGGCAAAACGGGACATCAGGATAGGCCGCTCAGGCGTTGGCGCTG AGGCGCTTGATGTGCGCGTCGACCATCTCGGTGATCAGCGCCTCGAGGC TGGTCTCGGCCTCCAGCCGAAGGTCGCCTTGGCCTTGGCGGGGTTGCC CAGCAGCACCTCGACCTCTGCCGGCCGGAACAGCGCCGGGTCGACGATC AGGTGG
refl_4602420	24	CTGGACATGCGCCACCCCGGCCAAGTCCGACCGCACCGGCAACCGCTC CTGTAGTCGTGTCATCGTTCTACCCCTGAGGCGGAGACCGTCCGCTAA CGGGGTGTCTCAAGCAACCGTGGGGCGGAGGAACACGCACGTAGTCGC GTTTCAAGGTTGCGACGAACGCCCTCGGCCATGCCGTTGCTCTGCGGGCTC TCCAGCGGCGTCGTTTTTGGCACCAACCAAGGTCGCGGGCGAAGCGGC GCGTGTGCGGGGACTGTCAGGAATTCGTGTGGGGGCGGCCATAGTG GATCCG

Таблиця 23

Послідовності праймерів і зондів для специфічного виявлення NLS0020

Праймер/Зонд	SEQ ID NO	Послідовність*
NLS0020_ref3_25009_5'	25	CACAAGCAAAGCTGGTGA
NLS0020_ref3_25009_3'	26	AAGATATGCTTTGCGGGTA
NLS0020_ref3_25009_зонд	27	CGATCATGGCGACAATTG
NLS0020_ref3_25219_5'	28	CAATATCGCCTGACAGAAGG

Таблиця 23

Послідовності праймерів і зондів для специфічного виявлення NLS0020

Праймер/Зонд	SEQ ID NO	Послідовність*
NLS0020_ref3_25219_3'	29	CACTTCAACAAAGGCGATCA
NLS0020_ref3_25219_3ОНА	30	TTGG <u>CGACGAC</u> AGC
NLS0020_refl_4361220_5'	31	ACTGCTTGGGCATGCTCTC
NLS0020_refl_4361220_3'	32	CCTATCCTGATGTCCCGTTT
NLS0020_refl_4361220_3ОНА	33	A <u>GGATCATCGG</u> GTGGATTTG
NLS0020_refl_4602420_5'	34	AGGAACACGCACGTAGTC
NLS0020_refl_4602420_3'	35	CCACACGAAATTCCTGAC
NLS0020_refl_4602420_3ОНД	36	TGG <u>CA</u> CCAA <u>AC</u> CA

*Жирний шрифт і підкреслені літери являють собою положення основ LNA

Таблиця 24

Послідовності цільового фрагмента NLS0017

Фрагмент	SEQ ID NO	Послідовність
ref4_930	37	GCAAAACGACCTAATAGTTCTACAGCGGCATGCGCCAAGTCAGCGCGGT GAACAGTATACCTGGGAGCAACTTGTCTCCGAAACCCACATAAAACAAA TTACTCCTGGCAGTGCCAGTCCATCAAATCGAATACAATATTTCTCGA GGAGGCATCTGTAATAGCCTGCCAAAGCAACAAAGCTATGGCGCCGTTA TGACTTTCATTGCTTCTGGTAGACATAAAATAATATGCCGATTTGTGATCC CAAATGTAGAATATTGCCGCATCAATTGCGCCAAGTTTATTTCCGGATCGA T
refl_142021	38	GGCGCCAACGGTATGATCGCATGATTTTCCTGCGGCATAGCTTGCGGGA ATGGCGTATTTGGCGCTCTCCTCAGGAATTTCTAAGGGCATAACGCAGGAA CTCTACAGCACTTTTACTGGTATTTTGTAGTGACAGCGGAGGAGGCTGGT GCTCAAGGTAATCGTGATGAAGTGATCCGGGCCATTGCGGGCGCGTTTC TAGTCTTCCAATCCGCGCCCTGTACCACGTATTACGCCGGACCGGTCTG CGCCGCGCCGCCCTCTTGACCGCCCTAAATGTCTAAGAGCGTCTAACAAA GC
refl_142636	39	GACGATATCGCTCATCTTCACTGCATTGAAGCTGGTGCCGTAATGCATAG GGATGAAAAAGTGATGCGGATAGACGGCTGACGGGAAAGCGCCTGGTC GATCGAAGACTTTGCTGACGAGGTTGTGGTAGCCCCGGATATAGGCATC GAAGGCCGGGACGTTGATCCCATCCTTTGCCTTATCTTGACTGGCGTCGT CGCGTGCCGTGAGAACGGGCACGTCGCAGGTCATCGAGGCCAGCACCTT GCGGAACACCTGCGTTCCGCCGTTGGGATTATCGACGGCGAACGCGGTG GCCGC

Таблиця 25

Послідовності праймерів і зондів для специфічного виявлення NLS0017

Праймер/Зонд	SEQ ID NO	Послідовність*
NLS0017_ref4_930_прямий	40	GTCCTCCGAAACCCACATAAA
NLS0017_ref4_930_зворотній	41	CTACCAGAAGCAATGAAAGTCAT
NLS0017_ref4_930_зонд	42	TCTGTAATAGCCTGCC <u>CAA</u> AGCA
NLS0017_refl_142021_прямий	43	GGCTGGTGCTCAAGGTAAT
NLS0017_refl_142021_зворотній	44	ACATTTAGGGCGGTCAAGAG
NLS0017_refl_142021_зонд	45	ATGA <u>AGT</u> GATCCGGGCCAT
NLS0017_ref1_142636_прямий	46	CCGTAAGTGCATAGGGATGAAA
NLS0017_refl_142636_зворотній	47	TAAGGCAAAGGATGGGATCAA
NLS0017_refl_142636_зонд	48	TTGCTGACGAGGTT <u>GT</u> GGTAG

*Жирний шрифт і підкреслені літери являють собою положення основ LNA

Таблиця 26

Послідовності цільового фрагмента NLS0089

Фрагмент	SEQ ID NO	Послідовність
refl_194299	49	GGAAATCGGCTTCAAGTACGACGTACGCGCCGGCCATGCAGGTCACGGGT GCACTGTTCAATCTCGAGCGCGACAACCAGCCGTTCCCTCGAACGTGGA GTCCGGCCTCGTCTTGGCGCAGGTCAGACACGCACCCAGGGCGCGGAA ATCGGCCTGGCCGGCTATCTAACCGATTGGTGGCAGGTCTTTGGCGGCT ACGCTTATACCGAGGCACGCGTACTCTCGCCACTGGAAGACGATGGAGA CGTGATCGCAGCAGGTAATCTCGTCGGCAACGTTCCGCTAAATACTTTCA GTCT
refl_194305	50	CGGCCTGGCCGGCTATCTAACCGATTGGTGGCAGGTCTTTGGCGGCTAC GCTTATACCGAGGCACGCGTACTCTCGCCACTGGAAGACGATGGAGACG TGATCGCAGCAGGTAATCTCGTCGGCAACGTTCCGCTAAATACTTTAGT CTGTTCAACAAGTTCGATATCAACGAGAATTTCTCCGTTGCTCTGGGCTAT TACTATCAGGATGCCAGCTTTGCCTCCTCAGACAATGCAGTGCGTTTGCC AAGTTATTCGCGGTTTCGATGGCGGGTTGTTCTATCGATTGACGAGTTGA C
refl_194310	51	ACGTTCCGCTAAATACTTTAGTCTGTTCAACAAGTTCGATATCAACGAG AATTTCTCCGTTGCTCTGGGCTATTACTATCAGGATGCCAGCTTTGCCTCC TCAGACAATGCAGTGCGTTTGCCAAGTTATTCGCGGTTTCGATGGCGGGTT GTTCTATCGATTGACGAGTTGACACGCGTTTCAGCTTAGCGTCGAGAACA TTTTCGACAGGCGTTACATCATCACTCCAACAACAACAACCTCACG CCTGGCGCGCCGAGAACAGTCCGCGTGCAATTGATCGCTCGGTTCTAAA

Таблиця 27

Послідовності праймерів і зондів для специфічного виявлення NLS0089

Праймер/Зонд	SEQ ID NO	Послідовність*
NLS0089_ref1_194299_прямий	52	TTTGGCGGCTACGCTTATAC
NLS0089_ref1_194299_зворотній	53	AACGTTGCCGACGAGATTAC
NLS0089_ref1_194299_зонд	54	AGACGATGGAGACGTGATCGCA
NLS0089_ref1_194305_прямий	55	GGCAACGTTCCGCTAAATAC
NLS0089_ref1_194305_зворотній	56	AAAGCTGGCATCCTGATAGT
NLS0089_ref1_194305_зонд	57	CGAGAATTTCTCCGTGCTCTG
NLS0089_ref1_194310_прямий	58	CGATGGCGGGTTGTTCTAT
NLS0089_ref1_194310_зворотній	59	AGGCGTGAGGTTGTTGTT
NLS0089_ref1_194310_зонд	60	AGGCGTTACATCATCAACTCCA

*Жирний шрифт і підкреслені літери являють собою положення основ LNA

Приклад 6 Польові випробування сірої плямистості листя влітку 2017

- Ефект обробки метилобактерією на захворювання кукурудзи сірою плямистістю листя оцінювали в польових дослідах кукурудзи. Випробування проводили як рандомізований повний блок з шістьма повторами. Використовували стандартні місцеві агрономічні практики для застосування добрив, обробки ґрунту, міжрядь, популяції та боротьби зі шкідниками. Використовували стандартні методи боротьби з бур'янами та комахами, а насіння постачали кооператорам, попередньо обробленим стандартним пакетом обробки насіння фунгіцидом/інсектицидом (Acceleron™ 2016 Corn, Monsanto, Сент Луїс, штат Міссурі, США). Застосування фунгіцидів на листя проводилося тільки в тому випадку, якщо вказано в протоколі дослідження и представлено в таблиці нижче. Коли насіння було попередньо оброблено метилобактерією, воно було забезпечене композицією, що складається з 10^9 - 10^{10} КУО/мл для забезпечення приблизно 10^6 КУО/насінина. Для борозневого застосування та застосування на листя, композиції PPFM розбавляли до концентрації приблизно 10^9 КУО/мл і застосовували в кількостях, показаних в таблицях нижче.

- В одному випробуванні оцінювали обробку NLS0109 в комбінації з NLS0017 або NLS0020. Штами застосовували або як обробку насіння, або для борозневого застосування. Визначення результатів тяжкості захворювання і врожаю представлені в таблиці 28 нижче. Борозна обробка NLS0109/NLS0017 забезпечила збільшення врожаю до 15 бушелів/акр у порівнянні з необробленим контролем. Обробка насіння за допомогою NLS0109/NLS0020 забезпечила більше ніж на 10 бушелів/акр збільшення врожайності у порівнянні з необробленим контролем. Кожен з цих способів лікування призводив до врожаю, який був приблизно таким же (або трохи збільшеним), як для кукурудзи, обробленої Fortix (стробілуридин пліостріазол).

Таблиця 28

Зменшення хвороби сірої плямистості листя за рахунок комбінації штамів PPFM

GSF-04 2017	Застосування	Врожай (бушелів/акр)	Тяжкість СПЛ
Без. обр.		221	6,3
NLS 17/109 0,625 л/акр	Борознаве	236	7,9
NLS 20/109 0,625 л/акр	Борознаве	222	7
NLS 17/109	Обробка насіння	222	7,9
NLS 20/109	Обробка насіння	232	7,6
Fortix 4,5 fl oz/акр	Борознаве	228	5,9
Monsoon 4,5 fl oz/акр	На листя @ VT	237	6,7
Headline 10 fl oz/акр	На листя @ VT	254	4,9
Середнє		231	6,775

- У другому дослідженні NLS0089 і NLS0109 застосовувалися при різних нормах нанесення окремо або в комбінації з комерційними фунгіцидами, які також застосовувалися в різних кількостях. Всі застосування відбувалися методом розпилення на листя на стадії розвитку VT.
- 5 Визначення результатів тяжкості захворювання і врожаю представлені в таблицях 29 та 30 нижче.

Таблиця 29

NLS 89 і 109, застосовані у поєднанні з Headline (піраклостробін)

	Кількість для застосування	бушелі/ак Р	Тяжкість СПЛ
Без. обр.		241	42,3
Headline 0,5	4 oz/акр	253	17,7
Headline 1,0	8 oz/акр	257	19,4
NLS 89 1,0	2,5 л/акр	232	32,9
Headline 0,5/NLS 89 1,0	4 oz/акр 2,5 л/акр	248	20,2
Headline 1,0/NLS 89 1,0	8 oz/акр 2,5 л/акр	249	21,1
NLS89 0,5	1,25 л/акр	238	41,9
Headline 0,5/NLS 89 0,5	4 oz/акр 1,25 л/акр	249	21,4
Headline 1,0/NLS 89 0,5	8 oz/акр 1,25 л/акр	258	18,9
NLS 109 1,0	2,5 л/акр	241	40,6
Headline 0,5/NLS 109 1,0	4 oz/акр 2,5 л/акр	254	20,8
Headline 1,0/NLS 109 1,0	8 oz/акр 2,5 л/акр	258	18,4
NLS 109 0,5	1,25 л/акр	229	43,4
Headline 0,5/NLS 109 0,5	4 oz/акр 1,25 л/акр	254	23,8
Headline 1,0/NLS 109 0,5	8 oz/акр 1,25 л/акр	243	17,1

Таблиця 30

NLS 89 і 109, застосовані у поєднанні з Monsoon (тебуконазол)

		бушелі/акр	Тяжкість СПЛ%
Без. обр.		231	49,9
Monsoon 0,5	2 oz/акр	231	43,0
Monsoon 1,0	4 oz/акр	237	43,2
NLS 89 1,0	2,5 л/акр	231	41,3
Mon 0,5 /89 1,0	2 oz/акр 2,5 л/акр	236	37,8
Mon 1,0 /89 1,0	4 oz/акр 2,5 л/акр	239	40,8
NLS 89 0,5	1,25 л/акр	234	47,6
Mon 0,5 /89 0,5	2 oz/акр 1,25 л/акр	232	45,2
Mon 1,0/89 0,5	4 oz/акр 1,25 л/акр	234	34,2
NLS 109 1,0	2,5 л/акр	238	41,1
Mon 0,5 /109 1,0	2 oz/акр 2,5 л/акр	232	41,3
Mon 1,0/109 1,0	4 oz/акр 2,5 л/акр	233	40,5
NLS 109 0,5	1,25 л/акр	234	42,7
Mon 0,5 /109 0,5	2 oz/акр	228	41,5
	1,25 л/акр		
Mon 1,0/109 0,5	4 oz/акр 1,25 л/акр	237	42,9

- 10 Приклад 7. Тепличні випробування для визначення активності штамів метилових бактерій проти видів роду *Pythium*

- 15 Було проведено тепличний експеримент для оцінки здатності штамів метилових бактерій пригнічувати хворобу *Pythium* у сої. Обробки метиловими бактеріями порівнювали з обробкою металаксиллом в різних кількостях, щоб визначити, чи можуть штами метилових бактерій забезпечувати захист поза і на додаток до рівня захисту, що надається зазвичай використаними агрономічними способами обробки насіння. Експеримент був розроблений для того, щоб дозволити зростання рослин при наявності помірних рівнів *Pythium. spp.* для визначення впливу на виникнення, % померлості і частоти і тяжкості кореневої гнилі та гнилі насіння.

Инокулянти *Pythium* готували змішуванням 453 г пропареного рису і 323 мл дистильованої води, поміщаючи рис у вентиляований пластиковий мішок для автоклавовання, і автоклавували 2×40 хв з 24 паузи між кожним циклом. Рис інокулювали 3-4-добовими культурами *Pythium* і інкубували протягом 7-10 діб при 230 °С в темряві. Потім інокулянт сушили протягом 2 діб.

20 мл шару інокуляту рису поміщали на ґрунт у чашках і додатковий шар ґрунтують на вершині посівного матеріалу для розміщення інокулянта приблизно на 2-3 см нижче насіння, яке буде посаджено. У ґрунт додавали воду і в кожну чашку висаджували 10 насінин. Куполи поміщають над чашками, чашки поміщають у ростові камери з температурою, встановленою на 23 °С, і на добовий цикл, що дорівнює 16 годин світла і 8 год. темряви. Насіння інкубували протягом 14 діб при 23 °С. Для експериментів для оцінки активності штамів метилових бактерій проти консорціуму 4 видів *Pythium* інкубували насіння протягом 14 діб при 130 °С і протягом 7 діб при 23 °С.

Коли перший вузол повністю з'явився і відкрився, рослини оцінювали на визначення загальної маси рослин, кількості саджанців і кількості мертвого насіння. Частоту захворювання оцінювали як відсоток рослин з гнилими коріннями і тяжкістю захворювання у відсотках гнилої тканини кореня для кожного саджанця. Результати аналізу наведені у таблицях 31-36 нижче.

Результати інокуляції *Pythium sylvaticum* при 23 °С наведені в таблицях 31-32 нижче.

Таблиця 31

Обробка	Проростання	% мертвого насіння
НОК	65	35
0,35 fl oz/центнер метаксилу	82	18
NLS0089	88	12
NLS0109	87	13

NLS0109 та NLS0089 поліпшують проростання і знижують % мертвого насіння краще, ніж 7 г/100 кг металаксильного активного інгредієнта

Таблиця 32

Обробка	Середнє проростання (%)	Середня тяжкість кореневої гнилі (%)
НОК	60	11
1,25 fl oz/центнер метаксилу	78	21
0,75 fl oz/центнер метаксилу	92	18
0,35 fl oz/центнер метаксилу	78	17
<i>Bacillus subtilis</i>	83	6
NLS0109	85	5

NLS0109 поліпшують проростання та знижує тяжкість кореневої гнилі краще, ніж 7,15 або 25 г/100 кг металаксильного активного інгредієнта

Результати інокуляції *Pythium lularium* при 23 °С наведені в таблицях 33-34 нижче.

Таблиця 33

Обробка	Середнє проростання (%)	% мертвого насіння
НОК	83	17
1,25 fl oz/центнер метаксилу	93	67
0,75 fl oz/центнер метаксилу	97	3
NLS0109	97	3

NLS0109 поліпшує проростання і знижує відсоток мертвого насіння краще, ніж 25 г/100 кг металаксильного активного інгредієнта і діє так само, як і 15 г/100 кг металаксильного активного інгредієнта

Таблиця 34

Обробка	Середня захворюваність на кореневу гниль (%)	Середня тяжкість кореневої гнилі (%)
1,25 fl oz/центнер метаксилу	93	11
0,75 fl oz/центнер метаксилу	95	10
0,35 fl oz/центнер метаксилу	95	13
Bacillus subtilis	93	13
NLS0109	92	9

NLS0109 поліпшую проростання та знижує тяжкості кореневої гнилі краще, ніж 7,15 або 25 г/100 кг металаксильного активного інгредієнта

- 5 Результати інокуляції консорціумом 4 видів *Pythium* при змінній температурі 130 °C і 230 °C наведені в таблицях 35-36 нижче. Чотири види, які є важливими патогенами кукурудзи та сої, являють собою *P. torulosum*, *P. ooparillum*, *P. sylvaticum* та *P. lularium*.

Таблиця 35

Обробка	Середнє проростання (%)	Середнє мертвого насіння (%)
НОК	75	25
0,35 fl oz/центнер метаксилу	94	6
NLS0089	100	2
NLS0109	94	2
1,25 fl oz/центнер метаксилу	94	2
0,75 fl oz/центнер метаксилу	100	2

- 10 NLS0109 та NLS0089 поліпшують проростання, а NLS0089 знижує % мертвого насіння краще, ніж 7 г/100 кг металаксильного активного інгредієнта

Таблиця 36

Обробка	Захворюваність на кореневу гниль (%)	Тяжкість кореневої гнилі (%)
НОК	71	12
1,25 fl oz/центнер метаксилу	94	9
0,75 fl oz/центнер метаксилу	100	12
0,35 fl oz/центнер метаксилу	94	13
NLS0089	94	8
NLS0109	90	7

- 15 NLS0109 і NLS0089 зменшують частоту і тяжкість кореневої гнилі при застосуванні до необробленого насіння краще, ніж 7, 15 або 25 г/100 кг металаксильного активного інгредієнта

Приклад 8 Аналіз впливу штамів метилових бактерій на ґрунтові хвороби, викликані *Rhizoctonia* та *Fusarium*

- Ефект обробки метилових бактерією на проростання оцінювався у випробуваннях на полях сої та кукурудзи. Поліпшення проростання свідчить про активність обробки метиловими бактеріями проти звичайних ґрунтових патогенів *Fusarium* і *Rhizoctonia*. Випробування проводили як рандомізований повний блок з чотирма повторами. Використовували стандартні місцеві агрономічні практики для застосування добрив, обробки ґрунту, міжрядь, популяції та боротьби зі шкідниками. Використовували стандартні методи боротьби з бур'янами та комахами, а насіння постачали кооператорам, попередньо обробленим стандартним пакетом обробки насіння фунгіцидом/інсектицидом. Композиції для обробки насіння для сої містять іконазол, металаксил, імідаклоприд і покриття насіння в доповнення до штамів метилових бактерій. Композиції для обробки насіння для кукурудзи містили іконазол, металаксил, трифлуксистеробін і клотіанідин. Підрахунок стелів проводили через 21 добу після першого проростання або приблизно через 27 діб після посадки. Вплив обробки метилових бактерією на

проростання кукурудзі оцінювали за допомогою метилових бактерій, передбаченої для обробки насіння або борозневої обробки. Результати наведені в таблицях 37-39 нижче.

Таблиця 37

Проростання сої

Обробка	Підрахунок густоти стояння
NLS 20/109	118432
NLS 109	118170
Integral™ (B. subtilis)	114456
PPST 2030	114431
NLS 64/109	112965
Без. обр.	110376
NLS 17/109	109652
NLS 20/109	105465

- 5 Обробка насіння NLS0109 поліпшувала кількість сої в порівнянні з обробкою Integral™ (B. subtilis, BASF), PPST 2030 (Pioneer Premium Seed Treatment) і необробленим контролем.

Таблиця 38

Проростання кукурудзи після обробки
насіння метилова бактерією

Обробка	Підрахунок густоти стояння
NLS 17/109	34272
Без. обр.	34141
NLS 20/109	32638

Таблиця 39

Проростання кукурудзи після борозневого
застосування метилових бактерій

Обробка	Підрахунок густоти стояння
NLS 17/109	34445
NLS 20/109	33302
Без. обр.	33186

- 10 Обробка насіння NLS0109 у поєднанні з NLS0017 поліпшила проростання кукурудзи порівняно з необробленим контролем.

Джерела інформації:

- Abanda-Nkwatt, D., M. Musch, J. Tschiersch, M. Boettner, and W. Schwab. 2006. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *J. Exp. Bot.* 57: 4025-4032.

- 15 Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters* 69: 55-60

Cappellini RA, Peterson JL (1965) Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57: 962-966.

- 20 Cao; Y-R, Wang, Q., Jin, R-X., Tang, S-K., He, W-X., Lai, H-X, Xu, L-H., and C-L Jiang. 2011. *Methylobacterium soli* sp. nov. a methanol-utilizing bacterium isolated from the forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:629-634.

Cappellini RA, Peterson JL (1965) Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57: 962-966

- Corpe, W.A., and D.V. Basile. 1982. Methanol-utilizing bacteria associated with green plants. *Devel. Industr. Microbiol.* 23: 483-493.
- Corpe, W.A., and S. Rheem. 1989. Ecology of the methylotrophic bacteria on living leaf surfaces. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62: 243-250.
- 5 Correll JC, Klittich CJR, Leslie JF (1987) Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium graminearum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646.
- Green, P.N. 2005. *Methylobacterium*. In Brenner, D.J., N.R. Krieg, and J.T. Staley (eds.). "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume two, The Proteobacteria. Part C, The alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria." Second edition. Springer, New York. Pages 567-571.
- 10 Green, P.N. 2006. *Methylobacterium*. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 5. Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses." Third edition. Springer, New York. Pages 257-265.
- Holland, M.A. 1997. *Methylobacterium* and plants. *Recent. Res. Devel. in Plant Physiol.* 1: 207-213.
- 15 Holland, M.A., and J.C. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 197-209.
- Kutschera, U. 2007. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts. A hypothesis. *Plant Signal Behav.* 2: 74-78.
- Lidstrom, M.E... 2006. Aerobic methylotrophic prokaryotes. In Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). "The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Volume 2. Ecophysiology and biochemistry." Third edition. Springer, New York. Pages 618-634.
- 20 Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H.S. Lee, K. Hari, S.P. Sundaram, and T.M. Sa. 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.) *Biol. Fertil. Soils* 41: 350-358.
- 25 Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, S. Seshadri, H. Chung, J. Yang, S. Sundaram, and T. Sa. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar CO-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 315-324.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, and T. Sa. 2007. Influence of plant species and environmental conditions on epiphytic and endophytic pink-pigmented facultative methylotrophic bacterial populations associated with field-grown rice cultivars. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 Oct;17(10):1645-54.
- 30 Ringler, G.A. 1995. Reaction of soybean to inoculation with *Fuusarium solani*. MS thesis. Univ. of Illinois, Urbana-Champaign.
- 35 Roy, K.W., J.C. Rupe, D.E. Hershman, and T.S. Abney. 1997. Sudden death syndrome of soybean, *Plant Dis.* 81:1100-1111.
- Rupe, J.C, E.E. Gbur, and D.M. Marx. 1991. Cultivar responses to sudden death syndrome of soybean. *Plant Dis.* 75:47-50.
- 40 Spelbrink RG, Dilmac N, Allen A, Smith TJ, Shah DM, et al. (2004) Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. *Plant Physiol* 135:2055-2067.
- Stanier, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43:159-271.
- 45 Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C, and Dreyfus, B. 2001. Methylotrophic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *Jour. Bacteriol.* 183(1):214-220,
- Sy, A., A.C.J. Timmers, C Knief, and J.A. Vorholt. 2005. Methylotrophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7245-7252.
- 50 Vogel, H.J., and D.M. Bonner. 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218: 97-106.
- Vogel, H. J. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet Bull* 13:42-43
- 55 Whittenbury, R., S.L. Davies, and J.F. Wilkinson. 1970. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 61: 205-218.
- Wrather, J.A. 2010. Soybean disease loss estimates for the United States 1996-2010. Missouri Agric. Res. Sta., Delta Research Center. За интернет адресою "aes.missouri.edu/delta/research/soyloss.htm".

Включення різних посилань у цьому документі не повинно розглядатися як будь-яке визнання заявником того, що посилання становлять попередній рівень техніки. Заявники чітко залишають за собою право оскаржити будь-які твердження про непатентоздатність винаходів, розкритих в даному документі, за посиланнями, включеними в цей документ.

Проілюструвавши і описавши принципи цього розкриття, фахівцям в даній галузі техніки повинно бути очевидним, що розкриття може бути модифіковано в структурі і деталях без виходу за межі таких принципів.

Хоча матеріали і способи цього розкриття були описані в термінах різних здійснень і ілюстративних прикладів, фахівцям в даній галузі техніки буде очевидно, що варіації можуть бути застосовані до матеріалів і способів, описаних в даному документі, без відхилення від концепції, духу і обсягу розкриття. Всі такі подібні заміни і модифікації, очевидні для фахівців в даній галузі техніки, вважаються такими, що перебувають у межах духу, обсягу та концепції розкриття, як визначено у прикладеній формулі винаходу або іншим чином розкрито в цьому документі.

<110> NEWLEAF SYMBIOTICS, INC.

Rioux, Renee

McFatrigh, Charles M

Nannapaneni, Kishore M

<120> КОМПОЗИЦІЇ МЕТИЛОБАКТЕРІЙ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗАХВОРЮВАНЬ, ВИКЛИКАНИХ ГРИБАМИ

<130> 53907-171478

<150> US 62/431927

<151> 2016-12-09

<160> 60

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 1471

<212> ДНК

<213> Methylobacterium sp.

<400> 1

```

ggtagatccag ccgcaggttc cctacgggt accttggtac gaattcacc cagtogetga      60
ccctacggtg gtcgcctgcc tcttggggt tggcgacgc cgtcgggta agaccaactc      120
cctagggttg acggggcgtg tgtacaagg ccgggaacgt attcacggtg gaatgctgar      180
ccacgattac tagcgattcc gccctcatgc actcgagttg cagagtgcac tccgaactga      240
gaaggctttt ggggatttgc tccagatcgc tcttcgact cccactgtca cggccattgt      300
agcaggtgtg tagcccatcc cgttaagggc atgaggactt gaggtaatcc acaccttcct      360
cgcggttat caccggcagt ctccctagg tgcctaactg aatgatggca actaaggagc      420
tgggttgctc tgggtgggg acttaaccca acactcacc acacgagctg acgacagcca      480
tgacgacact gttgctgggc caccgaagt gaccccaaat ctctctgggt aacacgccat      540

```

```

gtcaaaggat ggtaagggttc tgcgcgttgc ttogaattaa accacatgct ccacgcgttg      600
tgcggggccc cgtaattcc tttagagttt aatcttgcca cgtactccc caggcggaat      660
gctcaaagcg ttagctgccc tactgcggtg caagcacccc aacagctggc attcatcggt      720
tacggcggtg actaccaggg tatctaattc tgtttgctcc ccacgctttc ggcgcctcagc      780
gtcagtaaty gtccagtttg ccgccttgcg caccggtgtt ctgccaata totaagaatt      840
tcacctctac actgcagtt ccaccaacot ctaccatact caagcgcccc agtatcgaag      900
gccattctgt ggttgagcca caggctttca ccccgactt aaaacgcgcg ctacgcgccc      960
tttacgcca gtgattccga gcaacgctag ccccttcgt attacgcgg ctgctggcac     1020
gaagttagcc ggggcttatt cctccggtac cgtcattatc gtcccgata aaagagcttt     1080
acaaccttaa ggccttcctc actcgcggg catggctgga tcaggttgc gccattgtc     1140
caatattccc cactgctgcc tcccgtagga gtctgggccc tgcctcagtc ccagtgtggc     1200
tgatcatcct ctacagaccg ctactgatcg tgccttggc aggcggttac cccaccaact     1260
agctaattcag acgcggggcg atcttcgggc agtaaacott tccccaaaag ggcgtatccg     1320
gtattagccc tagtttccca gggttattcc gaaccagaag gcacgttccc acgcgttact     1380
caccgcgcg ccgctgaccc cgaaggccc gctcgactg catgtgttaa gcctgcgcgc     1440
agcgctcgct ctgagccagg atcaaacctc c                                1471

```

5

<210> 2
 <211> 1471
 <212> ДНК
 <213> *Methylobacterium* sp.

```

<400> 2
ggtagtccag ccgcaggttc cctacggct accttgctac gacttcaccc cagtgcgtga      60
ccctacggtg gtcgcctgcc ccttgccgt tggcgacgch ccgtcgggta agaccaactc     120
ccatgggtgtg acgggcggtg tctacaaggc ccgggaacgt attcaccgtg gcatgctgat     180
ccacgattac tagcgattcc gacttcctgc actcgagttg cagagtgcaa tccgaactga     240
gacggctttt ggggatttgc tcccgatcgc tcttcgggt cccactgtca ccgccattgt     300
agcaagtggt tagcccatcc cgttaaggcc atgaggactt gacgtcctcc acaccttctc     360
cgcggtttat caccggcagt ctccctagag tgcaccaactg aatgatggca actaaggacg     420
tgggttgccc tggttgcggg acttaaccca acatctcact acacgagctg acgacagcca     480

```

10

tgcagcaccat ggtgagcgcc caccgaagtg gaccccaaat ctctctgggt aacacgcoat 540
gtcaaaggat ggttaagggtc tgcgcgttgc ttcgaaattaa accacatgct ccacgcgttg 600
tgccgggcccc cgtcaattcc tttaggtttt aatctttgca ccgtactccc caggcggaat 660
gctcaaagcg ttagctgccc tactgcggtg caagcacccc aacagctggc attcatcggt 720
tacggcggtgg actaccaggg tatctaacc tgtttgctcc ccacgcgttc ggcgctcagc 780
gtcagtaatg gtccagttgg ccgccttccc caccagtggt ttgcgaata tctacgaatt 840
tcacctctac actgcagtt ccaccaacct ctaccatctc caagcgctcc agtatcgaag 900
gccattctgt ggttgagcca caggctttca cccccgactt aaaacgcgc ctacgcgcgc 960
tttacgcccc gtgattccga gcaacgctag ccccttctgt attacgggg ctgctgggac 1020
gaagttagcc ggggcttatt cctccggtac cgtcactatc gcccgggata aaagagcttt 1080
acaaccttaa ggccttcaac actcacgggg catggctgga tcaggcttgc gccattgrr 1140
caatatfccc cactgctgcc tcccgtagga gtctgggccc tctctcagtc ccagtggtgc 1200
tgatcatctt ctacagaccg ctactgatcg tgccttgggt aggcggttac cccaccaact 1260
agcraatcag accgggggdc atcttccggc agtaaacctt tccccaaaag ggcgtatccg 1320
gtattagccc tagtttcccc gggttattcc gaaccagaag gcaagttccc acgcgttaac 1380
caccgcctcc ccgctgacc cgaagggccc gctcgacttg caagtgttaa gcttgcgcgc 1440
agcgttcgct ctgagccagg atcaaacct c 1471

5

<210> 3
<211> 1472
<212> ДНК
<213> Methylobacterium sp.

<400> 3

gagrttgatc ctggttcaga ggcacgcctg ggggcaggct taacacatgc aagtcgaacg 60
ggcttcttcg gaagtcagtg gcagacgggt gagtaacacg tgggaacgtg ccttctggtt 120
cggaataact caggggaact tgagctaata cgggatccgc ctttatgggg aaagggttac 180
tgccgaagga tgcgcccgcg tctgattagc ttgttgggtg ggttaacggc taaccaaggg 240
accatcagta gctggtctga gaggatgac agccacactg ggactgagac accgcccaga 300
ctcttacggg aggcagcagt ggggaatatt ggacaatggg ccgaagcctg atccagccat 360
gcccgcgtgag tgatgaaggo cttagggttg taagctctt ttgtccggga cgataatgac 420
ggtaccggaa gaataagccc cggcraactt cgtgccagca gcgcgggtaa tacgaagggg 480
gctagcggtg ctccgaatca ctgggggtta agggcgctta ggcggccgat taagtcgggg 540

10

```

gtgaaagcct gtggctcaac cacagaattg ccttcgatac tggttggctt gagaccggaa      600
gaggacagcg gaactgogag tgtagaggtg aaattcgtag atattcgcaa gaacaccagt      660
ggcgaagcgc gctgtctggg cgggttctga cggtagggcg cgaagcgctg gggagcaaac      720
aggattagat accctggtag tccacggcgt aaacgatgaa tggcagccgt tggctctgctt      780
gcaggtcagt gccgcgcgta acgcattcag cattccgcct ggggagtaag gtgcgaagat      840
taaaactcaa aggaattgac gggggcccg ccaagcggtg gagcatgttg tttaattcga      900
agcaacgcgc agaaccttac catccttga cctggcctgt tacctcgaga gatcggggat      960
cctcttcgga ggcgtcaca cagggtctgc atgggtgtcg tcagctcgtg tegttagatg     1020
ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc acgtccttag ttgcatcat tcagttgggc     1080
actctagggg gactgcgggt gataagccgc gaggaaggcg tggatgaagt caagtctcca     1140
tggcccttac gggatggggt acacacgtgc taccatggcg gtgacagtg gacgcgaaac     1200
cgcgaggttg agcaaatccc caaaagccgt ctcagttcgg attgcactct gcaactcggg     1260
ggccttgtac acaccgcccg tcacaccatg gaggttggto ctacccgacg gcgctgcgc     1320
aacccgaagg gggcaggcga ccacggtcgg gtcaggcact ggggtgaagt cgtaaccaagg     1440
tagccgtagg ggaacctgcg gctggatcac ct                                     1473

```

5

<210> 4

<211> 1473

<212> ДНК

<213> *Methylobacterium* sp.

<400> 4

```

ggtgatccag cgcaggttc cctacggct accttgttac gacttcaccc cagtcgctga      60
cctaccgtg gtgcctgac tcttgcggg tggcgacagc cgcgcggta agactaaetc     120
ccatggtgtg acgggcggtg tgtacaagga ccgggaagct attcacctg gcgtgttgat     180
ccacgattac tagcgattcc gcttcacgc acccgagttg cagagtgcaa tccgaactga     240
gacggttttt ggggatttgc tccacctcgc ggcttcggct ccaactgtca ccgcattgt     300
agcacgtgtg tagcccatcc cgttaaggcc atgaggactt gacgtcatcc acacettcct     360
cgcggttat caccggcagt ctccctagag tgcocaaactg aatgatggca actaaggacg     420
tgggttgccc tcgttgcggg acttaaccca acatctcacc acacgaggtg acgacagcca     480
tgcagcactt gtgtgcacgc ctccgagag gatcccgat ctctcagagt aacatgccat     540
gtcaagggat ggttaagggtc tgcgcgttgc ttgaatcaa accactgct ccaccgcttg     600
tgccggccc cgtcaattcc tttagtttt aatcttcgca cgtactccc caggcggaat     660
gcttaattgc ttagcggcgc cactgaactg caagcaggcc aacggctggc attcctcgtt     720

```

10

taaggcgtgg	aataccaggg	tatataatcc	tgtttgctcc	ccacgctttc	gcgcctcaga	780
gtcagaaccc	gaccagacag	ccgccttcgc	caactgggtt	cttgogaata	tatacgaatt	840
tacatctac	actcgcagtt	ccgtctgtcc	cttcocggtc	caagccaaac	agtatcgaag	900
gcaattctgt	gggtgagcca	caggccttcc	cccccgactt	aatcggcggc	ctacgcggcc	960
tttacgccc	gtgattccga	gcaacgctag	cccccttcgt	attaccggcg	ctgtctggcc	1020
gaagttagcc	ggggcttatt	cttcocggtc	cgtcattatc	gtcccggaac	aaagagcttt	1080
acaacccata	ggccttcata	actcacgcgg	catggctggg	tcaggcttgc	gcccattgtc	1140
caatatcccc	cactgctgcc	tcccgtagga	gtctggggcc	tgtctcagtc	ccagtgtggc	1200
tgatcaatcc	ctcagaccag	ctactgctcg	tgccttcggt	aggcggtaac	cccacccaag	1260
agtaaatcag	acgcgggcgg	ctccttcggc	agtaaacctt	tcccacaaag	ggcgtatccg	1320
gtattagctc	aagtttccct	gagttattcc	gaacccaagg	gtacttcccc	acgtgttaac	1380
cacccgctcg	ccaatgacac	cgaagggtgc	ccgttcgaac	tgcattgtgt	aagcctgcgc	1440
ccagcgttcg	ctctgagcca	ggatcaaaat	ctc			1473

5

<210> 5

<211> 1484

<212> ДНК

<213> *Methylobacterium* sp.

<400> 5

gggagatcag	ccgcaggttc	ccctacggct	accttggtac	gaattcaacc	cagtcgctga	60
ccctacggtg	gtgcgcctgc	tccagtcgag	caagctcgat	tgggttggcg	cagcgccgtc	120
gggtaagacc	aaatcccatg	gtgtgacggg	cggtgctgac	aaaggccggg	aaagtatcca	180
ccgtggcatg	ctgatccacg	attactagcg	attccgcctt	catgcacgcg	agttgcagcg	240
tgaatccga	actgagacgg	cttttggaga	ttggctccgg	gtcacccctt	cgggtccccc	300
tgtcacggcc	attgtagcac	gtgtgtagcc	catcccgtaa	gggcatgag	gaattgacgt	360
cattcacacc	ttctctggcg	cttatccacc	gcagttcccc	ttaggtgcgc	aaacaaaaga	420
tggcaactaa	ggacgttggg	tgcgctcggt	gcgggactta	acccaacata	tcccgacacg	480
agctgacgac	agccatgcag	caactgtgtg	cgggcctccg	aaaggggaact	ggaattctct	540
ccagtcaaac	gocatgtcaa	aggatggtaa	ggttctcgcc	gtrgcttcga	attaaaccac	600
atgctccacc	gcttgtgcgg	gcccccgtaa	attcccttga	gttttaattc	tgcgacggta	660
ctccccaggg	ggaatgctta	atgcgttagc	tgcgctactg	cggctcatgc	accccaacag	720
ctagcatcca	tcgtttacgg	cgtggactac	cagggtatct	aattctgttt	gctccccacg	780
ctttcgcgcc	tcagcgtcag	taattgtcca	gttggccggc	ttcgccaccg	gtgtctctgc	840
gaatatctac	gaatttcacc	ctacactcgc	cagttccacc	aaactctacc	atactcaagg	900
gtccacgtat	cgaaggccat	tctgtgggtg	agccacaggg	tttccacccc	gaattaaaaa	960
gcgcgctacg	cgccttttac	gcccagtgat	tccgagccac	gttagccccc	ctcgtattac	1020
cgcggctgct	ggcacaaggt	tggccggggc	ttattctctc	ggtacggtaa	ttatcgtccc	1080

10

ggagaaaaga gctttacaaac cctaaggccg tcatcactca cgcggcatgg ctggatcagg 1140
 cttagcgaca ttgtccaata tteccaaatg ctgcctcccg taggagtcct ggccgtgtct 1200
 cagtcocxgt gtygctgac atcctctcag accagctant gatcgtcgcg ttggtaggac 1260
 gttacacaaac caacaagcta atcagacggg ggcgcatact ccggcagtaa acctttctgc 1320
 caaagccagt atccggtatt agccctagtt tcccagggtc atcccagacc ggagggcacc 1380
 ttcccacgtg ttaactaccc gtctgccact caccctgcgg tgcgttcgac ttgcattgtt 1440
 taagcctgac gccagcgttc gctctgagcc aggatcaaac tctc 1484

5 <210> 6
 <211> 1484
 <212> ДНК
 <213> Methylobacterium sp.

<400> 6
 gagcttgatc ctggctcaga gogaacggcg gcggcaggct taacacatgc aagtccaaag 60
 caccgcacag ttgagtgacg accggtgagt aacacgtggg aacgtgcctt ccggtctggg 120
 ataaccctgg gaaactaggg ctaafaccgg atacgtgctt tggcagaaag gtttaactgc 180
 ggaggatcgg ccggcgctcg attagcttgt tggtagggta accgcctacc aaggcgacga 240
 tcaatagctg gtctgagagg atgacacgac acactgggac tggacacagg ccagactcc 300
 tacgggaggg agcagtgagg aatattggac aatggggcca agcctgctcc agccatgcgg 360
 cgtgagtgat gacggcctta ggggtgtaaa gctctttctt ccgggacgat aatgacggtt 420
 ccggagggaat aagcccccgg taacttcgtg ccagcagcgg cggtaatacg aaggggggta 480
 gcgttgctcg gaacacactg gogtaaaggg ccgctaggcg gcgttttaag tgggggggta 540
 aagccgtgtg ctcaaccaca gaatggcctt cgatactggg accgttgagt atggtagagg 600
 ttggtgggac tgcgagtgtt gaggtgaat tcttagatat tgcgaagaac accggtggcg 660
 aaggcgccca actggaccat tacrgacgct gaggcgccaa agcgtgggga gcaaacagga 720
 tttagatacc ttgttagtca cgcctgaaac gatgaatgct agctgttggg gtgcattgcac 780
 ccgagtagcg cagctaacgc attaagcatt ccgcctgggg agtaaggctc caagattaaa 840
 actcaaagga attgacgggg gcccgacaaa ggggtggagc atgttggtta attcgaagca 900
 accgcagaga ccttaccatc ctttgacatg gogtggtact gggagagatt ccaggctccc 960
 ttccggggcg cgcacacagg tcttcacatg ctgtcgtcag ctgctgtcgt gagatgttgg 1020
 gtttaagtcc gccacgagcg caaacacagt ccttagttgc catcatttgg ttgggcactc 1080

10

tagggagact gccggtgata agccgcgagg aaggtgtgga tgacgtcaag tccatcatggc 1140
 ccttacggga tgggtacac acgtgctaca atggcggtga cagtgggacg cgaaggggtg 1200
 accgggagcc aatctccaaa agccgtctca gtctgggattg cagctgcac ctccggtgca 1260
 tgaaggcgga atcgctagta atcgctggatc agcatgccac ggtgaatacg ttcccgggcc 1320
 ttgtaacac ccgcgcgcac accatgggag ttggtcttac ccgacgggc tgccccaacc 1380
 aaatcgagct tgcctgactg gaggcaggg accacggtag ggtcagcgac tggggtgaag 1440
 tggtaacaag gtacgcgtag gggaacctgc ggtggatca cctc 1494

5 <210> 7
 <211> 1472
 <212> ДНК
 <213> *Methylobacterium* sp.

<400> 7
 gagtttgatc ctggtcaga gcgaagctg ggggcaggct taacacatgc aagtcgaacg 60
 ggcttcttcg gaagtcagt gcagacgggt gagtaacacg tgggaacgtg ccttcgggtt 120
 cggataaact cggggaaact tgagctaata ccggatacgc ccttacgggg aaaggtttac 180
 tgccgaagga tgggcccgcg tctgattagc ttgttgggtg ggtaacggcc taccaggcg 240
 acgacagta gctggtctga gaggtgac agccacactg ggactgagac accgccaga 300
 ctctacggg aggcagcagt ggggaataat ggacaatgg ccgaagcctg atccagccat 360
 gcgcgctgag tgatgaaggc cttaggggtg taagctctt ttgtccggga cgataatgac 420
 ggtacggga gaataagccc cggctaactt cgtgccagca gccgcggtaa taogaagggg 480
 gctagcggtt ctgggaatca ctggggctga agggcgcgta ggcggccgat taagtcgggg 540
 gtgaagcct gtggtcaac cacagaattg ccttcgatac tggttggctt gagacggga 600
 gaggacagcg gaactgcgag tctagaggtg aaattcgtag atattcgca gaacaccagt 660
 ggogaagggc gctgtctggt ccggttctga cgtcgaggg cgaaagcgtg gggcgcaaac 720
 aggattagat accctggtag tccacgcct aaacgatga tgcagagcgt tggctctgctt 780
 gcaggtcagt ggcgcgcta acccattaag catccgcct ggggagtaag gtcccaagat 840
 taanaaccac aggaattgac gggggcccg ccaagcggtg ggcgatgtgg ttttaattcga 900
 agcaacgcgc agaaccctac catcccttga catggcatgt taacctcgaga gatcggggat 960
 cctcttcgga gccgtgcaca caggtgctgc atgggtgtcg tcagctcgtg tcttgagatg 1020
 ttgggttaag tcccgcacg agcgcaacc aggtccttag ttgccatcat tcagttgggc 1080
 actctagggg gactgcggg gataagccgc gaggaaggcg tggatgacgt caagcctca 1140

10

tggccottac gggatgggct acacacgtgc tacsatggcg gtgacagtgg gacgggaaac 1260
 cgcgaggttg agcaaatccc caaaagccgt ctcagttcgg atgcaactct gcaactcggg 1260
 tgcctgaagg cggaaatcgt agtaatcggg gatcagcagc ccacgggtga tacgtttccg 1320
 ggccctgtac apacccgccg tcacaccatg ggaagtgggc ttaccgcagc gcgcctgcgc 1380
 aaccgcaagg gggcaggcga ccacggtagg gtcagcgaat ggggtgaagt cgtacaagg 1440
 tagccgtagg ggaacotcgg gctggatcac ct 1472

5 <210> 8
 <211> 1473
 <212> ДНК
 <213> Methylobacterium sp.

<400> 8
 ggtgctccag cgcaggttc cccacgggt accttggtac gatttcaccc cagtccgtga 60
 cccacgggtg gtgcctcgtt ccccttgcgg gtccggcgag cgcggtcggg taagacccac 120
 tcccatggtg tgacggggcg tgtgtacaag gcccgggaac gtattcaccc tggcatgctg 180
 atccacgatt actagcgatt ccgccttcac gcactcaggt tgcagagtcg aatccgaact 240
 gagaeggctt ttggagattt gcttgccttc gcgggttcgc gtcccaactg caccgccatt 300
 gtacgacgtg tglagccat cccgtaaggg ccattgaggac ttgacgtcat ccacaccttc 360
 ctgcggctt atcaccggca gtctccccc agtgcaccaac tgaatgatgg caactgagga 420
 cgtgggattg cctcgtttgc ggaacttaac caaatctca cgaacggagc tgacgacagc 480
 catgcagcac ctgtgtgcgc gctccggaag gagaccgtg atctctccac gtaaacggcc 540
 atgtcaaagg atggttaagg tctgogcgtt gcttcgaatt aaaccapgt ctcacccgct 600
 tgtgeggyc cccgtcaatt cctttgagtt ttaattttgc gaccgtactc cccaggcaga 660
 atgctcaag cgttagctgc gccactgaga ggaagccccc ccaaggggtg gaattcctcg 720
 ttacggcgtt ggactaccag ggtatctaat cctgtttgct cccacagctt tcgcgcctca 780
 gctcagtggt cggaccagtt ggcgccttc gccacgggtg ttcttgagaa tatctacgaa 840
 ttccacctct acactcgcag ttccaccaac cctttccgaa ctcaagtctc ccagtatcga 900
 aggcattctt ggggttgagc cacaggctt cacccccagc ttaaaagacc gcttacgggc 960
 cctttacgac cagtgaattc gageaacgt agcccccttc gtattaccgc ggcgtctggc 1020
 acgaagttag cccgggctta ttccctccgt accgtcatta tcttcaggga taaaagagct 1080
 ttacaaacct aaggccttca tcactcacgc ggcctggctg gatcaggctt gcgcccattg 1140
 tccaattatc cccactgctg cctcccgtag gagtctgggc cgtgtctcag tcccaagtgt 1200
 gctgacatc ctctcagacc agtactgat cgtcgcttg gtaggcggtt accccaccaa 1260

10

	ctagctaatc agacgcgggc cgtctcttcg gcagtaaaac ttccccaaa agggcgtatc	1320
	cggtaattagc tcaagtttcc ctgagttatt ccgaaccaga aggcacgttc ccacgcgtta	1380
	ctcacccgtc cgcgcgtgac accgaagtgc ccgtctgact tgcctggttc aagcctgccc	1440
	ccagcgttcg ctctgagcca ggatcaaacct ctc	1473
5	<210> 9 <211> 300 <212> ДНК <213> Methylobacterium sp.	
	<400> 9	
	acggtcaccc caccgactgg gcgagtaact caccgggtgt ctatcataac gccgagtrag	60
	ttttcgaccc tccctcttgc gatgtaccac cgtgtctggc agccgatttc gtcccacccg	120
	gagctggcgt tccggttcag accaccatca tgggtcacga tgcctggatt ggacacgggg	180
	ccttcatttc ccccgccgtg actataggaa accgcgcgat cgtcggggcc caggcggctc	240
10	tcacaagaga tgtcccaacc tatgcggtag ttgctggcgt cccgcgcacc gtacgacgat	300
	<210> 10 <211> 300 <212> ДНК <213> Methylobacterium sp.	
15	<400> 10	
	ccaataaaaq cgttggccgc ctggycaacc cgtatccgagc ctaagactca aagcgcacgc	60
	gaacacttgg tagagacagc ccgcgcacta cggcgttcca gcactctccg gctttgacgc	120
	gataggcatt ggtcaaggta ccggtggtga tgacctgsc cgcgcgaagc ggcgaattac	180
	tgggacagc ggcacgacc tcgacccagt gtgggagcgc gaccaaaggg ccacgttoga	240
	ggacgtttga ggcgcgacca gtctcgatag tctcctgttc gggcgaagc tgcacctoga	300
20	<210> 11 <211> 300 <212> ДНК <213> Methylobacterium sp.	
25	<400> 11	
	cgttggcacc gacctgccat gctctgccc tccgcgcag aatggtaaaq aggacgaagg	60
	gggttaaggat cgtcgttga gtgttgagca gcgaccagag aagggggccc aacatcggca	120
	tcaaaccttc attgcccttc ggacgcgaag cgcgtcttga aggaggggatg gaagcgaacc	180
	ggccgcagag taaccgcga cgaagattg caccctcat cgaacaggat cggaggtgaa	240
	ggcaagcgtg ggttatcgtt aagtgcacaa aatataatgg tagcgtcaga tccagcgttc	300
30	<210> 12 <211> 23 <212> ДНК <213> Штучна послідовність	

	<220>		
	<223> Праймер		
	<400> 12		
5	cctcaccggg gttctatcat aac		23
	<210> 13		
	<211> 20		
	<212> ДНК		
10	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Праймер		
	<400> 13		
	ccgatgatgg tggctctgaa		20
15	<210> 14		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
20	<220>		
	<223> Зонд		
	<400> 14		
25	cgtcccttat gogatgtacc a		21
	<210> 15		
	<211> 22		
	<212> ДНК		
30	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Праймер		
	<400> 15		
35	gategagagcc taagaotcaa ag		22
	<210> 16		
	<211> 21		
40	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Праймер		
45	<400> 16		
	gacdaatgcc tatccgataa a		21
	<210> 17		
50	<211> 20		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Зонд		
55	<400> 17		
	aacacttggg agagacagcc		20

5	<210>	18	
	<211>	21	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
10	<223>	Праймер	
	<400>	18	
		aaaggagggcat ggaagcgaaa c	21
	<210>	19	
	<211>	19	
15	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Праймер	
	<400>	19	
20		ataaccacag attgacctc	19
	<210>	20	
	<211>	21	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
25	<220>		
	<223>	Зонд	
	<400>	20	
		cgtacaggttaa cgcgcgacga a	21
	<210>	21	
30	<211>	300	
	<212>	ДНК	
	<213>	Methylobacterium sp.	
	<400>	21	
35		gcccctctctgt caggcgatat tgtataatgg cgttgcccc aatagaagcag caattcgtgc	60
		gagggcagca ggcacgctag gtcgaaagag catcctaato tggatcaaga tgcgactcag	120
		attctctgatg aaaaatctta gacacaaaga aagctgggtga aattacaaag atcatggcga	180
		caattgcggc caattcgggc ggaacttgaa ggaacataaa aatgaatatt acaaatatac	240
		cgcacaaagcat gttaggttgc tacaccaagg gtccggacgt ccaaaaaaaaaac tcaatgagga	300
40	<210>	22	
	<211>	300	
	<212>	ДНК	
	<213>	Methylobacterium sp.	
	<400>	22	
45			

```

ggacataaaa aatgaatatt acaaatatac cgcaaggcat gtagagttgc tacaccaagg      60
gtcggggacgt ccaaaaaaac tcaactgagga agtcgactgg aagcacgagg cgcacccccc      120
aggagcgggg cgaccggcaa gggggccccc aattgtcgcc atgaccgacc agcttaggta      180
ggatccctctt cagacccaac gaatggctgc ttctattggg gcaacgccat tatacaatat      240
cgcttgacca tctggaacgc gggccggtcc accggcaggt tggcgacgac agcgtcggag      300

```

5
 <210> 23
 <211> 300
 <212> ДНК
 <213> Methylobacterium sp.

```

<400> 23
cggcgtcgac cagccggggcg aacgccttgg gcattctctc ccgcgacgac ggccacagcc      60
ggtcccccgt cccctccgac aggatcctcg ggtggatttg aaaggcaaaa cgggacatca      120
ggataggccg ctcaaggcgtt ggccttgagg cgtttgatgt cggcgtcgac catctcggtg      180
atcagcgctt cgaggctggt ctgggctctc cagccgaagg tcgcttggc cttggggggg      240
ttgccagaca gcaactcgac ctctgcgggc cggaacagcg ccgggtcgac gatcaggtgg      300

```

10
 <210> 24
 <211> 300
 <212> ДНК
 <213> Methylobacterium sp.

```

<400> 24
ctggacatgc gcccaccccg gccaaagtcc accgcacggg caacccgtcc tgragtcgtc      60
gtcatcgctc tcacccctga ggaggagacc gtccgctaac ggggtgtctc aagcaaccgt      120
ggggcgaggg aacacgcacg tagtcgggtt tcaaggttcg caccgaacgc tcggccatgc      180
cgttgctctg cgggctctcc agcggcgctg tttttggcac caaaccaagg tcggggggga      240
agcggcgcggt gtccggggga ctgtcaggaa tttcgtgtgg gggcgcccat agtggatccg      300

```

20
 <210> 25
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

25
 <220>
 <223> Праймер

```

<400> 25
caccagcaca gctgggtga      18

```

30
 <210> 26
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

35
 <220>
 <223> Праймер

	<400> 26	
	aaatatgct ttgcgggta	19
5	<210> 27	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
10	<220>	
	<223> Зонд	
	<400> 27	
	cgatcatggc gacaattg	18
15	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
20	<223> Праймер	
	<400> 28	
	caatatcgcc tgacagaaag	20
25	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
30	<220>	
	<223> Праймер	
	<400> 29	
	cacttcaaca aaggcgatca	20
35	<210> 30	
	<211> 14	
	<212> ДНК	
	<213> Штучна послідовність	
40	<220>	
	<223> Зонд	
	<400> 30	
45	ttggcgacga cagc	14
	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
50	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> Праймер	
55	<400> 31	
	actgcttggg catgctctc	19
	<210> 32	
	<211> 20	

	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
5	<223>	Праймер	
	<400>	32	
		cctatcctga tgcctcgttc	30
10	<210>	33	
	<211>	20	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
15	<220>		
	<223>	Зонд	
	<400>	33	
		aggatcctcgg ggctggatttg	30
20	<210>	34	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
25	<220>		
	<223>	Праймер	
	<400>	34	
30		aggaaacagc acgtagtc	18
	<210>	35	
	<211>	18	
	<212>	ДНК	
35	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Праймер	
40	<400>	35	
		ccacacgaaa ttcctgac	18
	<210>	36	
	<211>	14	
45	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Зонд	
50	<400>	36	
		tggcacccaaa ccaa	14
	<210>	37	
55	<211>	300	
	<212>	ДНК	
	<213>	Methylobacterium sp.	
	<400>	37	

		gcacaaacgac ctaatagttc tacagcggga tgcgcbaagt cagcgcggtg aacagtatac 60
		ctgggagcaa cttgtcctcc gaaacccaca taaaacaaat tactcctggc agtgcccagt 120
		ccatacaaat cgaatacaat atttctcgag gaggcatctg taatagcctg ccaagcaac 180
		aaagctatgg cgcggttaig acttccattg cttctggtag acataaata atatgcgat 240
		ttgtgatccc aaatgtagaa tattgccgca tcaattgcgc caagtttatt tgggatcgat 300
5	<210>	38
	<211>	300
	<212>	ДНК
	<213>	Methylobacterium sp.
	<400>	38
		ggcgccaaag gtatgategc atgattttcc tgcggcatag cttgcgggaa tggcgtatct 60
		ggcgctctcc tcaggaaatt ctaagggcat accgaggaaac tatcacgac ttttactggt 120
		attttgtagt gscagcggag gaggctggtg ctcaaggtaa tegtgatgaa gtgatccggg 180
		ccattcgggg cgcgtttcta gtcttccaa tccgcgcctt gtaaccgta ttaagccgga 240
10		cgggtctgcg ccgcgcgcgc ctcttgaccg ccttaaatgt ctaagagcgt ctacaaaagc 300
15	<210>	39
	<211>	300
	<212>	ДНК
	<213>	Methylobacterium sp.
	<400>	39
		gacgatatcg ctcatcttca ctgcattgaa gctggcgccg tactgcatac ggaagaaaaa 60
		gtgatccgga tagacggctg acgggaaaagc gcttggtcga tgaagactt tgcgacgag 120
		gttggtgtag ccccgatat aggcattcgaa ggcggggacg ttgatcccat cctttgcctt 180
		atcttgactg gctgctgcgc gtgccgtcag aacgggcacg tgcaggtca tgaaggccag 240
		caacttgcgg aacacctgag ttccgcggtt gggattatcg accgcgaacg cggtgccgcg 300
20	<210>	40
	<211>	21
	<212>	ДНК
	<213>	Штучна послідовність
25	<220>	
	<223>	Праймер
	<400>	40
		gtcctccgaa acccacataa a 21
30	<210>	41
	<211>	23
	<212>	ДНК
	<213>	Штучна послідовність
35	<220>	
	<223>	Праймер

	<400> 41		
	ctaccagaag caatgaaagt cat		23
5	<210> 42		
	<211> 22		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
10	<220>		
	<223> Зонд		
	<400> 42		
	cctgtaataag cctgccaag ca		22
15	<210> 43		
	<211> 19		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
20	<220>		
	<223> Праймер		
	<400> 43		
	ggctggtgct caaggtaat		19
25	<210> 44		
	<211> 20		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
30	<220>		
	<223> Праймер		
	<400> 44		
	acatttaggg cgggcaagag		20
35	<210> 45		
	<211> 19		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
40	<220>		
	<223> Зонд		
45	<400> 45		
	atgaagtgat ccggggccat		19
	<210> 46		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
50	<220>		
	<223> Праймер		
55	<400> 46		
	ccgtactgca tagggatgaa a		21
	<210> 47		

	<211>	21	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
5	<220>		
	<223>	Праймер	
	<400>	47	
		tttaaggctaaag gatgggatca a	21
10	<210>	48	
	<211>	21	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
15	<220>		
	<223>	Зонд	
	<400>	48	
		ttgctgacga gggtgtggtg g	21
20	<210>	49	
	<211>	300	
	<212>	ДНК	
	<213>	Methylobacterium sp.	
	<400>	49	
		ggaaatoggc tttaagtacg acgtcacgac gccaatgcag gtcacgggtg cactgttcaa	60
		tctcgagcgc gacaaacagc cgttcccttc gaacgtggag tccggcctcg tctttggcgc	120
		aggbcagaca cgcacccagg gcgcggaaat cggcctggcc ggctatctaa ccgattggtg	180
		gcaggtcttt gcgcgctacg cttataacga ggcacgcgta ctctcgccac tggagacga	240
		tggagacgtg atcgacagcag gtaatctcgt cggcaacgtt ccgctaaata ctttcagttt	300
30	<210>	50	
	<211>	300	
	<212>	ДНК	
	<213>	Methylobacterium sp.	
35	<400>	50	
		cggcctggcc ggctatctaa ccgattggtg gcaggtcttt ggaggctacg cttataacga	60
		ggcacgcgta ctctcgccac tggagacga tggagacgtg atcgacagcag gtaatctcgt	120
		cggcaacgtt ccgctaaata ctttcagttt gttcaacaag ttcgatatca acgagaattt	180
		ctccgttgcg ctgggctatt actatcagga tgcacgcttt gctctctcag acatgcagt	240
		gcgtttgcca agttattcgc ggttcgatgg cgggttcttc tatcgattcg acgagttgac	300
40	<210>	51	
	<211>	300	
	<212>	ДНК	
	<213>	Methylobacterium sp.	
	<400>	51	

```

acggttcgggt aaatactttc agtcctgttca acaagttcga tatcaacgag aattttctcgg      60
ttgctcrggg ctattactat caggatgcoa gcttgcctc ctcagacaat gcagtgcggt      120
tgccaagtta ttgcgggttc gatggcgggt tgtttatcg attcgacgag ttgacacgg      180
ttcagcttag cgtcagagaac attttcagca ggcgttacat catcaactcc acaacacaa      240
acaaactcac gcttggcggc ccagagaaacg tccgcgtgca attgacgct cggttctaaa      300

```

5 <210> 52
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

10 <220>
 <223> Праймер

<400> 52
 ttgggcgggt acgcttatac 20

15 <210> 53
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

20 <220>
 <223> Праймер

<400> 53
 aacgttgcgg acgaqattac 20

25 <210> 54
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

30 <220>
 <223> Зонд

<400> 54
 agacgatgga gacgtgatcg ca 22

35 <210> 55
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

40 <220>
 <223> Праймер

<400> 55
 ggcacgcgtc cgtctaatac 26

45 <210> 56
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

<220>

	<223>	Праймер	
	<400>	56	
5		aaagctggga tctgtagt	20
	<210>	57	
	<211>	22	
	<212>	ДНК	
10	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Зонд	
	<400>	57	
15		cgagaatttc tccgttgctc tg	22
	<210>	58	
	<211>	19	
	<212>	ДНК	
20	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Праймер	
25	<400>	58	
		cgatgggggg ttgtctat	19
	<210>	59	
	<211>	18	
30	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
	<223>	Праймер	
35	<400>	59	
		aggcgtgagg ttgttgtt	18
	<210>	60	
40	<211>	22	
	<212>	ДНК	
	<213>	Штучна послідовність	
	<220>		
45	<223>	Зонд	
	<400>	60	
		aggcgttaca tcatcaactc ca	22
50			

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Композиція, яка містить метилобактерію, де
 - (i) метилобактерія має послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 9-11; або
 - (ii) метилобактерія являє собою NLS0109.
2. Композиція за п. 1, де зазначена метилобактерія інгібує ріст патогенного гриба рослини, вибраного з групи, яка складається із *Blumeria* sp., *Cercospora* sp., *Cochliobolus* sp., *Colletotrichum* sp., *Diplodia* sp., *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumanomyces* sp., *Macrophomina* sp., *Magnaporthe* sp., *Microdochium* sp., *Peronospora* sp., *Phakopsora* sp., *Phialophora* sp., *Phoma* sp., *Phymatotrichum* sp., *Phytophthora* sp., *Pyrenophora* sp., *Pyricularia* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerophthora*, *Sclerospora* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., *Septoria* sp., *Stagonospora* sp., *Stenocarpella* sp. або *Verticillium* sp.
3. Композиція за п. 2, де зазначений патогенний гриб рослини являє собою *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Cercospora* sp., *Septoria* sp., *Pythium* sp., *Puccinia* sp. або *Sclerotinia* sp.
4. Композиція за п. 3, де зазначений *Fusarium* sp. являє собою *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* або *Fusarium solani*; де зазначений *Rhizoctonia* sp. являє собою *Rhizoctonia solani* або *Rhizoctonia cerealis*; де зазначений *Colletotrichum* sp. являє собою *Colletotrichum graminicola*; де зазначений *Cercospora* sp. являє собою *Cercospora zeae-maydis*, *Cercospora soja* або *Cercospora kikuchii*; де зазначений *Septoria* sp. являє собою *Septoria glycines* або *Septoria tritici*; де зазначений *Pythium* sp. являє собою *Pythium sylvaticum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium torulosum*, *Pythium lutarium* або *Pythium oopapillum*; де зазначений *Puccinia* sp. являє собою *Puccinia sorghi*, або де зазначений *Sclerotinia* sp. являє собою *Sclerotinia sclerotiorum* або *Sclerotinia homoeocarpa*.
5. Композиція за п. 1, де композиція додатково містить штам метилобактерії NLS0017, NLS0020, NLS0089, штам метилобактерії, що має послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 21-24, 37-39 або 49-51.
6. Композиція за будь-яким із пп. 2-5, де *Methylobacterium* sp., що інгібує ріст патогенного гриба рослини, являє собою NLS0109.
7. Композиція за будь-яким із пп. 1-6, де композиція додатково містить фунгіцид.
8. Композиція за п. 7, де зазначений фунгіцид являє собою стробілурин, триазол, феніламід, тіазолкарбоксамід або піперидинілтiazолізоксазоліновий фунгіцид.
9. Композиція за п. 8, де фунгіцид стробілурина являє собою азоксистробін, піраклостробін, флуоксистробін або трифлуксистробін.
10. Композиція за п. 8, де фунгіцид являє собою феніламід, тіазолкарбоксамід або піперидинілтiazолізоксазоліновий фунгіцид.
11. Композиція за п. 10, де фунгіцид являє собою металаксил, мефеноксам, етабоксам або оксатіапіпролін.
12. Композиція за п. 8, де триазольний фунгіцид являє собою тебуконазол.
13. Спосіб пригнічення захворювання, викликаного патогенним грибом рослини, який включає нанесення композиції за будь-яким із пп. 1-12 на рослину, частину рослини, вибрану з групи, яка складається з листка, стебла, плода, квітки, кореня, бульби і насіння, на ґрунт, в якому вирощують рослину, або на будь-яку їхню комбінацію у кількості, яка інгібує ріст зазначеного патогенного гриба рослини, у такий спосіб зменшуючи несприятливі ефекти, викликані зазначеним патогенним грибом рослини у зазначеній рослині, частині рослини або у рослині, одержаній з них, порівняно з інфекцією у контрольній рослині, частині рослини або рослині, до якої не застосовували зазначену композицію або яка не росла в ґрунті, обробленому композицією.
14. Спосіб за п. 13, де рослина або частина рослини являє собою злакову рослину або частину рослини.
15. Спосіб за п. 14, де злакова рослина або частина рослини вибрана з групи, яка складається з рослини або частини рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса і жита.
16. Спосіб за п. 13, де метилобактерія являє собою NLS0109 або штам метилобактерії, яка містить будь-яку з SEQ ID NO: 9-11.
17. Спосіб за п. 16, який додатково включає нанесення другої метилобактерії на рослину, частину рослини, ґрунт, в якому вирощують рослину, або на будь-яку їхню комбінацію, де зазначена друга метилобактерія являє собою NLS0017, NLS0020, NLS0089 або *Methylobacterium* sp., що містить будь-яку з SEQ ID NO: 21-24, 37-39 або 49-51.
18. Спосіб за п. 17, де другу метилобактерію наносять на ґрунт у борозни з частиною рослини, на насінину, з якої вирощують рослину, або на рослину.

19. Спосіб за п. 17, де метиловактерію NLS0109 і зазначену другу метиловактерію застосовують одночасно.
20. Спосіб за будь-яким із пп. 13-19, де зазначений спосіб додатково включає застосування фунгіциду в композиції, яка містить зазначену метиловактерію, або після застосування зазначеної метиловактерії.
21. Спосіб за п. 20, де фунгіцид являє собою азоксистробін, піраклостробін, флуоксистробін або трифлуксистробін.
22. Спосіб за п. 21, де фунгіцид стробілурину являє собою піраклостробін.
23. Спосіб за п. 20, де фунгіцид є активним проти *Pythium sp.*
24. Спосіб за п. 20, де фунгіцид являє собою металаксил, мефеноксам, етабоксам або оксатіапіпролін.
25. Спосіб за п. 24, де фунгіцид являє собою металаксил.
26. Спосіб створення композиції за будь-яким із пп. 1-12, який включає комбінування зазначеної метиловактерії із сільськогосподарсько прийнятним ексципієнтом і/або сільськогосподарсько прийнятним ад'ювантом.
27. Спосіб за п. 26, де композиція являє собою емульсію.
28. Спосіб за п. 26, де метиловактерія являє собою NLS0109.
29. Виділена метиловактерія, яка інгібує ріст патогенного гриба рослини, де метиловактерія має 16S РНК, що має щонайменше 99, 99,5 або 100 % ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 8 або має послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 9-11.
30. Метиловактерія за п. 29, де зазначена метиловактерія являє собою NLS0109.
31. Метиловактерія за п. 29, де зазначений патогенний гриб рослини вибраний з групи, яка складається із *Blumeria sp.*, *Cercospora sp.*, *Cochliobolus sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Diplodia sp.*, *Exserohilum sp.*, *Fusarium sp.*, *Gaeumanomyces sp.*, *Macrophomina sp.*, *Magnaporthe sp.*, *Microdochium sp.*, *Peronospora sp.*, *Phakopsora sp.*, *Phialophora sp.*, *Phoma sp.*, *Phymatotrichum sp.*, *Phytophthora sp.*, *Pyrenophora sp.*, *Pyricularia sp.*, *Pythium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerophthora sp.*, *Sclerosporea sp.*, *Sclerotium sp.*, *Sclerotinia sp.*, *Septoria sp.*, *Stagonospora sp.*, *Stenocarpella sp.* і *Verticillium sp.*
32. Метиловактерія за п. 29, де зазначений патогенний гриб рослини являє собою *Fusarium sp.*
33. Метиловактерія за п. 32, де зазначений *Fusarium sp.* вибраний з групи, яка складається з *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* і *Fusarium solani*.
34. Рослина, яка щонайменше частково покрита композицією за будь-яким із пп. 1-12.
35. Рослина за п. 34, де рослина являє собою злакову рослину.
36. Рослина за п. 35, де злакова рослина вибрана з групи, яка складається з рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса і жита.
37. Виділена частина рослини, вибрана з групи, яка складається з листка, стебла, плода, квітки, кореня, бульби і насіння, яка щонайменше частково покрита композицією за будь-яким із пп. 1-12.
38. Частина рослини за п. 37, де частина рослини являє собою частину злакової рослини.
39. Частина рослини за п. 38, де частина злакової рослини вибрана з групи, яка складається з частини рослини рису, пшениці, кукурудзи, ячменю, проса, сорго, вівса і жита.
40. Спосіб визначення присутності штаму метиловактерії NL0109, NLS0020, NLS0017 або NLS0089 у зразку, де зазначений спосіб включає виявлення присутності в зразку нуклеїнової кислоти, яка містить або знаходиться в межах SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37, 38 або 49-51.
41. Спосіб за п. 40, де виявлення послідовності включає полімеразну ланцюгову реакцію, розгалужену ДНК, лігазну ланцюгову реакцію, опосередковану транскрипцією ампліфікацію (ТМА), ампліфікацію на основі послідовності нуклеїнових кислот (NASBA), секвенування через нанопори, мас-спектроскопію, гібридизацію або метод прямого секвенування, або будь-яку їхню комбінацію.
42. Спосіб за п. 40, де зазначене виявлення включає етапи:
 - (i) приведення у контакт зразка з парою ДНК-праймерів, де зазначена пара праймерів містить прямий і зворотний праймери для ампліфікації фрагмента ДНК, що містить або розташований в межах SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37, 38 або 49-51, у такий спосіб створюючи фрагмент ДНК,
 - (ii) приведення у контакт зазначеного фрагмента ДНК із зондом, специфічним щодо присутності зазначеного фрагмента ДНК, і
 - (iii) порівняння результатів зазначеного приведення у контакт з позитивними і негативними контролюми для визначення присутності SEQ ID NO: 9-11, 21-24, 37, 38 або 49-51 у зазначеному зразку.

43. Спосіб за п. 40, де зазначений зразок являє собою рослинний матеріал, який обробляли одним або більше штамми метилових бактерій, вибраними з NLS0109, NLS0020, NLS0017 або NLS0089.
44. Спосіб за п. 42, де зазначений рослинний матеріал являє собою листя, коріння або насіння.
- 5 45. Спосіб за п. 42, де рослинний матеріал являє собою рослинний продукт з рослини, обробленої одним або більше штамми метилових бактерій, вибраними з NLS0109, NLS0020, NLS0017 або NLS0089.
46. Спосіб за п. 40, де зазначений зразок являє собою зразок ґрунту.

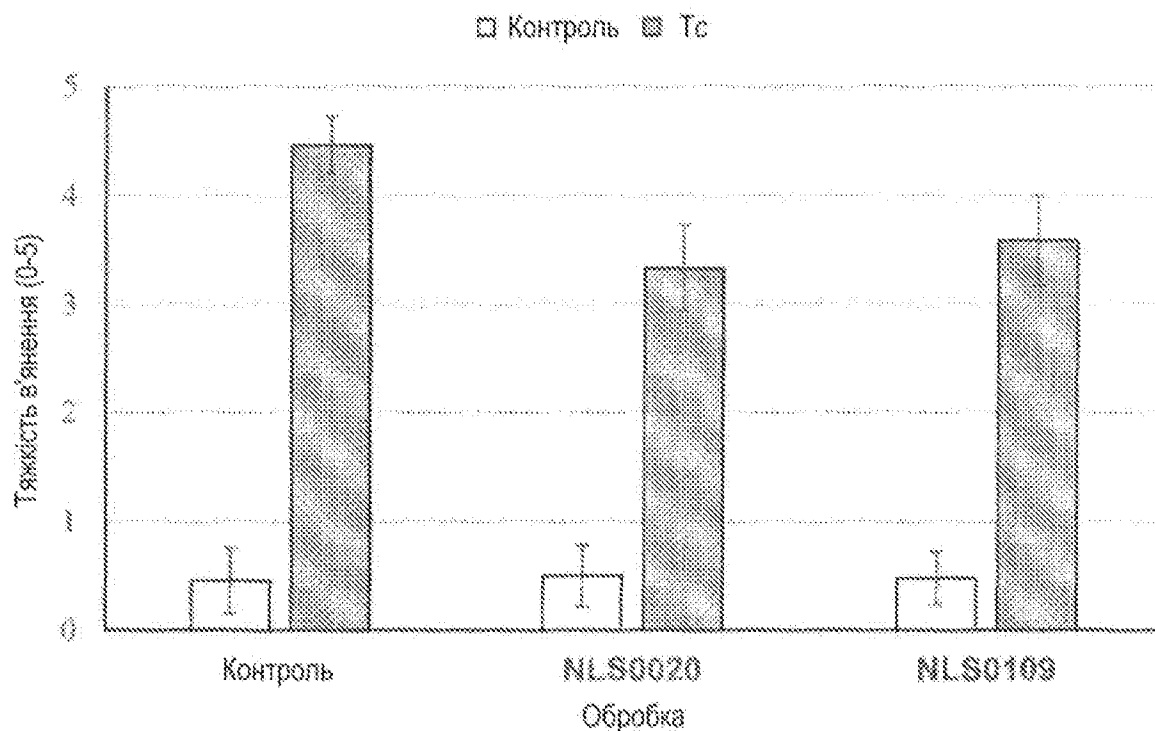
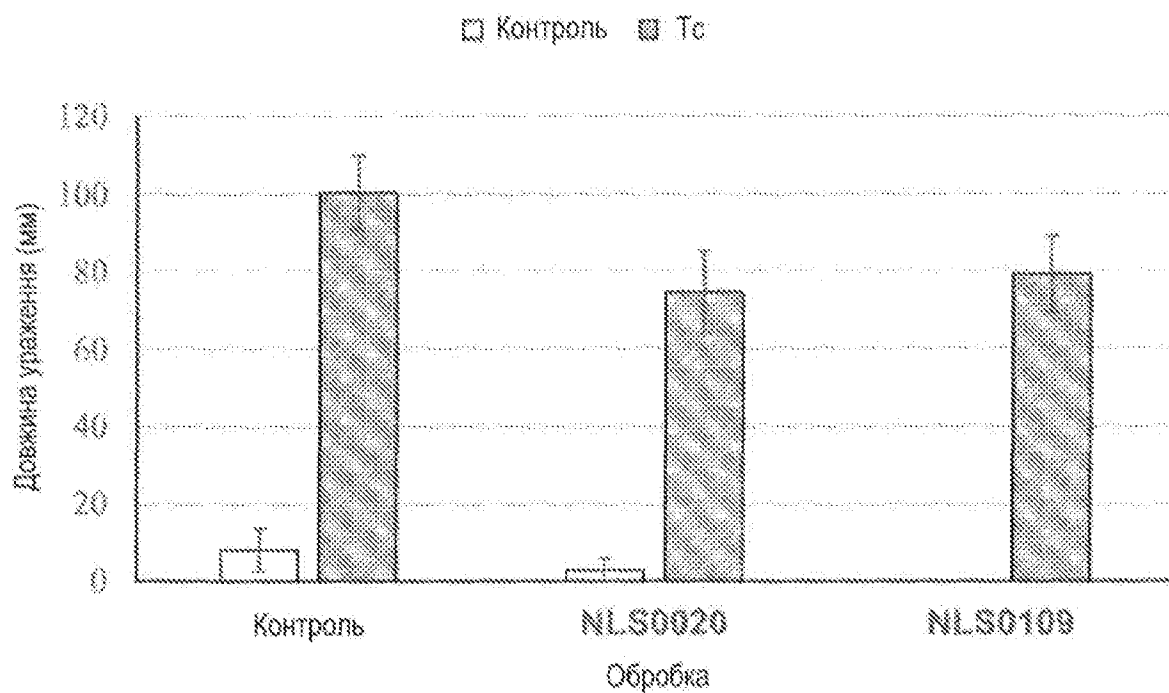
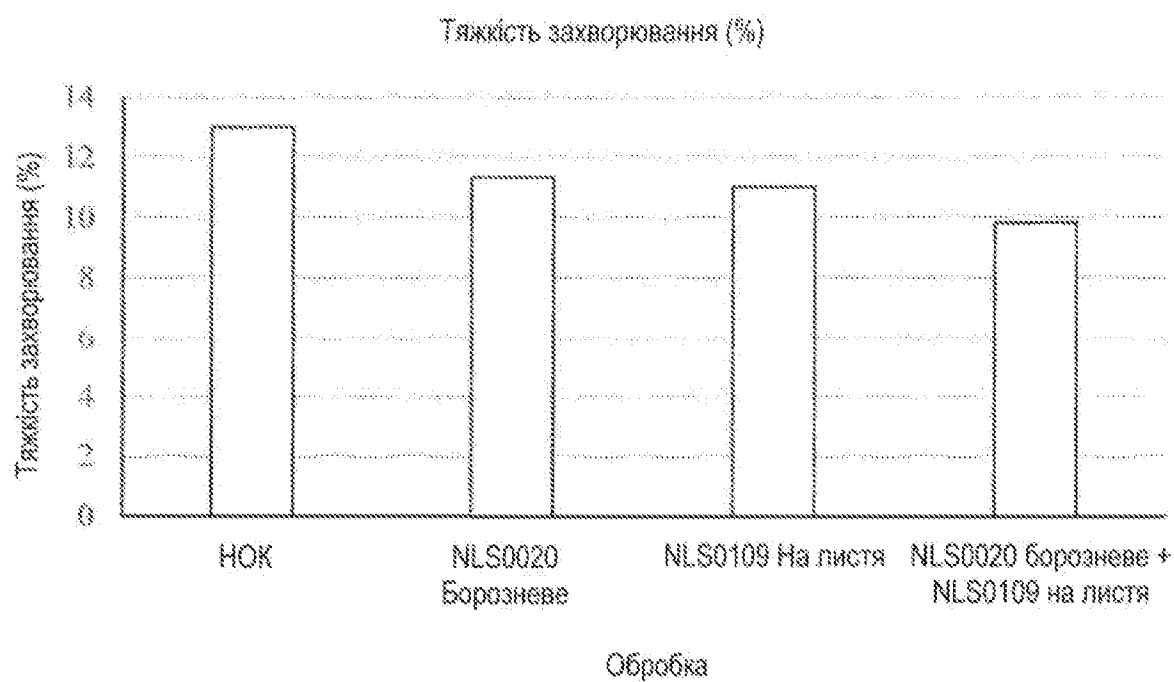


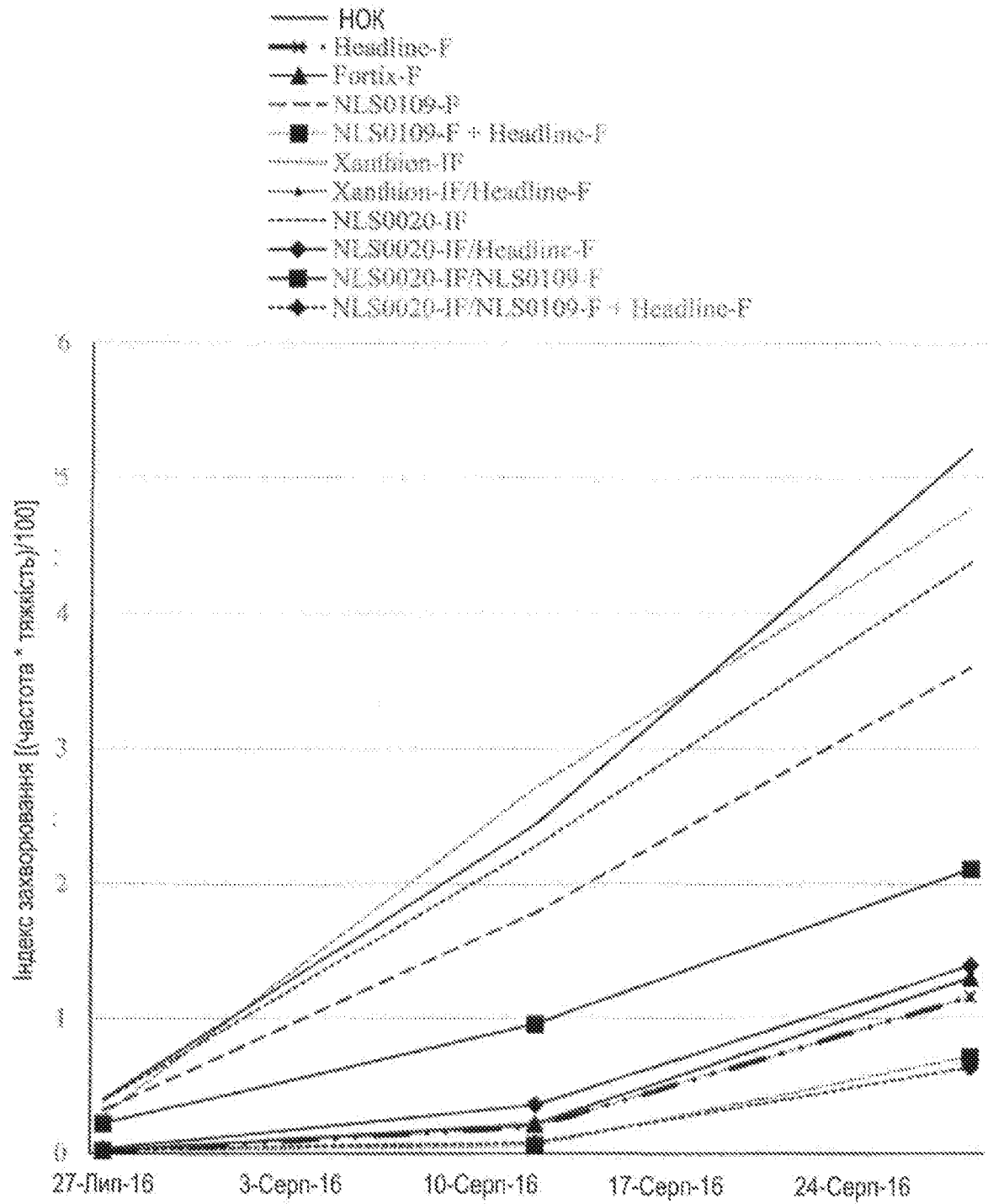
Fig. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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