(19) **RU** (11) **2 154 943** (13) **C2**

(51) МПК[7] **A 01 N 63/00, C 12 N 1/20//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:39)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96117351/13, 11.01.1995

(24) Дата начала действия патента: 11.01.1995

(30) Приоритет: 24.01.1994 US 08/185.623

(46) Дата публикации: 27.08.2000

(56) Ссылки: WO 92/18613 A1, 29.10.92. EP 0106504 A1, 25.04.84. EP 0472494 A2, 26.02.92.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 24.08.1996

(86) Заявка PCT:
IB 95/00023 (11.01.1995)

(87) Публикация PCT:
WO 95/20040 (27.07.1995)

(98) Адрес для переписки:
101000, Москва, Малый Златоустинский пер. д.10, кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", Веселицкой И.А.

(71) Заявитель:
АграСол Инк. (US)

(72) Изобретатель: Стивен ЛЭМ (US), Нэнси ТОРКЕВИТЗ (US)

(73) Патентообладатель:
АграСол Инк. (US)

RU 2154943 C2

(54) ШТАММ PSEUDOMONAS FLUORESCENS, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ БОРЬБЫ С ФИТОПАТОГЕННЫМИ ГРИБАМИ (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ЕГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ, КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ДАННЫЙ ШТАММ И СПОСОБ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(57)

Изобретение относится к средствам борьбы с болезнями растений. Выделены новые штаммы бактерий Pseudomonas fluorescens NRRL B-21172 и NRRL B-21173 для борьбы с фитопатогенными грибами. Для выделения указанных штаммов создают библиотеку транспозонных инсерционных мутантов штамма Pseudomonas, тестируют мутанты на способность ингибировать фитопатогенный гриб in vitro и отбирают мутанты по их эффективности ингибирования фитопатогенного гриба, в частности гриба Rhizoctonia solani. На основе штаммов создана композиция для борьбы с фитопатогенными грибами, дополнительно включающая носитель, содержащий пленкообразующий водорастворимый несшитый полимер, или структурно сшитый, разбухающий в воде полисахарид. Исходная концентрация микроорганизмов в композиции 1×10^5 - 1×10^{11} КОЕ (колониеобразующих единиц) в 1 г. В качестве полимера могут быть использованы крахмал, альгинат, каррагенан, ксантан, мука сладкого стручка или метилцеллюлоза или их смесь. Полученной композицией обрабатывают растения или их части, или семена для защиты их от фитопатогенных грибов, в частности грибов вида Rhizoctonia solani. Эффективность композиции 60-90%. 6 с. и 20 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2154943 C2

(19) **RU** (11) **2 154 943** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **A 01 N 63/00, C 12 N 1/20//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:39)**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **96117351/13, 11.01.1995**

(24) Effective date for property rights: **11.01.1995**

(30) Priority: **24.01.1994 US 08/185.623**

(46) Date of publication: **27.08.2000**

(85) Commencement of national phase: **24.08.1996**

(86) PCT application:
IB 95/00023 (11.01.1995)

(87) PCT publication:
WO 95/20040 (27.07.1995)

(98) Mail address:
101000, Moskva, Malyj Zlatoustinskij per. d.10, kv.15, "EVROMARKPAT", Veselitskoj I.A.

(71) Applicant:
AgraSol Ink. (US)

(72) Inventor: **Stiven LEhM (US), Nehnsi TORKEVITZ (US)**

(73) Proprietor:
AgraSol Ink. (US)

(54) STRAIN PSEUDOMONAS FLUORESCENS DESIGNATED FOR CONTROL OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI (VARIANTS), METHOD OF ITS ISOLATION AND USE, COMPOSITION CONTAINING THIS STRAIN AND METHOD OF ITS USE

(57) Abstract:

FIELD: agriculture, microbiology. SUBSTANCE: invention relates to agents used for control of plant sicknesses. New strains of bacterium Pseudomonas fluorescens NRRL B-21172 and NRRL B-21173 for control of phytopathogenic fungi are isolated. For isolation of indicated strains the library of transposone insertion mutants of the strain Pseudomonas is developed. Mutants are tested for capability to inhibit phytopathogenic fungus in vitro and mutants are selected on the basis of effectiveness of inhibition of phytopathogenic fungus, in part, fungus Rhizoctonia solani. On the base of strains the composition is developed for control of phytopathogenic fungi containing additionally a carrier with film-forming water-soluble noncross-linked polymer and cross-linked water-swelling polysaccharide. The parent concentration of microorganisms in the composition is 1×10^5 - 1×10^{11} CFU (colony-forming units) per 1 g. Starch, alginate, carrageenan, xanthane, sweet pod meal, methylcellulose or their mixture can be used as polymer. Obtained composition is used for treatment of plants or their parts, or seeds to protect their from phytopathogenic fungi, in part, fungi of species Rhizoctonia solani. Effectiveness of the composition is 60-90%. EFFECT: improved method of isolation, enhanced effectiveness of composition. 26 cl, 1 tbl, 10 ex

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

Настоящее изобретение относится к идентификации мутантных штаммов бактерий рода Pseudomonas с улучшенными характеристиками для биологической борьбы. В частности, оно относится к штаммам, эффективным в отношении фитопатогенных грибов.

Известно, что культурные растения, произрастающие на некоторых почвах, обладают природной устойчивостью к определенным патогенным грибам. Более того, почвы, благоприятные для развития этих болезней, могут становиться супрессивными или устойчивыми к патогену при добавлении небольшого количества почвы из супрессивного поля (Scher и Baker (1980), Phytopathology 70:412-417). И наоборот, супрессивные почвы можно сделать благоприятными для развития и чувствительными к грибному заболеванию путем автоклавирования, что свидетельствует о том, что факторы, ответственные за борьбу с болезнью, являются биологическими. Последующее исследование показало, что за это явление, известное как биологическая борьба с болезнями, ответственны бактерии, образующие колонии на корнях растений (Cook и Baker (1983), The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens; Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, MN).

Во многих случаях штаммы бактерий, наиболее эффективные для биологической борьбы с болезнями, относятся к флуоресцирующим псевдомонадам (Weller и др. (1983), Phytopathology 73:463-469). Также было обнаружено, что эти бактерии при отсутствии специфического патогенного гриба стимулируют рост растений путем подавления присутствующей в большинстве почв вредной микрофлоры ризосферы (прикорневой зоны растения) (Kloepper и др. (1981), Phytopathology 71: 1020-1024). Важные фитопатогены, с которыми можно эффективно бороться путем инокуляции семян этими бактериями, включают Gaemannomyces graminis, возбудителя такого заболевания, как офиоболез (гниль корневой шейки) пшеницы (Cook и др. (1976), Soil Biol. Biochem. 8:269-273) и Pythium и Rhizoctonia, патогены, вызывающие черную ножку хлопчатника (Howell и др. (1979), Phytopathology 69: 480-482). Rhizoctonia является особенно проблематичным фитопатогеном по ряду причин. Во-первых, этот возбудитель обладает способностью заражать широкий спектр культурных растений и, во-вторых, в настоящее время отсутствуют коммерчески доступные химические фунгициды, эффективные для борьбы с этим грибом.

Многие предназначенные для биологической борьбы с болезнями штаммы Pseudomonas вырабатывают антибиотики, ингибирующие рост патогенных грибов (Howell и др. (1979), Phytopathology 69: 480-482; Howell и др. (1980), Phytopathology 70: 712-715). Эти антибиотики были использованы для борьбы с патогенными грибами в ризосфере. В частности, Howell et al. (Phytopathology 69:480-482; 1979) описывают штамм Pseudomonas fluorescens, который, как было обнаружено, вырабатывает антибиотическое вещество, являющееся антагонистом по отношению к Rhizoctonia solani. Действительно, несколько последующих исследований было посвящено изучению воздействий мутаций, которые лишали предназначенную для борьбы с болезнями бактерию способности синтезировать эти антибиотики (Kloepper и др. (1981), Phytopathology 71:1020-1024; Howell и др. (1983), Can. J. Microbiol. 29:321-324). В этих случаях способность организма бороться с патогеном снижалась, но не исчезала полностью.

Важным фактором биологической борьбы является способность организма конкурировать в данной окружающей среде (Baker и др. (1982), Biological Control of Plant Pathogens, American Phytopathological Society, St.Paul, Minn., стр. 61-106). Таким образом, желательно получить штаммы агентов, предназначенных для биологической борьбы, которые бы эффективно контролировали рост Rhizoctonia solani и других грибов, а также обладали способностью активно конкурировать с местными бактериями и микрофлорой, существующей в ризосфере растения.

В настоящем изобретении описаны предназначенные для биологической борьбы штаммы бактерий, обладающие способностью эффективно бороться с поражением патогенами культурных растений. Предназначенные для биологической борьбы штаммы по настоящему изобретению вырабатывают по крайней мере одно антигрибковое вещество, способное ингибировать широкий спектр фитопатогенов. Такие штаммы обладают улучшенными характеристиками для биологической борьбы и способны к активной конкуренции в ризосфере растения. Описаны также способы получения предназначенных для биологической борьбы штаммов, а также способы применения штаммов для борьбы с поражением патогенами культурных растений.

Настоящее изобретение относится к усовершенствованным, предназначенным для биологической борьбы штаммам, которые могут быть использованы для борьбы с поражением патогенами культурных растений. Такие штаммы обладают способностью активно конкурировать в ризосфере растения, а также вырабатывать одно или более противогрибковых веществ, обладающих эффективностью в отношении широкого спектра фитопатогенных грибов, в частности Rhizoctonia, более конкретно Rhizoctonia solani.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим эффективное в отношении патогенов количество усовершенствованного, предназначенного для биологической борьбы штамма по настоящему изобретению вместе с приемлемым носителем, которые могут применяться для борьбы с поражением патогенами культурных растений.

Кроме того, изобретение относится к способам борьбы или ингибирования роста фитопатогенного гриба путем обработки усовершенствованным, предназначенным для биологической борьбы штаммом по изобретению или содержащей его композицией (а) среды обитания, в которой может расти фитопатогенный гриб, (б) растения или части растения для защиты

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

указанного растения или части растения от фитопатогенного гриба, или (в) семени для защиты растения, развивающегося из указанного семени, от фитопатогенного гриба.

Предназначенные для биологической борьбы штаммы по настоящему изобретению являются важными по нескольким причинам. Во-первых, Rhizoctonia solani является особенно вредным фитопатогеном. Подверженные его действию растения включают бобы, пшеницу, томаты и картофель, и, кроме того, хлопчатник. Во-вторых, практически отсутствуют безопасные для окружающей среды и эффективные фунгициды, способные защитить культурные растения от Rhizoctonia solani. Следовательно, применение описанных, предназначенных для биологической борьбы штаммов для борьбы или предупреждения заражений Rhizoctonia solani культурных растений представляет собой первый действительно безопасный для окружающей среды и эффективный способ борьбы с этим патогеном.

Предназначенные для биологической борьбы штаммы по настоящему изобретению получают путем приготовления коллекции инсерционных мутантов, как описано ниже в экспериментальном разделе. Такие инсерционные мутантные штаммы затем подвергают скринингу in vitro по ингибирующей активности в отношении грибов. Те штаммы, которые проявляют требуемую активность, затем более детально характеризуют в тепличных и полевых опытах по биологической борьбе.

В одном примере выполнения изобретения, применяя методы молекулярной биологии, конструировали плазмиду pCIB116. pCIB116 пригодна для использования при транспозонном мутагенезе и ее переносили в штамм CGA 267356 Pseudomonas (a. k. a. 11c-1-38, см. EP 0472494A2; ATCC N 55169) для того, чтобы генерировать коллекцию инсерционных мутантов. Пригодные способы для переноса pCIB116 и других таких плазмид в штамм CGA 267356 Pseudomonas известны в данной области техники. См. Simon и др. (1983), Bio/Technology 1:784-791. Предпочтительные способы переноса ДНК в Pseudomonas включают конъюгацию из E. coli и электропорацию. См. Maniatis и др., (1989), Molecular Cloning, гл. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Кроме того, природа плазмиды не является решающим фактором для настоящего изобретения; достаточно, чтобы часть переносимой плазмиды оказалась способной к транспозиции в различные локусы генома Pseudomonas и формированию библиотеки инсерционных транспозонных мутантов, которые далее могут быть подвергнуты скринингу. Таким образом генерировали библиотеку из приблизительно 10000 различных инсерционных мутантов Pseudomonas. Их подвергали тестированию на способность in vitro ингибировать рост гриба Neurospora. Выделяли мутантов, которые приводили к появлению чистых противогрибковых зон, отличных от дикого типа, и их подвергали тестированию на способность бороться с заражением грибом Rhizoctonia solani хлопчатника в опытах в теплицах. Были обнаружены два инсерционных мутанта, обеспечивающие улучшенную борьбу с болезнью, вызываемой Rhizoctonia, в опытах на хлопчатнике. В связи с настоящей заявкой в соответствии с правилами Будапештского договора эти два штамма Pseudomonas были депонированы 21 января 1994 г. в коллекции культур Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL), официально признанной по Будапештскому договору в качестве International Deposit Authority (Международного органа депонирования), и им присвоены каталожные номера NRRL B-21172 и NRRL B-21173 соответственно.

Установлено, что могут быть выделены штаммы, которые проявляют способность бороться с одним фитопатогенным грибом или определенным их спектром. Таким образом, один предмет изобретения относится к штаммам, имеющим усиленные характеристики для биологической борьбы с грибом Rhizoctonia solani. Другой предмет изобретения относится к штаммам, имеющим усиленные характеристики для биологической борьбы в отношении определенного спектра фитопатогенных грибов.

Еще одним предметом изобретения являются композиции, содержащие эффективное в отношении патогенов количество улучшенного, предназначенного для биологической борьбы штамма Pseudomonas по настоящему изобретению вместе с приемлемым носителем, которые могут применяться для борьбы с патогенным поражением культурных растений.

Предпочтительный вариант выполнения изобретения относится к композиции, в которой носитель представляет собой гранулы, состоящие из тонкоизмельченного носителя и полимерного слоя, включающего улучшенный, предназначенный для биологической борьбы штамм Pseudomonas, где полимер представляет собой а) пленкообразующий водорастворимый и практически несшитый полимер, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас.% воды по отношению к массе гранул, или б) пленкообразующий, структурно сшитый, разбухающий в воде полисахарид, содержащий карбоксильные или сульфатные группы в присутствии ионов натрия или калия, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас.% воды по отношению к массе гранул.

Другой предмет изобретения относится к способу борьбы или ингибирования роста фитопатогенного гриба путем внесения предназначенных для биологической борьбы штаммов по настоящему изобретению или содержащей их композиции в среду обитания, в которой может развиваться фитопатогенный гриб. Эта среда может представлять собой растение(я) или части растения(ий), или семена (до посева) растения(ий), которые должны быть защищены, или согласно другому варианту она может представлять собой почву, в которой произрастает или будут выращиваться растения, которые должны быть защищены. Штаммы должны применяться в эффективном количестве, предпочтительно вместе с приемлемым носителем, т.е. в количестве, достаточном для борьбы с патогеном или для его ингибирования. Норма расхода может варьироваться в зависимости от культуры, которая должна быть защищена, эффективности предназначенного для

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

биологической борьбы штамма, патогена, с которым необходимо бороться, и степени поражения. Обычно норма расхода должна составлять от приблизительно $1,3 \bullet 10^5$ КОЕ/см до приблизительно $1,3 \bullet 10^{10}$ КОЕ/см, предпочтительно от приблизительно $1,3 \bullet 10^6$ КОЕ/см до приблизительно $1,3 \bullet 10^9$ КОЕ/см, более предпочтительно от приблизительно $1,3 \bullet 10^7$ КОЕ/см до приблизительно $1,3 \bullet 10^8$ КОЕ/см.

Другой предмет изобретения относится к способам ингибирования роста гриба Rhizoctonia solani путем внесения предназначенных для биологической борьбы штаммов по настоящему изобретению или содержащей их композиции в среду обитания, в которой может развиваться фитопатогенный гриб. Эта среда может представлять собой растение (я) или части растения(ий), или семена (до посева) растения(ий), которые должны быть защищены, или согласно другому варианту она может представлять собой почву, в которой произрастают или будут выращиваться растения, которые должны быть защищены. Как указано выше, норма расхода может варьироваться в зависимости от различных факторов. Однако обычная норма расхода должна составлять от приблизительно $1,3 \bullet 10^5$ КОЕ/см до приблизительно $5 \bullet 10^9$ КОЕ/см, предпочтительно от приблизительно $1,3 \bullet 10^6$ КОЕ/см до приблизительно $1,3 \bullet 10^9$ КОЕ/см, более предпочтительно от приблизительно $1,3 \bullet 10^8$ КОЕ/см до приблизительно $1,3 \bullet 10^8$ КОЕ/см.

Если применяют композицию, где носителем являются гранулы, состоящие из тонкоизмельченного носителя и полимерного слоя, как указано выше, то исходное количество микроорганизмов, измеряемое по концентрации клеток, может быть особенно высоким. Предпочтительно это количество микроорганизмов составляет от $1 \bullet 10^5$ до $1 \bullet 10^{11}$ КОЕ (колониеобразующих единиц) на грамм гранул.

Еще один предмет изобретения относится к способу выделения новых предназначенных для биологической борьбы штаммов, включающему стадии (1) создания библиотеки транспозонных инсерционных мутантов в штамме Pseudomonas; (2) тестирования указанных мутантов на их способность in vitro ингибировать рост тестового гриба, такого, как Neurospora; (3) сравнения чистых зон в культуре тестового гриба, образованных немутантными штаммами дикого типа и мутантными штаммами; (4) отбора мутантов, которые образуют чистые зоны, значительно отличающиеся от чистых зон немутантного штамма дикого типа; (5) последующего отбора этих выделенных мутантов по их способностям для биологической борьбы на фитопатогенных грибах с использованием тестов для биологической борьбы, известных в данной области техники.

Предназначенные для биологической борьбы штаммы по настоящему изобретению и композиции, включающие таковые, соответственно могут применяться любым способом, известным в данной области техники, включая дражирование семян эффективным количеством предназначенного для биологической борьбы штамма или внесение в борозду непосредственно в почву предназначенного для биологической борьбы штамма и обработку листьев растений. Такие способы хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в опубликованной заявке на Европейский патент EP 0472494 A2. Кроме того, штаммы по настоящему изобретению также можно смешивать в композиции с известными пестицидами способом, описанным в Международной заявке WO 94/10845, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Предназначенные для биологической борьбы штаммы по настоящему изобретению обычно применяют в виде композиций и их можно вносить на посевную площадь или на растение, которое подлежит обработке, одновременно или последовательно с другими соединениями. Эти соединения могут представлять собой как удобрения, так и источники микроэлементов, или другие препараты, влияющие на рост растения. Они могут также представлять собой избирательные гербициды, инсектициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскициды или смеси нескольких таких препаратов при необходимости вместе с дополнительными приемлемыми в сельском хозяйстве носителями, поверхностно-активными веществами или способствующими внесению адъювантами, обычно применяемыми при изготовлении композиций. Приемлемые носители и адъюванты могут быть твердыми или жидкими и соответствовать веществам, обычно применяемым в технологии изготовления композиций, например они могут представлять собой натуральные или регенерированные минеральные вещества, растворители, диспергирующие агенты, смачивающие агенты, вещества для повышения клейкости, связующие вещества или удобрения.

Композиции согласно настоящему изобретению эффективны, например, в отношении фитопатогенных грибов, относящихся к следующим классам: Ascomycetes, например Fusarium; Basidiomycetes, например Rhizoctonia; Oomycetes, относящихся к классу Phycomycetes, например Phytophthora, Pythium и Plasmopara. В качестве средств защиты растений композиции по настоящему изобретению можно применять в отношении особенно вредных грибов семейства несовершенных грибов (Fungi imperfecti), например Cercospora и Botrytis. Вызываемая грибами рода Botrytis серая гниль винограда, земляники, яблок, лука и других видов фруктов и овощей приводит к значительному экономическому ущербу. Таким образом, композиции по настоящему изобретению могут быть особенно полезны, поскольку они проявляют высокую микробиологическую активность в отношении широкого спектра грибов. Они эффективны в отношении плесневых грибов, таких как Penicillium, Aspergillus, Rhyzopus, Fuzarium, Helminthosporium, Nigrospora и Alternaria, а также бактерий, таких как маслянокислые бактерии, и дрожжевых грибов, таких как

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

Candida. Кроме того, составы по настоящему изобретению проявляют высокую активность в отношении грибов, встречающихся на семенах или в почве. В качестве средств защиты растений составы пригодны для практического применения в сельскохозяйственной практике для защиты культурных растений, поскольку не повреждают указанные растения в результате вредных побочных эффектов.

В объем настоящего изобретения в качестве защищаемых целевых сельскохозяйственных культур включены, например, следующие виды растений: зерновые (пшеница, ячмень, кукуруза, рожь, овес, рис, сорго и родственные культурные растения), свекольные (сахарная свекла и кормовая свекла), семечковые, косточковые и ягодные культуры (яблоки, груши, сливы, персики, миндаль, вишня, земляника, малина и ежевика), бобовые растения (бобы, чечевица, горох, соя), масличные растения (рапс, горчица, мак, маслина, подсолнечник, кокос, клещевина обыкновенная, какао-бобы, арахис), тыквенные (огурец, тыква, дыня), волокнистые растения (хлопчатник, лен, конопля, джут), цитрусовые (апельсины, лимоны, грейпфруты, мандарины), овощные (шпинат, латук-салат, спаржа, капуста, морковь, лук, томаты, картофель, перец), лавровые (авокадо, корица, камфорное дерево) или такие растения, как кукуруза, табак, орехи, кофе, сахарный тростник, чай, виноград, хмель, банан и природные каучуконосы, а также декоративные растения (сложноцветные). Составы могут также применяться для защиты запасов природных продуктов, находящихся в свежесобранном или полупереработанном состоянии.

Предназначенные для биологической борьбы штаммы можно применять с помощью любого известного способа обработки семян или почвы штаммами бактерий. См. , например, патент США 4863866. Штаммы эффективны для биологической борьбы даже в том случае, если бактерия погибла. Однако предпочтительна обработка живой бактерией.

Предназначенные для биологической борьбы штаммы можно применять индивидуально или вместе с любым приемлемым для сельскохозяйственных целей носителем. Такими носителями являются адъюванты, обычно используемые в области техники препаративных форм для сельского хозяйства, и, таким образом, препаративные формы могут быть приготовлены известным способом в виде эмульсионных концентратов, покрывных паст, непосредственно разбрызгиваемых или разбавляемых растворов, разбавленных эмульсий, смачивающихся порошков, растворимых порошков, дустов, гранул, а также в виде инкапсулированных препаратов, например в полимерных веществах. Так же, как и тип композиции, способы обработки, такие как распыление, мелкокапельное опрыскивание, опыливание, разбрасывание или полив, выбирают в соответствии с требуемой целью и превалирующими обстоятельствами. Предпочтительные нормы расхода составляют обычно от приблизительно 50 г до приблизительно 5 кг действующего вещества (д. в.) на гектар ("га", приблизительно 2,471 акра), предпочтительно от приблизительно 100 г до приблизительно 2 кг д.в./га. Наиболее употребляемые нормы расхода составляют от приблизительно 200 г до приблизительно 1 кг д.в. /га и от 200 г до 500 г д.в./га. Для протравливания семян предпочтительные нормы расхода составляют от 0,5 г до 1000 г д.в. на 100 кг семян, предпочтительно от 3 г до 100 г д.в. на 100 кг семян или от 10 г до 50 г д.в. на 100 кг семян.

Предпочтительными способами применения действующего вещества по настоящему изобретению или агрохимической композиции по настоящему изобретению являются обработка листьев, дражирование семян и внесение в почву. Кратность обработок и норма расхода зависят от степени поражения соответствующим патогеном (типом гриба). Предназначенные для биологической борьбы штаммы по изобретению также могут быть нанесены на семена (дражирование) путем пропитывания семян либо жидкой композицией, содержащей предназначенные для биологической борьбы штаммы, либо путем покрытия их твердым составом. В особых случаях также возможны другие типы обработки, например избирательная обработка стеблей растений или почек.

Составы, композиции или препаративные формы, содержащие предназначенные для биологической борьбы штаммы по изобретению, и при необходимости твердый или жидкий адъювант получают известным способом, например путем гомогенного смешения и/или растирания предназначенных для биологической борьбы штаммов с наполнителями, например растворителями, твердыми носителями и при необходимости поверхностно-активными веществами.

Пригодные для композиций растворители включают ароматические углеводороды, предпочтительно фракции, содержащие 8-12 атомов углерода, например ксилоловые смеси или замещенные нафталины, фталаты, такие как дибутилфталат или диоктилфталат, алифатические углеводороды, такие как циклогексан или парафины, спирты и гликоли и их простые и сложные эфиры, такие как этанол, этиленгликольмонометиловый или -моноэтиловый эфир, кетоны, такие как циклогексанон, сильно полярные растворители, такие как N-метил-2-пирролидон, диметилсульфоксид или диметилформамид, а также эпоксидированные растительные масла, такие как эпоксидированное кокосовое масло или соевое масло; или воду.

Применяемые твердые носители, например, для дустов и диспергирующихся порошков, обычно представляют собой природные минеральные наполнители, такие как кальцит, тальк, каолин, монтмориллонит или аттапульгит. Для улучшения физических свойств также возможно добавление высокодисперсной кремниевой кислоты или высокодисперсных абсорбирующих полимеров. Приемлемые гранулированные адсорбирующие носители относятся к типу пористых и включают, например, пемзу, кирпичную крошку, сепиолит или бентонит, а приемлемые несорбирующие носители представляют собой такие материалы, как кальцит или песок. Кроме того, можно применять большое число предварительно гранулированных материалов

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

неорганического или органического происхождения, например, главным образом доломит или распыленные остатки растений.

Приемлемыми поверхностно-активными соединениями являются неионогенные, катионогенные и/или анионогенные поверхностно-активные вещества, обладающие хорошими эмульгирующими, диспергирующими и смачивающими свойствами. Под "поверхностно-активными веществами" также подразумеваются смеси поверхностно- активных веществ.

Приемлемыми анионогенными поверхностно-активными веществами могут служить как водорастворимые мыла, так и водорастворимые синтетические поверхностно-активные соединения.

Пригодными мылами являются соли щелочных металлов, соли щелочноземельных металлов или незамещенные или замещенные аммониевые соли высших жирных кислот (цепи, содержащие от 10 до 22 атомов углерода), например натриевые или калиевые соли олеиновой или стеариновой кислоты, или природные смеси жирных кислот, которые могут быть получены, например, из кокосового масла или таллового масла. Можно применять метилтауриновые соли жирных кислот.

Однако более часто применяют так называемые синтетические поверхностно-активные вещества, прежде всего алифатические сульфонаты, алифатические сульфаты, сульфированные производные бензимидазола или алкиларилсульфонаты.

Алифатические сульфонаты или сульфаты обычно представлены в форме солей щелочных металлов, солей щелочно-земельных металлов или незамещенных или замещенных аммониевых солей и содержат алкильный радикал, содержащий 8-22 атомов углерода, который также включает алкильный остаток алкильных радикалов, как, например, натриевая или кальциевая соль лигносульфоновой кислоты, в форме додецилсульфата или смеси сульфатов алифатических спиртов, полученных из природных жирных кислот. Эти соединения также включают соли сложных эфиров серной кислоты и сульфоновые кислоты аддуктов алифатического спирта/этиленоксида. Производные сульфированного бензимидазола предпочтительно содержат 2 группы сульфоновой кислоты и один радикал жирной кислоты, содержащий 8-22 атомов углерода. Примерами алкиларилсульфонатов являются натриевая, кальциевая или триэтаноламиновая соли додецилбензолсульфоновой кислоты, дибутилнафталинсульфоновой кислоты или продукта конденсации нафталинсульфоновой кислоты/формальдегида. Также приемлемы соответствующие фосфаты, например предпочтительны соли в форме галогенидов, метилсульфатов или этилсульфатов, например стеарилтриметиламмонийхлорид или бензилди(2-хлорэтил)этиламмонийбромид, или соли эфира фосфорной кислоты аддукта пара-нонилфенола с 4-14 молями этиленоксида.

Неионогенные поверхностно-активные вещества предпочтительно являются полигликольэфирными производными алифатических или циклоалифатических спиртов или насыщенных или ненасыщенных жирных кислот и алкилфенолов, причем указанные производные содержат 3-30 гликолевых эфирных групп и 8-20 атомов углерода в (алифатическом) углеводородном остатке и 6-18 атомов углерода в алкильном остатке алкилфенолов.

Кроме того, приемлемыми неионогенными поверхностно-активными веществами являются водорастворимые аддукты полиэтиленоксида и полипропиленгликоля, этилендиаминпропиленгликоля и алкилполипропиленгликоля, содержащие 1-10 атомов углерода в алкильной цепи, причем указанные аддукты содержат 20-250 этиленгликолевых эфирных групп и 10-100 пропиленгликолевых эфирных групп. Эти соединения обычно содержат 1-5 звеньев этиленгликоля на 1 звено пропиленгликоля.

Характерными примерами неионогенных поверхностно-активных веществ являются нонилфенолполиэтоксиэтанолы, полигликолевые простые эфиры касторового масла, аддукты полипропилен/полиэтиленоксида, трибутилфеноксиполиэтоксиэтанол, полиэтиленгликоль и октилфеноксиэтоксиэтанол. Сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана и полиоксиэтиленсорбитан-триолеат также являются пригодными неионогенными поверхностно-активными веществами.

Катионогенными поверхностно-активными веществами предпочтительно являются четвертичные соли аммония, имеющие в качестве N-заместителя по крайней мере один C_8-C_{22}алкильный радикал, а в качестве дополнительных заместителей - низший незамещенный или галогенированный алкильный, бензильный или низший гидроксиалкильный радикалы. Предпочтительны соли в форме галогенидов, метилсульфатов или этилсульфатов, например стеарилтриметиламмонийхлорид или бензилди(2-хлорэтил) этиламмонийбромид.

Поверхностно-активные вещества, обычно применяемые в области техники получения препаративных форм, описаны, например, в "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publishing Corp. Ringwood, New Jersey, 1979, и у Sisely и Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents", Chemical Publishing Co., Inc., New York, 1980.

Сельскохозяйственные композиции обычно содержат от приблизительно 0,1 до приблизительно 99%, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 95% и наиболее предпочтительно от приблизительно 3 до приблизительно 90% действующего вещества, от приблизительно 1 до приблизительно 99,9%, предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 99% и наиболее предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 95% твердого или жидкого адъюванта и от приблизительно 0 до приблизительно 25%, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 25% и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 20% поверхностно-активного вещества.

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

Предпочтительными в соответствии с настоящим изобретением являются составы, содержащие в качестве действующего вещества живые микроорганизмы и представляющие собой полимерные гели, сшитые многовалентными катионами и содержащие эти микроорганизмы. Это описано, например, у D.R. Fravel и др. в Phytopathology, том 75, N 7, 774-777, 1985, при использовании альгината в качестве полимерного материала. Из этой публикации также известно, что совместно с полимером могут быть использованы материалы, выполняющие роль носителя. Эти составы, как правило, получают путем смешения растворов природных или синтетических гельобразующих полимеров, например альгинатов, и водных растворов солей, содержащих ионы многовалентных металлов, с образованием отдельных капель, чтобы дать возможность микроорганизмам суспендироваться в одном из двух или в обоих реакционных растворах. Образование геля начинается со смешения в капельной форме. Возможна последующая сушка этих гелевых частиц. Этот процесс называют ионотропным гелеобразованием. В зависимости от степени высушивания образуются компактные и твердые частицы полимеров, которые структурно сшиты многовалентными катионами и содержат в основном однородно распределенные микроорганизмы и носитель. Размер частиц может составлять до 5 мм.

Композиции, основанные на частично сшитых полисахаридах, которые, кроме микроорганизма, могут также включать, например, в качестве материала-носителя тонкоизмельченную кремниевую кислоту, сшивание которых может происходить, например, ионами Ca^{++}, описаны в EP-A1-0097571. Композиции имеют водную активность не выше 0,3. W.J.Cornick et al. в обзорной статье [New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases, стр. 345-372, Alan R.Liss, Inc. (1990)] описывают различные системы препаративных форм, гранул с использованием в качестве носителя вермикулита и компактные альгинатные гранулы, полученные с помощью указанного выше процесса ионотропного гелеобразования. Такие композиции также описаны у D. R. Fravel в Pesticide Formulations and Application Systems: 11-й том, ASTM STP 1112 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1992, стр. 173-179, и могут быть использованы для получения препаративных форм на основе предназначенных для биологической борьбы штаммов Pseudomonas по настоящему изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением предпочтительны композиции, включающие гранулы, состоящие из тонкоизмельченного носителя и полимерного слоя, содержащего улучшенный предназначенный для биологической борьбы штамм Pseudomonas по изобретению, где полимер представляет собой а) пленкообразующий водорастворимый и практически несшитый полимер, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас.% воды по отношению к массе гранул, или б) пленкообразующий, структурно сшитый, разбухающий в воде полисахарид, содержащий карбоксильные или сульфатные группы в присутствии ионов натрия или калия, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас.% воды по отношению к массе гранул.

Понятие "практически несшитый" в контексте настоящего описания обозначает, что нет добавок ни мономерных агентов сшивания, приводящих к образованию ковалентных связей, ни многовалентных катионов, приводящих к образованию ионотропного геля.

Понятие "структурно сшитый" в контексте настоящего описания обозначает образование пространственной сетки из отдельного полимера или смеси двух полимеров посредством водородных мостиков или путем электростатического взаимодействия ионов натрия и калия. Таким образом образуется термообратимая пространственная структура (гель), которая при нагревании изменяется, возвращаясь в исходное состояние раствора. Примерами являются структура в виде выраженной двойной винтовой спирали каррагенанов в присутствии ионов калия или структурное образование смеси каррагенан/мука сладкого стручка. Образование с помощью многовалентных ионов термически необратимой структуры не подпадает под вышеуказанное определение.

Полисахариды могут содержать одну или несколько карбоксильных или сульфатных групп на одно повторяющееся структурное звено.

Понятие "водорастворимый" в контексте настоящего описания обозначает, что в диапазоне температур между 5 и 95°C возможно получение содержащего по крайней мере 0,5 мас.% водного раствора полимера.

Гранулы предпочтительно содержат микроорганизмы в количестве от 0,1 до 10 мас. %, предпочтительно от 0,3 до 5 мас.%, и особенно предпочтительно от 0,5 до 3 мас.% сухого материала в пересчете на 1 кг гранул. Сумма всех компонентов гранул всегда составляет 100%.

Исходное количество микроорганизмов, измеряемое по концентрации клеток, может быть особенно высоким. Предпочтительно это количество микроорганизмов составляет от $1 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^{11}$ КОЕ (колониеобразующих единиц) на грамм гранул. В составе по настоящему изобретению эта концентрация живых клеток может быть сохранена в течение периода до 10 месяцев - при хранении при комнатной температуре - с лишь небольшой потерей микроорганизмов, менее чем на один порядок КОЕ.

Содержание остаточной воды предпочтительно составляет по крайней мере 1 мас. %, более предпочтительно по крайней мере 3 мас.% и особенно предпочтительно по крайней мере 5 мас.%. Верхний предел содержания воды предпочтительно составляет не более 40 мас.%, более предпочтительно не более 30 мас.% и особенно предпочтительно не более 20 мас.%. На верхний предел содержания воды оказывает влияние материал носителя, водорастворимость полимера и способ получения. В случае способов с использованием нанесения покрытия, например при нанесении покрытия из

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

порошкового материала напылением в псевдоожиженном слое, легко может быть достигнуто содержание воды от 0,5 до 20 мас. %, в то время как в случае способов экструзии содержание воды может быть выше и может составлять, например, от 0,5 до 40 мас.%.

Тонкоизмельченный материал носителя может иметь средний диаметр частицы от 1 мкм до 0,8 см, более предпочтительно от 10 мкм до 0,5 см и особенно предпочтительно от 20 мкм до 0,2 см. Он может представлять собой неорганический или органический материал. Органические материалы предпочтительно применяют для грибов, а неорганические материалы предпочтительно применяют для вегетативных клеток (бактерий). Примерами водонерастворимых органических материалов являются измельченные отруби, солома, древесная мука и целлюлоза. Неорганические носители включают, в частности, водонерастворимые оксиды металлов и соли металлов (SiO_2, Al_2O_3, $BaSO_4$, $CaCO_3$) или силикаты и алюмосиликаты щелочных и щелочноземельных металлов.
Предпочтительными силикатами являются пластинчатые силикаты. Примерами силикатов являются минералы глины, аттапульгит, кизельгур, твердые частицы извести, диатомовая земля, волластонит, оливин и вермикулит. Вермикулит особенно предпочтителен.

Количество материала носителя может составлять, например, от 50 до 99 мас.%, предпочтительно от 65 до 95 мас.% и особенно предпочтительно от 75 до 90 мас.%.

Средний размер частиц гранул может составлять от 0,01 мм до 8 мм, предпочтительно от 0,2 до 4 мм и особенно предпочтительно от 0,5 до 2 мм.

Пленкообразующий, водорастворимый и практически несшитый полимер может быть синтетическим полимером или полимером природного происхождения. Примерами синтетических полимеров являются гомо- и сополимеры на основе поливинилового спирта, полиэтиленгликоля или поливинилпирролидона и полиакриламидов. Полимеры природного происхождения главным образом представляют собой полисахариды, которые могут образовывать производные. Известно большое количество предпочтительных полимеров природного происхождения, например крахмал, альгинаты, каррагенаны, в частности k-каррагенан, t-каррагенан и 1-каррагенан, ксантан, мука сладкого стручка или метилцеллюлозы. Также могут быть использованы их смеси.

Полимеры должны быть совместимы с микроорганизмом, что может быть определено специалистом простым способом путем соединения вместе микроорганизма и полимера. Особенно предпочтительны альгинаты и каррагенаны. Комбинация вермикулита с k-каррагенаном является особенно предпочтительным сочетанием носителя и водорастворимого полимера.

Пленкообразующий, структурно сшитый, разбухающий в воде полимер представляет собой полисахарид, предпочтительно k-каррагенан, t-каррагенан, муку сладкого стручка/ксантан или их смеси, в котором присутствуют ионы натрия или калия. Эти полимеры образуют термически обратимые гели, в которых преобладают межмолекулярные водородные мостики или ионные связи.

Количество водорастворимого или разбухающего в воде полимера может составлять, например, от 0,1 до 20 мас.%, предпочтительно от 0,1 до 10 мас.% и особенно предпочтительно от 0,5 до 5 мас.%.

Молярное отношение ионов натрия или калия к карбоксильным или сульфатным группам полимеров предпочтительно составляет от 0,001:1 до 1:1.

Способ получения гранул, состоящих из тонкоизмельченного носителя и полимерного слоя, содержащего улучшенный предназначенный для биологической борьбы штамм Pseudomonas по настоящему изобретению, где полимер представляет собой а) пленкообразующий, водорастворимый и практически несшитый полимер, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас.% воды по отношению к массе гранул, или б) пленкообразующий, структурно сшитый, разбухающий в воде полисахарид, содержащий карбоксильные или сульфатные группы в присутствии ионов натрия или калия, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас.% воды по отношению к массе гранул, включает

(А) для получения гранул а) суспендирование или растворение при температурах не выше 95°С пленкообразующего и водорастворимого полимера и после охлаждения до комнатной температуры суспендирование микроорганизма в этой суспензии или растворе, или

(Б) для получения гранул б) растворение полисахарида, содержащего карбоксильные или сульфатные группы, в водном буферном растворе, содержащем ионы натрия или калия, и последующее суспендирование микроорганизма в этом растворе,

(В) смешение образовавшихся суспензий непосредственно с тонкоизмельченным материалом носителя или с водной суспензией тонкоизмельченного материала носителя, и

(Г) удаление воды до количества, составляющего не менее 0,5 мас.% по отношению к массе гранул.

Если пленкообразующий и водорастворимый полимер суспендируют для получения гранул а), процедуру предпочтительно проводят при температуре от 10 до 30°С. Если получают раствор пленкообразующего и водорастворимого полимера, то это осуществляют при температуре от 25 до 95°С в зависимости от типа полимера.

Улучшенные предназначенные для биологической борьбы штаммы по настоящему изобретению могут быть добавлены либо к полимерной суспензии при температуре ниже 40°С или к охлажденному полимерному раствору при температуре ниже 40°С, предпочтительно ниже 30°С.

При другом технологическом процессе для получения гранул б) полисахарид, содержащий карбоксильные или сульфатные группы, растворяют при необходимости при повышенной температуре, например при 70 °С, в водном буферном растворе,

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

содержащем ионы натрия или калия, или таким же образом растворяют два полимера, взаимодействующих друг с другом. Если эти растворы охлажденные, то образуется термически обратимый гель. Микроорганизм добавляют при температуре ниже 40 °С непосредственно перед точкой затвердевания.

Все калий- или натрийсодержащие соли многоосновных кислот могут быть использованы в качестве буферов. Особенно предпочтительны фосфатные буферы, такие, которые являются коммерчески доступными. Предпочтительны соли калия. Значение pH может быть установлено на уровне от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5 в зависимости от соотношения первичного кислого фосфата к вторичному кислому фосфату. Предпочтительное значение pH равно 7.

Концентрация буфера предпочтительно составляет от 0,00001 моля/л до 1 моля/л, предпочтительно от 0,005 моля/л до 0,05 моля/л. Воду удаляют как можно более осторожно, предпочтительно при комнатной температуре или при слегка повышенной температуре до приблизительно 35°С.

Аппаратура и способы удаления воды известны. Наиболее предпочтительный способ в каждом случае зависит от вязкости получаемой композиции. Гранулы по изобретению могут быть получены с помощью известных способов и с применением обычной аппаратуры. Для нанесения покрытия при смешении компонентов преимущественно применяют процессы распыления, например, с использованием реакторов с псевдоожиженным слоем. При этих способах раствор или суспензию полимера и микроорганизма напыляют на носитель, суспендированный в псевдоожиженном слое, и при этом одновременно сушат.

При другом способе гранулы по изобретению получают с помощью известных методов экструзии. При этом все компоненты смешивают с необходимым количеством воды, например, в смесителе, и смесь выдавливают через перфорированную пластину. Гранулы измельчают до требуемого размера и при необходимости сушат. Могут быть применены одночервячные экструдеры, присоединяемые грануляторы, субгрануляторы, перфорированные диафрагмы и т.п.

Получают гранулы, в которых материал носителя заключен в тонкий слой полимера, в котором распределены микроорганизмы. Как правило, не получают отдельных покрытых частиц, а образуются агломераты из нескольких частиц носителя, имеющие неправильные формы.

Получают частицы различной формы в зависимости от выбранных способов смешения и сушки. В процессе экструзии в основном получают цилиндрические структуры, в которых материал носителя и микроорганизм заключены в полимерный материал практически независимо друг от друга, в то время как в

процессе распыления в псевдоожиженном слое в основном получают агломераты материалов носителей, в которых частицы носителя заключены в тонкий слой полимера, содержащего микроорганизмы. Такая форма частиц является предпочтительной, поскольку происходит особенно быстрое высвобождение микроорганизма из тонкого слоя полимера.

Во всех случаях гранулы являются твердыми и сыпучими смесями, которые могут применяться непосредственно в виде разбрасываемых гранул. Они просты в применении и надежны, поскольку могут быть непосредственно загружены в оборудование для распределения по полю. Применяемое количество обычно составляет приблизительно от 1 кг до 20 кг.

Их можно применять на растениях, частях растений или в местах произрастания растений (плоды, цветки, листва, стебли, клубни, корни, почва) или на семенах различных культур полезных растений, и они могут подавлять и уничтожать встречающиеся грибные заболевания.

Гранулы могут быть использованы на площадях или сельскохозяйственных культурах, подлежащих обработке, одновременно или последовательно с другими действующими веществами. Другие действующие вещества могут представлять собой удобрения, носители микроэлементов, или другие препараты, оказывающие влияние на рост растения. В данном случае также можно применять избирательные гербициды, равно как и инсектициды, фунгициды, бактерициды, нематоциды, моллюскициды или смеси из двух или более этих препаратов. Изобретение также относится к применению гранул по изобретению для защиты сельскохозяйственных культур от поражения болезнями.

Примеры композиций

Пример А1

10 порций бульона Луриа объемом по 250 мл каждая, инокулированных предназначенными для биологической борьбы штаммами Pseudomonas NRRL B-21172 или NRRL B-21173, центрифугируют после 16-часового роста клеток на шейкере и дебрис ресуспендируют, добавляя до объема 40 мл 0,01М фосфатный буфер (K_2HPO_4: KH_2PO_4=1:0,78, pH=7). Нагревают до 70°С 100 мл фосфатного буфера и добавляют 0,7 г k-каррагенана так, чтобы получить 0,7%-ный раствор k-каррагенана в 0,01М фосфатном буфере. Этот раствор охлаждают до температуры, слегка превышающей точку затвердевания и смешивают с суспензией микроорганизма.

Затем эту смесь напыляют на 100 г вермикулита в псевдоожиженном слое. Получают гранулы следующего состава:

16% остаточной воды;

1,5% сухой массы микроорганизма;

81,9% вермикулита;

0,6% k-каррагенана.

Исходная концентрация составляет приблизительно $1{,}1 \cdot 10^{10}$ КОЕ/г (колониеобразующих единиц).

Для проверки стабильности при хранении концентрацию определяют через соответствующие промежутки времени.

Пример А2.

5 г k-каррагенана перемешивают с 40 г 0,01М фосфатного буфера в соответствии с примером 1. Дополнительно примешивают 10 г дебриса (30% сухого вещества), предназначенных для биологической борьбы штаммов Pseudomonas NRRL B-21172 или

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

NRRL B-21173, полученных в 50-литровом биореакторе. Композицию полимер/микроорганизм смешивают до однородности со 120 г порошка вермикулита и затем смесь экструдируют. Полученные таким образом гранулы сушат до требуемого содержания воды в псевдоожиженном слое. Получают гранулы следующего состава:

18% остаточной воды;

1,8% сухой массы микроорганизма;

77% вермикулита;

3,2% k-каррагенана.

Исходная концентрация составляет приблизительно $3{,}3 \bullet 10^{10}$ КОЕ/г (колониеобразующих единиц).

Пример А3

250 мл бульона Луриа, инокулированного предназначенными для биологической борьбы штаммами Pseudomonas NRRL B-21172 или NRRL B-21173, центрифугируют после 16-часового роста клеток на шейкере и дебрис ресуспендируют, добавляя до 40 мл 0,01М фосфатный буфер в соответствии с примером 1.

Суспензию микроорганизма смешивают со 100 мл 3%-ного раствора альгината натрия в 0,01М фосфатном буфере в соответствии с примером 1 и смесь напыляют на 100 г вермикулита в псевдоожиженном слое. Получают гранулы следующего состава:

12% остаточной воды;

0,5% сухой массы микроорганизма;

85% вермикулита;

2,5% альгината натрия.

Нижеследующие примеры приведены с целью иллюстрации и не ограничивают объем изобретения.

Экспериментальная часть

Пример 1: Конструирование pCIB100

Плазмида pLRKD211 (Kroos и Kaiser, PNAS 81:5816-5820; 1984) содержит способный к транспозиции элемент Tn5-lac (кодирующий устойчивость к канамицину) с не имеющим промотора (в E.coli) слитым геном trp-lac, встроенным в IS50L элементом Tn5 в нужной ориентации для того, чтобы слить экспрессию lacZ с промоторами вне Tn5. Новую плазмиду pCIB100 конструировали путем введения сайта мобилизации (mob) от плазмиды pSUP5011 (Simon и др., в Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interaction; Puhler, A (ред.) стр. 98-106; изд-во Springer, 1983) в pLRKD211, что дает возможность переносить путем конъюгации плазмиду в псевдомонады или другие грамотрицательные бактерии. Плазмиды pSUP5011 и pLRKD211 разлагали индивидуально с помощью рестриктаз SalI и HindIII и образовавшиеся фрагменты разделяли с помощью электрофореза в агарозе с низкой температурой плавления. Полосу ДНК, соответствующую фрагменту SalI-HindIII, содержащему слитый trp-lac в pLRKD211, вырезали из геля и добавляли к полученному аналогичным образом фрагменту SalI-HindIII, содержащему сайт mob из pSUP5011. Линирование осуществляли в агарозе (Methods of Enzymology; том 101, глава 3; Academic Press, New York).

Было установлено, что репортерный слитый ген trp-lac в pCIB100 приводит к существенной экспрессии гена lacZ в Pseudomonas. Заявители создали конструкцию lac без trp-области и показали, что она обладает удовлетворительными характеристиками в качестве лишенного промотора репортерного гена. Плазмиду, содержащую эту конструкцию, обозначили как pCIB116.

Пример 2: Конструирование pCIB114

Плазмида pMC874 (Casadaban и др., J. Bacteriol. 143:971-980; 1980) имеет участок оперона lac, в котором отсутствует кодирующая область для первых 8 аминокислот lacZ (лишенный промотора неполный ген, обозначенный как lacZ'). Эта плазмида пригодна для конструирования плазмиды-предшественника последующей плазмиды, которая может применяться в соответствии со способом по изобретению для получения инсерционных мутантов. В этом примере выполнения изобретения плазмиду pMC874 разлагали с помощью SalI и синтетическую олигонуклеотидную пару нижеуказанного строения сшивали с концами SalI:

5'-TCGAGATCTAAA-3' [SEQ ID NO 1]

3'-CTAGATTT-5'[SEQ ID NO 2]

Полученную смесь разлагали с помощью BglII и лигировали с разложенным с помощью BglII pRK290 (Ditta и др., PNAS 77: 7347-7351; 1980). Эту конструкцию обозначили как pCIB113.

Конструировали синтетическую олигонуклеотидную пару со следующей последовательностью:

5'-AAAGGAGATCTGGATCCAGGAGAAGCTTGCATGCTA-3'[SEQ ID NO 3]

3'-TTTCCTCTAGACCTAGGTCCTCTTCGAACGTACGATCTAG-5' [SEQ ID NO 4]

Эта нуклеотидная пара при слиянии с 5'-концом лишенного промотора гена lacZ' должна поставлять следующие сайты (по порядку): BglII-BamHI-сайт, связывающий рибосому E.coli-HindIII-SphI(ATG для начала трансляции)-BglII-конец.

Плазмиду pCIB113 разлагали с помощью BamHI и лигировали с описанной выше синтетической олигонуклеотидной парой. Строение олигонуклеотидной пары приводит к сшиванию в одной ориентации с BglII-концом, сшитым с BamHI-концом lacZ', и приводит к потере сайта BamHI. Затем эту конструкцию разлагали с помощью BglII и выделяли и очищали от агарозы небольшой (3,0 т.п.н.) фрагмент олиго+lacZ'+lacY. Для конструирования плазмиды pCIB114 фрагмент, выделенный и очищенный таким образом, лигировали с разложенным с помощью BglII pRK290.

Пример 3: Конструирование pCIB116

(1) Плазмиду pCIB100 разлагали с помощью BamHI и HindIII. Выделяли и очищали от агарозы крупный фрагмент, несущий IS50L (54 крайние слева пары оснований), участок инициации репликации colE1 и левую половину IS50R.

(2) Плазмиду pCIB100 разлагали с помощью EcoRI и HindIII. Выделяли и очищали от агарозы крупный фрагмент, несущий IS50RL (правая половина), ген mob, маркер Kan и отдаленную от промотора часть фрагмента lacZ- lacY.

(3) Плазмиду pCIB114 разлагали с помощью BamHI и EcoRI. Выделяли и очищали от агарозных гелей фрагмент, несущий lacZ-часть молекулы. Затем его

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

смешивали с фрагментами, выделенными на вышеуказанных стадиях (1) и (2). Смесь лигировали и использовали для трасформации HB101 E.coli. Отбирали колонии, устойчивые к канамицину, и из трансформантов выделяли плазмиду ДНК и определяли правильность ориентации фрагментов. Удаляли сайт SalI путем разложения с помощью SalI, заполнения концов фрагментом Кленова и сшивания дефосфолированных ("затупленных") концов. См. Maniatis и др. (1989) Molecular Cloning, гл. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. Последовательность участка плазмиды, содержащего сочленение олигонуклеотида с IS50L, определяли с помощью методики дидеокситерминации цепи. Окончательную конструкцию обозначали как pCIB116.

Пример 4: Конструирование коллекции инсерционных мутантов штамма CGA 267356 (т.е. штамма 11c-1-38) с использованием pCIB116

Плазмиду pCIB116 трансформировали в штамм E.coli S17-1 (R.Simon и др., 1983) с использованием стандартных методов (Maniatis и др., 1989). Полученный штамм (S17-l/pCIB116) использовали в качестве донора для введения pCIB116 в штамм Pseudomonas CGA267256 путем конъюгации. Штаммы E.coli (S17-l/pCIB116) и Pseudomonas выращивали в течение ночи при 37°C в LB (бульоне Луриа). Смешивали по 0,1 мл каждого штамма и высевали на планшеты с LB-средой. Планшеты инкубировали при 37 °C в течение 3 часов, затем переходили к инкубации при 28°C в течение ночи. Затем скрещенную смесь собирали с планшета, используя 9-сантиметровые фильтры из стеклянных микроволокон фирмы Whatman и переносили на чистые планшеты с LB-средой, содержавшие ампициллин (100 мкг/мл) и неомицин (100 мкг/мл). Через 2-3 дня отдельные трансконъюганты ampR NeoR отбирали в лунки 96-луночных планшетов для микротитрования, содержавшие по 100 мкл минимальной среды Pseudomonas (LMG) + неомицин (100 мкг/мл). Планшеты для микротитрования инкубировали в течение ночи при 28°C на орбитальном шейкере при 200 об/мин. После инкубации в течение ночи в каждую лунку добавляли по 50 мкл 50%-ного глицерина и затем планшеты для микротитрования выдерживали при 80 °C. Собирали и помещали на хранение 10000 отдельных мутантов.

Пример 5: Скрининг мутантов на ингибирующую активность in vitro в отношении грибов

Отдельные инсерционные мутанты высевали в определенном порядке на планшеты (150 мм) с агаровой культурой (фирма Difco) для Neurospora. Ресуспендированные фрагменты мицелия Neurospora crassa вносили на планшеты с использованием хроматографического распылителя. После инкубации в течение ночи при 28°C в результате роста мицелия гриба на планшете образовывался темный фон за исключением областей, непосредственно примыкающих к колониям Pseudomonas, где наблюдали чистые зоны. Отбирали мутантов Pseudomonas, вызывающих образование чистых зон, которые были либо больше, либо заметно отличались от таковых, образованных диким родительским типом. Чистые зоны, образованные родительским типом, имели центральное чистое ядро и внешнюю концентрическую зону с линейным градиентом от чистой с внутренней стороны до неотличимой от мицелиального фона с внешней стороны.

Пример 6: Культивирование Rhizoctonia solani для опытов по биологической борьбе в теплицах

Rhizoctonia solani выращивали в чашках Петри на картофельно-декстрозном агаре (PDA, фирма Difco) с pH 5,6. Колбу Эрленмейера объемом 300 мл с 25 г проса и 50 мл дистиллированной воды автоклавировали и инкубировали с одним участком агара (5 мм в диаметре) из PDA-культуры с Rhizoctonia solani. После инкубации при 20°C в темноте в течение 3 недель разросшееся просо высушивали на воздухе и размалывали в мельнице Culatti (сито с размером ячеек 1 мм, 6000 об/мин).

Пример 7: Эффективность инсерционных мутантов для биологической борьбы

Инсерционные мутанты, приводящие к образованию антигрибных зон, заметно отличающихся от таковых, образованных диким типом, тестировали в тепличных опытах по биологической борьбе с патогеном Rhizoctonia solani на хлопчатнике. Результаты для двух мутантов приведены в таблице. Культуры Pseudomonas выращивали в течение ночи в бульоне Луриа при 28°C. Для опыта 1 клетки пеллетировали путем центрифугирования, затем ресуспендировали в стерильной воде до оптической плотности 2,5 при 600 нм (приблизительно $2 \bullet 10^9$ колониеобразующих единиц на мл). В отличие от этого в опыте 2 клетки разбавляли до оптической плотности (ОП) 0,25 для того, чтобы получить большее различие в эффективности биологической борьбы между диким типом и мутантными штаммами. Rhizoctonia solani культивировали на автоклавированном просе, затем сушили и растирали в порошок. Почву готовили путем смешения равных частей почвы для горшечной культуры (Metro-mix 360), песка и вермикулита. Эту смесь использовали для наполнения горшков диаметром 15 см. По периметру каждого горшка делали круговую бороздку глубиной 2 см и общей длиной 30 см. В каждую бороздку помещали по десять семян хлопчатника (Stoneville 506). Зараженный R. solani порошок проса рассыпали равномерно на семена в бороздках с расходом 100 мг/горшок с последующим внесением 20 мл бактериальной суспензии в каждый горшок. В контроле вместо бактериальной суспензии добавляли воду. Для каждого варианта обработки использовали по четыре одинаковых горшка, общее количество семян для одной обработки составляло 40 штук. Растения выращивали в камере с контролируемыми условиями окружающей среды (климатической камере) с дневным/ночным температурным режимом 26/21°C. Степень заболевания растений оценивали спустя 10 дней. Установлено, что два мутанта CGA 319115 [NRRL B-21172] и CGA 321730 [NRRL B-21173] обладали

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

лучшими характеристиками для борьбы с заболеванием по сравнению с диким родительским типом CGA 267356. Результаты этих опытов приведены в таблице.

Каждое отдельное растение оценивали по 5-бальной шкале, отражающей отсутствие симптомов болезни. После суммирования в пределах каждого варианта обработки результаты для варианта "контроль без патогена" нормировали до 100, а результаты для варианта "контроль с патогеном" нормировали до 0, соответствующим образом оценивали три других варианта обработки.

Опыт по биологической борьбе с применением гранулированных композиций

Биологическую активность гранул, полученных в соответствии с примером A1, испытывали в тепличных условиях после определенных периодов хранения при комнатной температуре. Стандартные условия опыта были следующими:

сельскохозяйственная культура: хлопчатник;

патоген: Rhizoctonia solani.

Гранулы добавляли к субстрату горшка в количестве 16 г/л субстрата горшка.

Хотя настоящее изобретение описано с использованием конкретных примеров его выполнения, необходимо отметить, что возможны различные вариации, модификации и примеры выполнения, и, следовательно, все такие вариации, модификации и примеры выполнения следует рассматривать как подпадающие под объем настоящего изобретения.

Все публикации и заявки на патент, упомянутые в настоящем описании, представляют собой характеристику уровня знаний специалистов в данной области техники, к которой относится изобретение. Все публикации и заявки на патент включены в настоящее описание в качестве ссылок в той степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана для включения в качестве ссылки.

Депонирование

В соответствии с правилами Будапештского договора следующие штаммы Pseudomonas были депонированы согласно настоящей заявке 21 января 1994 г. в коллекции культур Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL), официально признанной по Будапештскому договору в качестве Международного органа депонирования, и им присвоены следующие каталожные номера:

CGA 319115 NRRL B-21172;

CGA 321730 NRRL B-21173.

Перечень последовательностей приведен в конце описания.

Библиография

Casadaban и др., J.Bacteriol. 143:971-980, 1980.

Cook и др., Soil Biol. Biochem. 8:269-273, 1976.

Ditta и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351, 1980.

Fravel и др., Phytopathology 75:774-777, 1985.

Howell и др., Can. J. Microbiol. 29:321-324, 1983.

Howell и др., Phytopathology 69:480-482, 1979.

Howell и др., Phytopathology 70:712-715, 1980.

Kloepper и др., Phytopathology 71:1020-1024, 1981.

Kroos и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5816-5820, 1984.

Scher и др., Phytopathology 70:412-417, 1980.

Simon и др., Bio/Technology 1:784-791, 1983.

Weller и др., Phytopathology 73:463-469, 1983.

Methods of Enzimology, том 101, (ред.).

McCutcheon's Detergents and Emulsifies Annual, 1979.

Baker и др., в Biological Control of Plant Pathogens, 61-106, 1982.

Cook и др. , в The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens, 1983.

Cornick и др., Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Deseases в New Directions in Biological Control, 345-372, 1990.

Fravel и др., в Pesticide Formulations and Application Systems, (ред.), 1992, Maniatis, в: Molecular Cloning, 1989.

Simon и др., в Molecular Genetics of Bacteria-Plant Interaction, Puhler, 98-106, 1983.

Sisley и др., в Enzyklopedia of Surface Active Agents, 1980.

EP-472494.

EP-97571.

US-4863866.

WO-94/10845.

Формула изобретения:

1. Штамм Pseudomonas fluorescens NRRL B-21172, предназначенный для биологической борьбы с фитопатогенными грибами.

2. Штамм Pseudomonas fluorescens NRRL B-21173, предназначенный для биологической борьбы с фитопатогенными грибами.

3. Способ выделения штамма бактерий по любому из п.1 или 2, предназначенного для биологической борьбы с фитопатогенными грибами, включающий создание библиотеки транспозонных инерционных мутантов в штамме Pseudomonas, тестирование мутантов на их способность ингибировать тестируемый фитопатогенный гриб in vitro, сравнение чистых зон, образуемых в культуре фитопатогенного гриба немутантным штаммом дикого типа и мутантным штаммом, отбор мутантов, которые образуют чистые зоны больших размеров, чем зоны, образуемые немутантным штаммом дикого типа с последующим отбором полученных мутантов по их эффективности ингибирования фитопатогенного гриба.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что тестируемый in vitro фитопатогенный гриб представляет собой гриб вида Neurospora.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что отбор полученных штаммов осуществляют по эффективности ингибирования фитопатогенного гриба вида Rhizoctonia solani.

6. Способ борьбы или ингибирования роста фитопатогенного гриба путем обработки эффективным количеством штамма Pseudomonas fluorescens, отличающийся тем, что в качестве штамма Pseudomonas fluorescens используют штамм Pseudomonas fluorescens NRRL B-21172 или штамм Pseudomonas fluorescens NRRL B-21173.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

обработке подвергают среды обитания, в которых этот фитопатогенный гриб может расти.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что обработке подвергают растения или части растения для их защиты от фитопатогенного гриба.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что обработке подвергают семена для защиты растений, развивающихся из этих семян, от фитопатогенного гриба.

10. Способ по любому из пп.6 - 9, отличающийся тем, что фитопатогенный гриб представляет собой гриб вида Rhizoctonia solani.

11. Композиция, предназначенная для биологической борьбы с фитопатогенными грибами, содержащая эффективное в отношении патогена количество штамма Pseudomonas fluorescens и приемлемый носитель, отличающаяся тем, что в качестве штамма Pseudomonas fluorescens она включат штамм Pseudomonas fluorescens NRRL B-21172 или штамм Pseudomonas fluorescens NRRL B-21173.

12. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что носителем являются гранулы, состоящие из тонкоизмельченного носителя и полимерного слоя, где полимер представляет собой а) пленкообразующий водорастворимый практически несшитый полимер, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас.% воды по отношению к массе гранул, или б) пленкообразующий, структурно сшитый, разбухающий в воде полисахарид, содержащий карбоксильные или сульфанатные группы в присутствии ионов натрия или калия, а гранулы содержат по крайней мере 0,5 мас. % воды по отношению к массе гранул.

13. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что гранулы содержат микроорганизмы в количестве 0,1 - 10 мас.% в пересчете на 1 кг гранул.

14. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что исходная концентрация штаммов составляет приблизительно 1 x 10^5 - 1 x 10^{11} КОЕ (колониеобразующих единиц) на 1 г гранул.

15. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что пленкообразующий водорастворимый и практически несшитый полимер представляет собой синтетический полимер или полимер природного происхождения.

16. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что пленкообразующий водорастворимый и практически несшитый полимер представляет собой гомо- или сополимер на основе поливинилового спирта, полиэтиленгликоля или поливинилпирролидона и полиакриламидов.

17. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что пленкообразующий водорастворимый и практически несшитый полимер представляет собой полисахарид или производное полисахарида.

18. Композиция по п. 17, отличающаяся тем, что пленкообразующий водорастворимый и практически несшитый полимер представляет собой крахмал, альгинат, каррагенан, k-каррагенан, t-каррагенан, ксантан, муку сладкого стручка или метилцеллюлозу либо их смесь.

19. Композиция по п. 18, отличающаяся тем, что пленкообразующий водорастворимый и практически несшитый полимер представляет собой k-каррагенан, t-каррагенан или альгинат.

20. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что пленкообразующий, структурно сшитый, разбухающий в воде полимер, содержащий карбоксильные группы или сульфатные группы, представляет собой k-каррагенан, t-каррагенан, ксантан или смесь муки сладкого стручка и ксантана.

21. Композиция по п.12, отличающаяся тем, что пленкообразующий, структурно сшитый, разбухающий в воде полимер, содержащий карбоксильные группы или сульфатные группы, представляет собой k-каррагенан или t-каррагенан.

22. Способ борьбы или ингибирования роста фитопатогенного гриба путем обработки композицией, отличающийся тем, что в качестве композиции используют композицию по любому из пп.11 - 21.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что обработке подвергают среды обитания, в которой этот фитопатогенный гриб может расти.

24. Способ по п.22, отличающийся тем, что обработке подвергают растения или части растения для их защиты от фитопатогенного гриба. +

25. Способ по п.22, отличающийся тем, что обработке подвергают семена для защиты растений, развивающихся из этих семян, от фитопатогенного гриба.

26. Способ по любому из пп.22 - 25, отличающийся тем, что фитопатогенный гриб представляет собой гриб вида Rhizoctonia solani.

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

Таблица 1

Эффективность CGA 319115 и CGA 321730 для биологической борьбы

	Опыт 1	Опыт 2
Норма расхода	$1,3x10^9$ КОЕ/см	$1,3x10^8$ КОЕ/см
Контроль без патогена	100	100
Контроль с патогеном	0	0
CGA 267356 [ATCC 55169]	46	0
CGA 319115 [NRRL B-21172]	69	60
CGA 321730 [NRRL B-21173]	73	90

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ:
(A) НАИМЕНОВАНИЕ: Ciba-Geigy AG, Базель
(B) АДРЕС: CIBA-GEIGY AG
(C) УЛИЦА: Klybeckstrasse 141
(D) ГОРОД: Базель
(E) СТРАНА: Швейцария
(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС (ZIP): 4002
(G) ТЕЛЕФОН: +41 61-6961111
(H) ТЕЛЕФАКС: +41 61-6962383

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Улучшенные штаммы бактерий рода Pseudomonas для биологической борьбы

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 4

(iv) ФОРМА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ДЛЯ КОМПЬЮТЕРА:
(A) ТИП НОСИТЕЛЯ: флоппи-диск
(B) КОМПЬЮТЕР: совместимый с IBM PC
(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release #1.0, версия #1.25 (EPO)

(v) ТЕКУЩИЙ СТАТУС ЗАЯВКИ:
(A) НОМЕР ЗАВКИ: US 08/185623
(B) ДАТА ПОДАЧИ: 24 января 1994

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:1:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 12 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: другая нуклеиновая кислота

(A) ОПИСАНИЕ: Синтетический нуклеотид, применяемый для сшивания SalI-концов в конструкции pCIB113

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:1:

TCGAGATCTA AA

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:2:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 8 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: другая нуклеиновая кислота

(ix) ПРИЗНАК:
(A) ИМЯ/КЛЮЧ: misc_feature
(B) РАСПОЛОЖЕНИЕ: 1...8
(D) ПРОЧАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/note= "СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ОСТАТКИ 1-8 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:1"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:2:

TTTAGATC 8

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:3:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 36 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: другая нуклеиновая кислота
(A) ОПИСАНИЕ: Синтетический нуклеотид, обеспечивающий сайты рестрикции, сайт связывания рибосомы E.coli и начало трансляции ATG, используемый для конструирования pCIB114.

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:3:

AAAGGAGATC TGGATCCAGG AGAAGCTTGC ATGCTA 36

(2) ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:4:

(i) ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:
(A) ДЛИНА: 40 пар оснований
(B) ТИП: нуклеиновая кислота
(C) ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕПИ: одноцепочечная
(D) ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: другая нуклеиновая кислота

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2

(ix) ПРИЗНАК:
(A) ИМЯ/КЛЮЧ: misc_feature
(B) РАСПОЛОЖЕНИЕ: 5...40
(D) ПРОЧАЯ ИНФОРМАЦИЯ:/note= "СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ОСТАТКИ 1-36 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:3"

(xi) ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:4:

GATCTAGCAT GCAAGCTTCT CCTGGATCCA GATCTCCTTT 40

RU 2154943 C2

RU 2154943 C2