



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124380** (13) **C2**
(51) МПК

A01N 63/30 (2020.01)

C12N 1/14 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: a 2018 04460</p> <p>(22) Дата подання заявки: 07.10.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 09.09.2021</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/240,138</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 12.10.2015</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.08.2018, Бюл.№ 15</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 08.09.2021, Бюл.№ 36</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2016/055952, 07.10.2016</p>	<p>(72) Винахідник(и): Брук Денні Джозеф (US), Бернс II Фредрік С. (US), Преснейл Джеймс Кевін (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ПІОНІР ХАЙ-БРЕД ІНТЕРНЕТНЛ, ІНК., 7100 N.W. 62nd Avenue, P.O. Box 1014, Johnston, IA 50131-1014, United States of America (US), Е. І. ДЮ ПОН ДЕ НЕМУРС ЕНД КОМПАНІ, Chestnut Run Plaza, 974 Centre Road, P.O. Box 2915, Wilmington, DE 19805, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Олішевич Людмила Анатоліївна, реєстр. №194</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2015/069708 A1, 14.05.2015 WO 2014/117118 A1, 31.07.2014 Nguyen Thi Loc ET AL: "BIOCONTROL POTENTIAL OF <i>Metarhizium anisopliae</i> AND <i>Beauveria bassiana</i> AGAINST DIAMONDBACK MOTH, <i>Plutella xylostella</i>". <i>Omonrice OMONRICE</i>, 01.01.2007, pages 86-93 US 2013/156740 A1, 20.06.2013 WO 03/038065 A1, 08.05.2003 EP 2 078 746 A1, 15.07.2009 Gisbert Zimmermann: "The Entomopathogenic Fungus <i>Metarhizium anisopliae</i> and its Potential as a Biocontrol Agent Pestic. Sei, 1 January 1993 (1993- 01-01), pages 375-379 US 7790151 B1, 07.09.2010 Manisegaran ET AL: "Field Evaluation of <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin against <i>Holotrichia serrata</i> (Blanch) in sugarcane". <i>Journal of Biopesticides</i>, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 190-193 Patricia Vieira Tiago ET AL: "Biological insect control using <i>Metarhizium anisopliae</i>: morphological, molecular, and ecological aspects", <i>Ciencia Rural</i>, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 645-651</p>
--	---

UA 124380 C2

(54) БІОЛОГІЧНИЙ ПРЕПАРАТ ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ЩОДО РОСЛИН

(57) Реферат:

Винахід стосується штаму ентомопатогенного гриба, композиції та способу застосування штаму для зниження загального пошкодження комахами.

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ДАНИЙ ВИНАХІД

Штами ентомопатогенних грибів, композиції на основі ентомопатогенних грибів і способи застосування штамів і композицій для зниження загального пошкодження комахами.

ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

5 Існувала давно відчутна потреба у безпечних з погляду екології композиціях і способах для контролю або знищення комах-шкідників сільськогосподарського значення, тобто способах, які є вибірковими, екологічно інертними, нестійкими та біологічно розкладними, і які підходять до схем контролю комах-шкідників.

КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

10 Один варіант здійснення даного винаходу стосується композиції, що містить штам ентомопатогенного гриба, вибраного з *Metarhizium robertsii* і *Metarhizium anisopliae*. У певних варіантах здійснення грибковий ентомопатоген передбачає спору, мікросклероцій або конідію. У деяких варіантах здійснення грибковий ентомопатоген характеризується інсектицидною активністю.

15 В одному варіанті здійснення даний винахід стосується композиції для підвищення стійкості рослини до шкідника, патогену або комахи або для поліпшення здоров'я та/або урожайності рослин, що містить один або декілька штамів ентомопатогенних грибів, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073), *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075), *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074) або будь-якої їх комбінації. В іншому
20 варіанті здійснення даний винахід стосується композиції, що містить прийнятний з погляду сільського господарства носій і грибковий ентомопатоген, вибраний із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 або будь-якої їх комбінації. У додатковому варіанті здійснення грибковий ентомопатоген передбачає спору, конідію або мікросклероцій. В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується
25 композиції, що містить один або декілька штамів ентомопатогенних грибів, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073), *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075), *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074), мутантів цих штамів, метаболіту або комбінації метаболітів, що продукуються штамом, розкритим у даному документі, які характеризуються інсектицидною активністю щодо шкідника, патогену або комахи, або будь-якої
30 їх комбінації.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується композиції, що містить щонайменше два штами ентомопатогенних грибів, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 або
35 будь-якої їх комбінації, в ефективній кількості для досягнення ефекту пригнічення росту патогену, шкідника або комахи. В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерій, грибів, дріжджів, найпростіших, вірусів, ентомопатогенних нематод, рослинних екстрактів, білків, вторинних метаболітів та інокулянтів.

В іншому варіанті здійснення композиція містить грибковий ентомопатоген і одну або
40 декілька агрохімічно активних сполук, вибраних із групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду та нематоциду. В одному варіанті здійснення фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебукназолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану. В іншому варіанті здійснення композиція містить грибковий ентомопатоген, де
45 грибковий ентомопатоген є стійким до фунгіциду. В іншому варіанті здійснення композиція містить грибковий ентомопатоген, де грибковий ентомопатоген зберігає інсектицидну активність у присутності фунгіциду. У ще одному варіанті здійснення композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, ізофлавонону та модулятора ріанодинового рецептора.

В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, додатково містить
50 щонайменше одну насінину, рослину або частину рослини. У одному варіанті здійснення насінина, рослина або частина рослини є генетично модифікованими або трансгенними насіниною, рослиною або частиною рослини. У додатковому варіанті здійснення генетично модифіковані або трансгенні насінина, рослина або частина рослини містить інсектицидну
55 ознаку, одержану від рослини, бактерії, бактерії, відмінної від *Bt*, археї, комахи або тварини. У деяких варіантах здійснення інсектицидна ознака передбачає інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих. У деяких варіантах здійснення інсектицидна ознака може включати ознаку *Bt*, ознаку, відмінну від ознаки *Bt*, та/або ознаку для RNAi. У деяких варіантах здійснення композиції, розкриті в даному документі, застосовують у вигляді покриття насінини, внесення в
60 борозну або позакореневого внесення.

В одному варіанті здійснення розкрита композиція забезпечує контроль одного або декількох з патогенів, шкідників або комах рослин або пригнічує ріст одного або декількох з патогенів, шкідників або комах рослин, зокрема без обмеження бактерії, гриба, вірусу, найпростішого, нематоди або членистоногого. У одному варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, забезпечує контроль росту комах ряду твердокрилих, напівтвердокрилих або лускокрилих, або пригнічує його. У ще одному варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, забезпечує контроль росту *Diabrotica virgifera virgifera* або пригнічує його.

В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, присутня в ефективній кількості для забезпечення пестицидної активності щодо бактерій, рослин, рослинних клітин, тканин і насіння. В іншому варіанті здійснення композиція присутня в ефективній кількості для забезпечення пестицидної активності щодо комах ряду твердокрилих і лускокрилих. У ще одному варіанті здійснення композиція присутня в ефективній кількості для забезпечення пестицидної активності щодо *Diabrotica virgifera virgifera*.

В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, присутня в ефективній кількості для поліпшення характеристик рослини, зокрема без обмеження підсиленого утворення коренів, підвищеної маси коренів, поліпшеного функціонування коренів, збільшеної висоти пагонів, поліпшеного функціонування пагонів, збільшеної кількості присутніх квіткових бруньок, підсиленого утворення квіткових бруньок, підсиленого проростання насіння, підвищеної урожайності, підвищеної загальної вологості ваги рослини й підвищеної загальної сухої ваги рослини.

В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу, що передбачає застосування композиції, що містить один або декілька штамів ентомопатогенних грибів, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 або будь-якої їх комбінації.

В іншому варіанті здійснення даний винахід стосується способу, що передбачає застосування композиції, що містить один або декілька штамів ентомопатогенних грибів, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 або будь-якої їх комбінації, щодо насінини, рослини, частини рослини або ґрунту в ефективній кількості для досягнення ефекту, вибраного з групи, яка складається з пригнічення патогену рослини, шкідника або комах або попередження пошкодження рослини патогеном, шкідником або комахою, поліпшення характеристик рослини, підвищення врожайності рослини, підвищення сили рослини, підвищення доступності фосфатів, підвищення продукування рослинного гормону, підсилення утворення коренів, збільшення висоти пагонів у рослини, збільшення довжини листя у рослини, підсилення утворення квіткових бруньок у рослини, підвищення загальної сирої ваги рослини, підвищення загальної сухої ваги рослини та підсилення проростання насіння.

У ще одному варіанті здійснення даний винахід стосується способу, що передбачає застосування композиції, що містить щонайменше два штами ентомопатогенних грибів, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 або будь-якої їх комбінації, щодо насінини, рослини, частини рослини або ґрунту в ефективній кількості для досягнення ефекту, вибраного з групи, яка складається з пригнічення патогену рослини, шкідника або комах, попередження пошкодження рослини патогеном, шкідником або комахою, поліпшення характеристик рослини, підвищення врожайності рослини, підвищення сили рослини, підвищення доступності фосфатів, підвищення продукування рослинного гормону, підсилення утворення коренів, збільшення висоти пагонів у рослини, збільшення довжини листя у рослини, підсилення утворення квіткових бруньок у рослини, підвищення загальної сирої ваги рослини, підвищення загальної сухої ваги рослини та підсилення проростання насінини.

В іншому варіанті здійснення способи, розкриті в даному документі, додатково передбачають застосування композиції, що додатково містить засіб біологічного контролю, де засіб біологічного контролю вибраний із групи, яка складається з бактерій, грибів, дріжджів, найпростіших, вірусів, ентомопатогенних нематод, рослинних екстрактів, білків, вторинних метаболітів і інокулянтів.

У ще одному варіанті здійснення способи, розкриті в даному документі, додатково передбачають застосування композиції, що додатково містить щонайменше два штами, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 та їх комбінацій.

У ще одному варіанті здійснення способи, розкриті в даному документі, додатково передбачають застосування композиції, що містить одну або декілька агрохімічно активних

сполук, вибраних із групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду й нематоциду. В одному варіанті здійснення фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіконазолу, іпконазолу, пенфлуфену, седаксану. В іншому варіанті здійснення композиція містить грибовий ентомопатоген, де грибовий ентомопатоген є стійким до фунгіциду. В іншому варіанті здійснення композиція містить грибовий ентомопатоген, де грибовий ентомопатоген зберігає інсектицидну активність у присутності фунгіциду.

У ще одному варіанті здійснення способи, розкриті в даному документі, додатково передбачають застосування композиції, що додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, ізофлавонолу й модулятора ріанодинового рецептора.

В іншому варіанті здійснення способи, розкриті в даному документі, додатково передбачають застосування композиції в ефективній кількості для пригнічення росту патогену рослини, зокрема без обмеження бактерії, гриба, нематоїди, комахи, вірусу або найпростішого.

В іншому варіанті здійснення способи, розкриті в даному документі, додатково передбачають застосування композиції в ефективній кількості для забезпечення пестицидної активності щодо бактерій, рослин, рослинних клітин, тканин і насіння. В іншому варіанті здійснення композиція присутня в ефективній кількості для забезпечення пестицидної активності щодо комах ряду твердокрилих, напівтвердокрилих і лускокрилих. У ще одному варіанті здійснення композиція присутня в ефективній кількості для забезпечення пестицидної активності щодо *Diabrotica virgifera virgifera*.

У ще одному варіанті здійснення способи, розкриті в даному документі, стосуються підвищення стійкості інсектицидної ознаки щодо ряду твердокрилих у генетично модифікованих або трансгенних насінини, частини рослини або рослини до патогену, шкідника або комахи, що передбачають інокуляцію генетично модифікованих або трансгенних насінини, частини рослини або рослини композицією, що містить грибовий ентомопатоген, вибраний із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 і *Metarhizium anisopliae* 3213-1, де генетично модифіковані або трансгенні насінини, частина рослини або рослина містить інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих.

ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фігура 1. Результати польового дослідження CRWNIS рідинного або послідовного застосування складів на основі штамів 15013-1, 23013-3 і 3213-1 за тиску комах.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Варіанти здійснення даного винаходу не обмежені розкритими ілюстративними способами і матеріалами, і будь-які способи та матеріали, аналогічні або еквівалентні описаним, можна застосовувати при практичному здійсненні або випробуванні варіантів здійснення даного винаходу. Числові діапазони включають числа, що визначають діапазон.

Представлені заголовки не є обмеженнями різних аспектів або варіантів здійснення даного винаходу, які можуть бути за допомогою посилання на даний опис.

Інші визначення термінів можуть з'являтися по всьому опису. Необхідно розуміти, що варіанти здійснення даного винаходу не обмежені описаними певними варіантами здійснення, і додаткові варіанти здійснення можуть змінюватися. Також необхідно розуміти, що використовується термінологія призначена лише для опису варіантів здійснення і не передбачає обмежувальний характер, оскільки обсяг варіантів здійснення даного винаходу буде обмежуватися лише формулою винаходу, що додається, і її еквівалентами.

Форма однини використовується для позначення одного або декількох (тобто щонайменше одного) граматичних об'єктів даної заявки. Наприклад, "елемент" означає один або декілька елементів.

Використовуваний у даному документі термін "вводити" стосується дії з введення штаму та/або композиції в навколишнє середовище для пригнічення патогену, шкідника або комахи або для поліпшення характеристик рослини.

Використовуваний у даному документі термін "агрохімічно активні сполуки" стосується будь-якої речовини, яка застосовується або може традиційно застосовуватися для лікування рослин, зокрема без обмеження фунгіцидів, бактерицидів, інсектицидів, акарицидів, нематоцидів, моллюскоцидів, антидотів, регуляторів росту рослин і поживних речовин для рослин, а також мікроорганізмів. Композиції, розкриті у даному документі, можуть містити фунгіциди, які можуть включати без обмеження інгібітори дихання, такі як азоксистробін, які цілеспрямовано впливають на комплекс III мітохондріального електронного транспорту; інгібітори тубулінів, такі як тіабендазол, які зв'язуються з бета-тубуліном; інгібітор зв'язаної з осмотичним стресом кінази флудіоксоніл; інгібітор РНК-полімерази ооміцетів, групи грибоподібних організмів, такий як

металаксил; інгібітори біосинтезу стеролу, які включають інгібітори C-14 деметилази шляху біосинтезу стеролу (зазвичай називані інгібіторами деметилази або DMI), такі як тебуконазол, протіокназол та іпконазол; інгібітор дихання, який цілеспрямовано впливає на комплекс II мітохондріального електронного транспорту, такий як пенфлуфен; інгібітор дихання, який

5 цілеспрямовано впливає на комплекс II мітохондріального електронного транспорту, такий як седаксан. Інші класи фунгіцидів з різними або аналогічними механізмами дії можна знайти за адресою frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2 (доступ до якого можна одержати у всесвітній мережі за допомогою префіксу "www"; див. Hirooka and Ishii (2013), *Journal of General Plant Pathology*). Фунгіцид може містити всі або будь-

10 яку комбінацію з різних класів фунгіцидів, описаних у даному документі. У певних варіантах здійснення композиція, розкрита в даному документі, містить азоксистробін, тіабендазол, флудіоксоніл і металаксил. В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, містить тебуконазол. В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, містить протіокназол, металаксил і пенфлуфен. В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, містить іпконазол і металаксил. В іншому варіанті здійснення композиція, розкрита в даному документі, містить седаксан. Як використовується в даному документі, композиція може являти собою рідину, гетерогенну суміш, гомогенну суміш, порошок, розчин, дисперсію або будь-яку їх комбінацію.

Використовуваний у даному документі термін "ефективна кількість" стосується кількості штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, достатньої для пригнічення росту патогенного мікроорганізму або для сповільнення швидкості росту патогенного мікроорганізму. В іншому варіанті здійснення термін "ефективна кількість" стосується кількості штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, достатньої для поліпшення характеристик рослини. В іншому варіанті здійснення термін "ефективна кількість" стосується кількості штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, достатньої для контролю, знищення, пригнічення або зменшення числа, ступеню появи або росту патогену, шкідника або комахи. В іншому варіанті здійснення термін "ефективна кількість" стосується кількості штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, достатньої для запобігання пошкодження з боку патогену, шкідника або комахи. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що ефективна кількість штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба може не знижувати число патогенів, шкідників або комах, однак є ефективною у зниженні ступеня пошкодження рослин та/або частин рослин в результаті дії патогену, шкідника або комахи. Наприклад, пестицидно ефективна кількість може знижувати

20 25 30 35

ступень появи патогенів, шкідників або комах або пошкодження насіння, коренів, пагонів або листя рослин, які оброблені, порівняно з необробленими.

Використовуваний у даному документі термін "штам ентомопатогенного гриба" або "композиція на основі ентомопатогенного гриба" включає без обмеження конідіоспори, спори, міцелій, мікросклероцій та/або будь-яку іншу стадію життєвого циклу грибкового ентомопатогену.

40

Використовуваний у даному документі термін "пригнічувати" стосується порушення, запобігання, ослаблення, протидії, контролю, зниження, уповільнення або іншої перешкоди росту й виживанню патогену, шкідника або комахи порівняно з ростом або виживанням патогену, шкідника або комахи в необробленому контролі. Будь-які з термінів пригнічувати, порушувати, запобігати, контролювати, знижувати, уповільнювати, перешкоджати, протидіяти або ослаблювати можна використовувати взаємозамінно. В одному варіанті здійснення термін "пригнічувати" означає порушувати, запобігати, контролювати, ослаблювати, протидіяти, знижувати, уповільнювати або іншим чином перешкоджати росту, появи або виживанню патогену, шкідника або комахи на щонайменше від приблизно 3% до щонайменше приблизно

45 50 55

100% або будь-яке значення між ними, наприклад на щонайменше приблизно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% або 100%, порівняно з ростом або виживанням патогену, шкідника або комахи в необробленому контролі. Величину пригнічення можна виміряти як описано в даному документі або за допомогою інших способів, відомих з рівня техніки. Використовуваний у даному документі вираз "захищає рослину від патогену, шкідника або комахи-шкідника" призначений для позначення обмеження або усунення патогену, шкідника або комахи, пов'язаних з пошкодженням рослини та/або частини рослини, наприклад, за допомогою пригнічення здатності патогену, шкідника або комахи рости, з'являтися, харчуватися та/або розмножуватися або за допомогою знищення патогену, шкідника або комахи. Використовуваний у даному документі термін пестицидна та/або

інсектицидна активність стосується активності сполуки, композиції та/або способу, який захищає рослину та/або частину рослини від патогену, шкідника або комахи.

В одному варіанті здійснення даного винаходу пригнічення патогену, шкідника або комахи триває або забезпечує захист протягом більше одного дня, двох днів, трьох днів, чотирьох днів, п'яти днів, шести днів, тижня, двох тижнів, трьох тижнів, місяця або довше після застосування штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, розкритих у даному документі, щодо предметного матеріалу. В іншому варіанті здійснення пригнічення патогену, шкідника або комахи триває від одного до семи днів, від семи до 14 днів, від 14 до 21 дня або від 21 до 30 днів або довше. В іншому варіанті здійснення пригнічення росту патогену, шкідника або комахи триває або забезпечує захист протягом часу, більш тривалого ніж час від застосування до появи дорослих форм патогену, шкідника або комахи.

Використовуваний у даному документі термін "генетично модифікований" призначений для позначення будь-якого виду, що містить генетичні ознаки, локуси або послідовність, які не зустрічаються у виду або штаму перед маніпуляцією. Генетично модифікована рослина може бути трансгенною, цис-генною, з геномним редагуванням або схрещеною з метою одержання нових генетичних ознаки, локусів або послідовності. Генетично модифіковану рослину можна одержувати за допомогою способів, відомих фахівцям у даній галузі, таких як трансформація за допомогою бомардування, за допомогою систем Cas/CRISPR або TALENS або за допомогою методик схрещування. Використовуваний у даному документі термін "ознака" являє собою нові або модифіковані локус або послідовність генетично модифікованої рослини, зокрема без обмеження трансгенної рослини. Ознака може додавати генетично модифікованій рослині гербіцидну стійкість або стійкість до комах. Використовуваний у даному документі термін "трансгенні" рослина, частина рослини або насінина стосується рослини, частини рослини або насінини, які містять щонайменше один гетерологічний ген, який забезпечує експресію полінуклеотиду або поліпептиду, що не зустрічаються в рослині в природі.

Використовуваний у даному документі термін "середовище, яке оточує рослину або частину рослини" призначений для позначення простору, який оточує рослину або частину рослини, зокрема без обмеження ґрунту, повітря або борозни. Середовище, яке оточує рослину або частину рослини, може знаходитися в безпосередній близькості, у контакт з, поряд або на тій же ділянці, що і рослина або частина рослини. Композиції, описані в даному документі, можна застосовувати щодо середовища, яке оточує рослину або частину рослини, як обробки насінини, як позакореневого внесення, як внесення за допомогою гранул, як ґрунтового внесення або як внесення інкапсульованого препарату. Використовуваний у даному документі термін "в борозні" призначений для позначення простору в межах ділянки, де посаджено насінину, або поряд з нею. Композиції, розкриті в даному документі, можна застосовувати щодо борозни одночасно або послідовно з насіниною. В іншому варіанті здійснення композиції, розкриті в даному документі, можна застосовувати послідовно, або перед, або після саджання насінини.

Використовуваний у даному документі термін "інший механізм дії" стосується пестицидної композиції, яка забезпечує контроль патогену, шкідника або комахи через шлях або рецептор, які відрізняються від іншої пестицидної композиції. Використовуваний у даному документі термін "інший механізм дії" включає пестицидні ефекти однієї або декількох пестицидних композицій щодо інших ділянок зв'язування (тобто інших рецепторів токсинів та/або інших ділянок того ж самого рецептора токсину) в оболонках кишечника комах або через шлях РНК-інтерференції щодо інших цільових генів.

Використовуваний у даному документі термін "патоген, шкідник або комаха" включає без обмеження патогенні гриби, бактерії, кліщі, іксодові кліщі, патогенні мікроорганізми й нематоди, а також комаху з рядів *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* та інших, зокрема без обмеження *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Diabrotica speciosa* і *Diabrotica barberi*.

Варіанти здійснення даного винаходу придатні при пригніченні личинок або дорослих особин ряду *Coleoptera* з родин *Anthribidae*, *Bruchidae* і *Curculionidae* (зокрема без обмеження *Anthonomus grandis* Boheman (довгоносик бавовниковий); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (довгоносик рисовий водяний); *Sitophilus granarius* Linnaeus (довгоносик амбарний); *S. oryzae* Linnaeus (довгоносик рисовий); *Hypera punctata* Fabricius (довгоносик точковий); *Cylindrocopturus adspersus* LeConte (довгоносик соняшниковий стебловий); *Smicronyx fulvus* LeConte (червоний довгоносик соняшнику); *S. sordidus* LeConte (сірий довгоносик соняшнику); *Sphenophorus maidis* Chittenden (довгоносик маїсовий)); земляні блішки, блішки, кореневі черви, листоїди, картопляні жуки та листові мінери родини *Chrysomelidae* (зокрема без обмеження: *Leptinotarsa*

decemlineata Say (колорадський жук); *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (західний кукурудзяний жук); *D. barberi* Smith and Lawrence (північний кукурудзяний жук); *D. undecimpunctata howardi* Barber (південний кукурудзяний жук); *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer (земляна кукурудзяна блішка); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (блішка хрестоцвіта); *Phyllotreta striolata* (смугаста блішка);
 5 *Colaspis brunnea* Fabricius (листоїд виноградний); *Oulema melanopus* Linnaeus (п'явиця червоногруда); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (соняшниковий листоїд)); жуки родини Coccinellidae (зокрема без обмеження: *Epilachna varivestis* Mulsant (мексиканська квасолева корівка)); хрущі та інші жуки з родини Scarabaeidae (зокрема без обмеження: *Popillia japonica* Newman (хрущик японський); *Cyclocephala borealis* Arrow (дупляк північний, хрущ); *C. immaculata*
 10 Olivier (дупляк південний, хрущ); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (хрущ звичайний); *Phyllophaga crinita* Burmeister (хрущ); *Ligyris gibbosus* De Geer (жук морквяний)); шкіроїди з родини Dermestidae; дротяники з родини Elateridae, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp.; *Conoderus* spp.; *Limonium* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; короїди з родини Scolytidae та жуки з родини Tenebrionidae.

15 Способи вимірювання пестицидної активності добре відомі з рівня техніки. Див., наприклад, Czapla and Lang, (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews, et al., (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone, et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 і патент США № 5743477, всі з яких включені в даний документ за допомогою посилання в повному обсязі. Зазвичай пестицид змішують і застосовують в аналізах із годуванням. Див., наприклад, Marrone,
 20 et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такі аналізи можуть включати приведення рослин у контакт з одним або декількома шкідниками й визначення здатності рослини вижити та/або спричинювати загибель шкідників.

Використовуваний у даному документі термін "рослина" стосується всіх рослин, частин рослин або популяцій рослин, таких як бажані й небажані дикорослі рослини, культивари,
 25 трансгенні рослини й сорти рослин (захищені або не захищені правами на сорт рослин або правами рослинників). Культивари й сорти рослин можуть являти собою рослини, одержані за допомогою стандартних способів розмноження й селекції, які можуть проходити з використанням одного або декількох біотехнологічних способів, або можуть бути доповнені такими, наприклад із застосуванням подвійних гаплоїдів, злиття протопластів, випадкового й
 30 спрямованого мутагенезу, молекулярних або генетичних маркерів або за допомогою способів біоінженерії та генетичної інженерії.

Варіанти здійснення даного винаходу можна загалом застосовувати для будь-яких видів рослин, зокрема без обмеження однодольних і дводольних. Приклади рослин, що становлять
 35 інтерес, включають без обмеження кукурудзу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (наприклад, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), зокрема види *Brassica*, придатні як джерела олії з насіння рослин, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (наприклад, африканське просо (*Pennisetum glaucum*), просо культурне (*Panicum miliaceum*), мишій італійський (*Setaria italica*), просо пальчасте (*Eleusine coracana*)), соняшник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницю (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), тютюн (*Nicotiana tabacum*), картоплю (*Solanum tuberosum*), різновиди арахісу (*Arachis hypogaea*), бавовник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), солодку картоплю (*Ipomoea batatas*), маніок (*Manihot esculenta*), кавове дерево (*Coffea* spp.), кокосову пальму (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусові дерева (*Citrus* spp.), шоколадне дерево (*Theobroma cacao*), чайний кущ (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), інжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), маслину (*Olea europaea*), папаю (*Carica papaya*), кеш'ю (*Anacardium occidentale*), макадамію (*Macadamia integrifolia*), мигдаль (*Prunus amygdalus*), різновиди цукрового буряку (*Beta vulgaris*), цукрову тростину (*Saccharum* spp.), різновиди вівса, ячмінь, овочі, декоративні рослини та хвойні
 40 дерева.

Використовуваний у даному документі термін "частини рослини" стосується всіх наземних і
 50 підземних частин і органів рослин, таких як пагін, лист, квітка й корінь, тим самим, включені, наприклад, листя, голки, стовбури, гілки, квітки, плодові тіла, плоди й насіння, а також корені, коренеплоди, цибулини й кореневища. Сільськогосподарські культури та матеріал для вегетативного і генеративного розмноження, наприклад живці, цибулини, кореневища,
 55 коренеплоди, пагони й насіння, також є частинами рослини.

Використовуваний у даному документі термін "спора" включає без обмеження конідіоспори, спори, міцелій, мікросклероцій та/або будь-яку іншу стадію життєвого циклу грибового ентомопатогену. "Повітряна конідіоспора" (AC) стосується конідіоспор, утворених в результаті вегетативного циклу розвитку на поверхні середовища з агаром або іншого твердого субстрату

відповідного складу. Використовуваний у даному документі термін "занурені спори" стосується занурених конідіоспор та/або бластоспор, які розвиваються в рідкій культурі.

5 Використовуваний у даному документі термін "життєздатний" стосується клітини мікроорганізму, пропагули або спори, які є метаболічно активними та здатними до диференціювання. Таким чином, пропагули, такі як спори, є "життєздатними", коли вони знаходяться у стані спокою та здатні до проростання.

10 Біологічний контроль комах-шкідників, що мають сільськогосподарське значення, із застосуванням мікробного агента, такого як гриби, бактерії або інші види комах, являє собою безпечну з погляду екології та привабливою з комерційного погляду альтернативу синтетичним хімічним пестицидам. Загалом можна сказати, що застосування біопестицидів викликає менший ризик забруднення й несприятливих впливів на навколишнє середовище, та біопестициди забезпечують більшу специфічність щодо мішені порівняно зі специфічністю, характерною для традиційних хімічних інсектицидів широкого спектра дії. Крім того, найчастіше виробництво біопестицидів коштує дешевше, та внаслідок цього поліпшується економічно ефективний вихід продукції для широкого спектра сільськогосподарських культур.

15 Відомо, що певні види мікроорганізмів роду *Bacillus* мають пестицидну активність щодо ряду комах-шкідників, зокрема *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* та інших. *Bacillus thuringiensis* (Bt) та *Bacillus popilliae* належать до найбільш успішних засобів біологічного контролю, виявлених на сьогодні. Патогенність щодо комах також приписували штамам *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* та *B. cereus*. Мікробні інсектициди, зокрема одержані зі штамів *Bacillus*, відіграли важливу роль у сільському господарстві як альтернативи хімічному контролю шкідників.

20 Були розроблені культурні рослини з підвищеною стійкістю до комах за допомогою генної інженерії культурних рослин для продукування пестицидних білків, що походять з *Bacillus*. Наприклад, за допомогою генної інженерії були створені рослини кукурудзи й бавовнику з метою продукування пестицидних білків, виділених зі штамів *Bt* (в даному документі називаних як "ознака Bt") та/або розроблених на основі таких. Ці генетично модифіковані сільськогосподарські культури на сьогодні широко застосовуються в сільському господарстві й забезпечують фермера безпечною з погляду екології альтернативою традиційним способам контролю комах. Незважаючи на те, що вони були визнані дуже успішними з комерційного погляду, ці генетично модифіковані стійкі до комах культурні рослини забезпечують стійкість лише до вузького діапазону економічно важливих комах-шкідників. У деяких випадках комахи можуть розвивати стійкість до різних інсектицидних сполук, що підвищує необхідність в ідентифікації альтернативних засобів біологічного контролю для контролю шкідників.

35 Варіанти здійснення даного винаходу стосуються штамів ентомопатогенних грибів, композицій на основі ентомопатогенних грибів і способів застосування штамів і композицій. В одному варіанті здійснення ентомопатогенні штамів мають інсектицидну активність і можуть знаходити застосування при пригніченні, контролі або знищенні патогену, шкідника або комахи, зокрема без обмеження грибів, патогенних грибів, бактерій, кліщів, іксодових кліщів, патогенних мікроорганізмів і нематод, а також комах з рядів *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* тощо, зокрема *Coleoptera*, зокрема без обмеження *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica undecimpunctata howardi* і *Diabrotica barberi*, і в одержанні композицій з пестицидною активністю.

45 В одному варіанті здійснення штам(штами) ентомопатогенних грибів вибраний(вибрані) з групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 та їх комбінацій.

50 *Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073) був депонований 18 червня 2015 р. в колекцію культур Служби сільськогосподарських досліджень (NRRL), 1815 North University Street, Пеорія, Іллінойс, 61604, і йому був наданий номер доступу NRRL 67073. Депонування були виконані згідно з положеннями Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури.

55 *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075) був депонований 18 червня 2015 р. в колекцію культур Служби сільськогосподарських досліджень (NRRL), 1815 North University Street, Пеорія, Іллінойс, 61604, і йому був наданий номер доступу NRRL 67075. Депонування були виконані згідно з положеннями Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури.

60 *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074) був депонований 18 червня 2015 р. в колекцію культур Служби сільськогосподарських досліджень (NRRL), 1815 North University Street, Пеорія, Іллінойс, 61604, і йому був наданий номер доступу NRRL 67074. Депонування були виконані

згідно з положеннями Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури.

В одному варіанті здійснення розкритий спосіб одержання продукту на основі грибового ентомопатогену за ферментації в рідкому середовищі. В одному варіанті здійснення спосіб передбачає спочатку одержання повітряних конідіоспор грибового ентомопатогену на середовищі з агаром, після чого інокулювання повітряних конідіоспор в рідке середовище з одержанням продукту на основі грибового ентомопатогену. В іншому варіанті здійснення спосіб передбачає спочатку одержання повітряних конідіоспор грибового ентомопатогену на твердому субстраті, зокрема без обмеження на середовищах з агаром або інших твердих середовищах відповідного складу, після чого інокулювання повітряних конідіоспор в рідке середовище з одержанням культури грибового ентомопатогену для сіяння, після чого інокулювання культури грибового ентомопатогену для сіяння в рідке середовище з одержанням продукту на основі грибового ентомопатогену. В іншому варіанті здійснення перша культура грибового ентомопатогену для сіяння може бути використана для одержання другої культури грибового ентомопатогену для сіяння, де друга культура для сіяння використовується для інокуляції в рідке середовище з одержанням продукту на основі грибового ентомопатогену. Рідке середовище, використовуване для одержання продукту на основі грибового ентомопатогену, може містити мінерали, вітаміни, джерело вуглецю та комплексне джерело азоту. В іншому варіанті здійснення джерело азоту являє собою комплексне джерело, яке містить вуглець, але не є джерелом вуглецю. В одному варіанті здійснення розкритий спосіб одержання продукту на основі грибового ентомопатогену, що містить спору, вегетативний міцелій, занурену спору та/або мікросклероцій. В одному варіанті здійснення композиція містить продукт ферментації грибового ентомопатогену, одержаний в результаті ферментації в рідкому середовищі. Продукт ферментації може бути висушений за допомогою вакууму, висушений розпилюванням або висушений в псевдозрідженому шарі для застосування з метою контролю рослинних патогенів, шкідників або комах.

В одному варіанті здійснення розкритий спосіб одержання продукту на основі грибового ентомопатогену за ферментації в рідкому середовищі, де ферментація в рідкому середовищі передбачає рідке середовище, що містить мінерали, вітаміни, джерело вуглецю та джерело азоту. В одному варіанті здійснення розкритий спосіб одержання грибового ентомопатогену в рідкій культурі із застосуванням джерела вуглецю та джерела азоту. В іншому варіанті здійснення розкритий спосіб одержання грибового ентомопатогену в рідкій культурі із застосуванням двох джерел вуглецю та джерела азоту. В іншому варіанті здійснення розкритий спосіб одержання грибового ентомопатогену в рідкій культурі із застосуванням двох або більше джерел вуглецю та джерела азоту. В одному варіанті здійснення джерелом вуглецю є глюкоза. В іншому варіанті здійснення джерело вуглецю передбачає молекули фруктози, галактози, сорбіту, сорбози, сахарози, арабінози, мальтодекстрину, рибози або ксилози та їх комбінації. В іншому варіанті здійснення перше джерело вуглецю присутнє в граничній концентрації. В додатковому варіанті здійснення друге джерело вуглецю створює неоптимальну або стресову умову, яка змінює фізіологічний стан грибового ентомопатогену. В іншому варіанті здійснення розкритий спосіб одержання грибового ентомопатогену в рідкій культурі із застосуванням джерела вуглецю, першого джерела азоту й другого джерела азоту, де перше джерело азоту присутнє в граничній концентрації.

В іншому варіанті здійснення розкритий спосіб одержання грибового ентомопатогену в рідкій культурі із застосуванням джерела вуглецю та джерела азоту та контролю параметра ферментації, де контроль параметра ферментації створює неоптимальну або стресову умову, яка змінює фізіологічний стан грибового ентомопатогену. В одному варіанті здійснення параметр ферментації може включати в себе рівень рН, швидкість утворення діоксиду вуглецю, відсоток розчиненого кисню, профіль перемішування, швидкість подання цукру або будь-який інший вимірюваний параметр ферментації грибового ентомопатогену, який може створювати неоптимальну або стресову умову, що приводить в результаті до зміни фізіологічного стану грибового ентомопатогену. Фізіологічні зміни (перемикання на вегетативний цикл) можуть відбуватися в результаті забезпечення стресу або неоптимальних умов щодо грибового ентомопатогену. (Див. Steyaert et al. (2010), *Microbiol.* і Gao et al. (2007) *Mycol. Res.*). В іншому варіанті здійснення розкритий спосіб одержання грибового ентомопатогену в рідкій культурі із застосуванням щонайменше двох джерел вуглецю та джерела азоту та контролю параметра ферментації, де контроль параметра ферментації створює неоптимальну або стресову умову, яка приводить до зміни фізіологічного стану грибового ентомопатогену. В одному варіанті здійснення одержання повітряних конідіоспор грибового ентомопатогену передбачає спочатку

одержання повітряних конідіоспор грибового ентомопатогену на середовищі з агаром або твердофазному середовищі (Dorta and Arcas (1998), *Enzyme Microb. Technol.*).

В одному варіанті здійснення спосіб одержання продукту на основі грибового ентомопатогену передбачає одержання повітряних конідіоспор (АС), застосовуваних як інокулят для рідких культур або ферментацій в рідкому середовищі. Такі способи передбачають без обмеження одержання АС в результаті інокуляції штаму грибового ентомопатогену на великих планшетах з картопляним агаром з декстрозою (PDA) або планшетах з VM та інкубування при 28°C протягом приблизно 2-3 тижнів; наповнення планшетів розчином 0,05% Tween 80 і суспендування АС в розчині шляхом обережного зіскоблювання поверхні культури на планшеті. В одному варіанті здійснення суспензії АС можна фільтрувати та АС об'єднують до високої концентрації. В додатковому варіанті здійснення концентрацію АС можна визначати за допомогою гемоцитометра, при цьому АС центрифугують і осад з АС ресуспендують із застосуванням розчину 15% гліцерину в 0,05% Tween 80. В іншому варіанті здійснення повітряні конідіоспори також можна одержувати за допомогою твердофазної ферментації (Dorta and Arcas (1998), *Enzyme Microb. Technol.*).

В одному варіанті здійснення одержання продукту на основі грибового ентомопатогену в рідкій культурі може передбачати об'єми середовищ, що становлять 50 мл за об'єму ферментації в струшуваній колбі, від 1 л до 2 л за об'єму ферментації в настільному режимі і 10 л за об'єму ферментації у біореакторі або об'єм для ферментації до 600000 л. Середовища для культур для сіяння або культур для продукування можуть містити компоненти, представлені в таблицях 1, 2 і 3. За об'єму в струшуваній колбі середовища можна інокулювати безпосередньо повітряними конідіоспорами (АС) в кінцевій концентрації, що становить приблизно 5×10^6 АС/мл. За об'єму в настільному режимі або біореакторі середовища можна інокулювати за допомогою культури для сіяння, що становить приблизно 40 мл або 400 мл культури для сіяння відповідно. Культуру для сіяння можна одержувати для утворення біомаси для культури для продукування. Культури для сіяння можна одержувати за допомогою додаткового інкубування культури приблизно від 1 до 7 днів при приблизно 28°C, і перемішування при приблизно від 100 до 300 об/хв. При додаванні інокуляту культури для продукування можна інкубувати приблизно від 4 до 7 днів при приблизно від 16°C до 32°C в орбітальному струшувачі при приблизно 300 об/хв за об'єму в струшуваній колбі; при перемішуванні приблизно від 500 до 1200 об/хв за об'єму в настільному режимі або за швидкостей перемішування, еквівалентних окружній швидкості мішалки в настільному режимі за об'єму в біореакторі. У певних варіантах здійснення під час ферментації можна додавати воду для зниження в'язкості бульйону. Тиск у ферментаційному чані можна встановлювати на рівні приблизно від 0,5 до 1 бар зайвого тиску. У певних варіантах здійснення 50% (вага/вага) розчину фруктози можна вводити після витрачання вихідного розчину глюкози й фруктози. У певних варіантах здійснення культура для сіяння або культура для продукування може не мати рН-контролю, може мати односторонній (з додаванням лише основи) рН-контроль або двосторонній (з додаванням основи й кислоти) рН-контроль. Під час ферментації та/або наприкінці ферментації можна реєструвати ряд параметрів, таких як без обмеження утворення мікросклероцію (MS), утворення занурених спор (SS), накопичення біомаси, яку виражають за допомогою грамів сухої маси клітин на кілограм бульйону (DCW), швидкість утворення вуглецю (CER), швидкість захоплення кисню (OUR), розчинений кисень (DO), концентрація амонію, рН, швидкість подання, вміст джерела вуглецю й перемішування.

45

Таблиця 1

Вітаміни, що присутні в усіх середовищах.

Вітаміни	Кінцева концентрація [мг/л]
Тіамін HCl (віт. B1)	0,5
Рибофлавін (віт. B2)	0,5
Пантотенат кальцію (віт. B5)	0,5
Нікотинова кислота (віт. B3)	0,5
Піридоксамін	0,5
Тіоктова кислота (ліпоєва кислота)	0,5
Фолієва кислота (віт. B9)	0,05
D-Біотин (віт. B7)	0,05
Кобаламін (віт. B12)	0,05

Таблиця 2

Основні солі, що присутні в усіх середовищах.

Основні солі	Кінцева концентрація [кількість/л]
KH_2PO_4	4 г
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,8 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6 г
0,1 M CoCl_2	1,555 мл
10 г/л $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,6 мл
10 г/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 мл

Таблиця 3

Джерела вуглецю та азоту в різних рідких середовищах.

Концентрації джерел вуглецю та азоту у різних середовищах [г/л]	Соя 10С:1N	Соя 10С:1N 25%Glu75%Fru	Соя 10С:1N 25%Glu75%Gal	Соя 10С:1N 25%Glu75% sorbitu	Соя 10С:1N 25%Glu75% сорбозин	Соя 10С:1N 25%Glu75%Suc	Соя 10С:1N 25%Glu75%Ara	Соя 10С:1N 25%Glu75%Mal	Соя 10С:1N 25%Glu75%Rib	Соя 10С:1N 25%Glu75%Xyl
Соева мука	45 г	45 г	45 г	45 г	45 г	45 г	45 г	45 г	45 г	45 г
D-Глюкоза	48,5 г	12,375 г	12,375 г	12,375 г	12,375 г	12,375 г	12,375 г	12,375 г	12,375 г	12,375 г
D-Фруктоза		37,125 г								
D-Галактоза			37,125 г							
D-Сорбіт				37,125 г						
L-Сорбоза					37,125 г					
Сахароза						37,125 г				
L-Арабіноза							37,125 г			
Мальтодекстрин								37,125 г		
D-Рибоза									37,125 г	
D-Ксилоза										37,125 г

*У деяких випадках соєву муку замінювали іншими джерелами азоту, такими як без обмеження бавовняна мука, дріжджовий екстракт або казамінові кислоти; у деяких випадках співвідношення вуглецю (С) і азоту (N) становило 30:1 або 50:1.

У певних варіантах здійснення добування та складання продукту на основі грибового ентомопатогену (*Metarhizium spp.*) з рідкої культури передбачає охолодження та збирання ферментативного бульйону. Ферментер можна ополіскувати приблизно 1х-2х об'ємами ферментативного бульйону, і розведений бульйон об'єднують з чистим бульйоном. Розведений матеріал на основі ентомопатогенного гриба у ферментативному бульйоні можна обробляти за допомогою DE Admix. Оброблений ферментативний бульйон можна фільтрувати через фільтр Бюхнера. Фільтраційний осад можна обробляти зараз же або можна зберігати в холодній кімнаті до обробки. Вологий фільтраційний осад можна розламати та висушити у вакуумній сушарці протягом приблизно від 48 год. до 5 днів. Висушений фільтраційний осад можна подрібнювати з одержанням кінцевого продукту на основі ентомопатогенного гриба у вигляді сухого порошку.

Один варіант здійснення стосується композиції, що містить штам ентомопатогенного гриба, вибраний з групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 і *Metarhizium anisopliae* 3213-1, або що складається з нього, або що складається головним чином з нього. В іншому варіанті здійснення композиція містить щонайменше два або більше штамів ентомопатогенних грибів, вибраних із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1, складається з них або складається головним чином з них. У додатковому варіанті здійснення композиція містить штам ентомопатогенних грибів, вибрані із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 і *Metarhizium anisopliae* 3213-1, або що складається з нього, або що складається головним чином з нього. В одному варіанті здійснення композиція являє собою біологічно чисту культуру *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 і *Metarhizium anisopliae* 3213-1 та їх комбінацій.

Один варіант здійснення даного винаходу стосується композиції, що містить штам ентомопатогенних грибів, розкриті в даному документі, і одну або декілька зі сполук або засобів, вибраних із групи, яка складається з агрохімічно активних сполук, засобів біологічного контролю, сполук на основі ліпохітоолігосахариду (LCO), ізофлавонів, хіназолінів, інсектицидних сполук, азолпіримідиніламінів, полімерних сполук, іонних сполук, заміщених тіофенів, заміщених дитіїнів, флуопіраму, сполук на основі енамінокарбонілу, сполук на основі стріголактону та сполук на основі дитіїно-тетракарбоксиміду та їх комбінацій.

Додатковий варіант здійснення стосується застосування першої композиції, що містить штам ентомопатогенних грибів, розкриті в даному документі, та другої композиції, яка містить одну або декілька зі сполук або засобів, вибраних із групи, яка складається з агрохімічно активних сполук, засобів біологічного контролю, сполук на основі ліпохітоолігосахариду (LCO), ізофлавонів, хіназолінів, інсектицидних сполук, азолпіримідиніламіну, полімерних сполук, іонних сполук, заміщених тіофенів, заміщених дитіїнів, флуопіраму, сполук на основі енамінокарбонілу, сполук на основі стріголактону і сполук на основі дитіїно-тетракарбоксиміду та їх комбінацій.

В одному варіанті здійснення даний винахід стосується композиції, що містить один або декілька штамів ентомопатогенних грибів, розкритих у даному документі, та один або декілька засобів біологічного контролю. Використовуваний у даному документі термін "засіб біологічного контролю" ("BCA") включає бактерії, гриби або дріжджі, найпростіші, віруси, ентомопатогенні нематоди й рослинні екстракти або продукти, що продукуються мікроорганізмами, зокрема білки або вторинні метаболіти, та інокулянти, які мають одну або обидві з наступних характеристик: (1) пригнічує або зменшує ступінь зараження рослини та/або ріст патогенів, шкідників або комах, зокрема без обмеження патогенних грибів, бактерій та нематод, а також членистоногих шкідників, таких як комахи, павукоподібні, губоногі, диплоподи, або пригнічує зараження рослини та/або ріст комбінації патогенів, шкідників або комах рослин; (2) поліпшує характеристики рослини; (3) підвищує врожайність рослини; (4) збільшує силу рослини і (5) поліпшує здоров'я рослини.

В одному варіанті здійснення даний винахід стосується композиції, що містить штам ентомопатогенного гриба, розкритий у даному документі, і агрохімічно активну сполуку. Агрохімічно активні сполуки являють собою речовини, які застосовують або можна застосовувати для обробки або застосування щодо насінини, рослини, частини рослини або середовища, яке оточує насінину, або рослину, або частину рослини, зокрема без обмеження фунгіциди, бактерициди, інсектициди, акарициди, нематоциди, молюскоциди, антидоти, регулятори росту рослин, поживні для рослин речовини, хімічні молекули з відомим механізмом дії, додаткові мікроорганізми й засоби біологічного контролю.

композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує рослину, з наступним застосуванням щодо частини рослини першої композиції. В іншому варіанті здійснення першу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує рослину, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує насінину, другої композиції. У ще одному варіанті здійснення другу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує рослину, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує насінину, першої композиції. В іншому варіанті здійснення першу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує рослину, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує частину рослини, другої композиції. У ще одному варіанті здійснення другу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує рослину, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує частину рослини, першої композиції.

В одному варіанті здійснення першу та другу композиції, розкриті в даному документі, можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, в один і той же час. В іншому варіанті здійснення першу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує частину рослини, другої композиції. У ще одному варіанті здійснення другу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує частину рослини, першої композиції. В іншому варіанті здійснення першу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо насінини другої композиції. У ще одному варіанті здійснення другу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо насінини першої композиції. В іншому варіанті здійснення першу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо рослини другої композиції. У ще одному варіанті здійснення другу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо рослини першої композиції. В іншому варіанті здійснення першу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує насінину, другої композиції. У ще одному варіанті здійснення другу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує насінину, першої композиції. В іншому варіанті здійснення першу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує рослину, другої композиції. У ще одному варіанті здійснення другу композицію можна застосовувати щодо середовища, яке оточує частину рослини, з наступним застосуванням щодо середовища, яке оточує рослину, першої композиції.

В одному варіанті здійснення даний винахід стосується застосування штамів ентомопатогенних грибів, розкритих у даному документі, з композицією, що містить інсектицидний білок з *Pseudomonas* sp., такий як PSEEN3174 (Monalysin; (2011) *PLoS Pathogens* 7:1-13); зі штамів CHA0 і Pf-5 *Pseudomonas protegens* (раніше *fluorescens*) (Pechy-Tarr, (2008) *Environmental Microbiology* 10:2368-2386; № доступу в GenBank EU400157); з *Pseudomonas taiwanensis* (Liu, et al., (2010) *J. Agric. Food Chem.*, 58:12343-12349) та з *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Zhang, et al., (2009) *Annals of Microbiology* 59:45-50 і Li, et al., (2007) *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89:159-168); інсектицидні білки з *Photorhabdus* sp. і *Xenorhabdus* sp. (Hinchliffe, et al., (2010) *The Open Toxicology Journal*, 3:101-118 і Morgan, et al., (2001) *Applied and Envir. Micro.* 67:2062-2069); патенту США № 6048838 і патенту США № 6379946; поліпептид PIP-1 з публікації заявки на видачу патенту США US20140007292; поліпептид AfIP-1A та/або AfIP-1B із публікації заявки на видачу патенту США US20140033361; поліпептид PPI-4 з документа США із серійним номером 13/839702; поліпептид PIP-47 з публікації за РСТ із серійним номером РСТ/US14/51063; поліпептид PIP-72 з публікації за РСТ із серійним номером; поліпептид PtIP-50 і поліпептид PtIP-65 з публікації за РСТ з номером WO2015/120270; поліпептид PtIP-83 з публікації за РСТ з номером WO2015/120276; поліпептид PtIP-96 з публікації за РСТ із серійним номером РСТ/US15/55502; РСТ/US14/55128 і δ-ендотоксини, зокрема без обмеження гени δ-ендотоксину класів Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry15, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry22, Cry23, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry 28, Cry 29, Cry 30, Cry31, Cry32, Cry33, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry38, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry45, Cry 46, Cry47, Cry49, Cry 51 і Cry55 і гени цитолітичних токсинів Cyt1 і Cyt2 *B. thuringiensis*. Інші білки Cry добре відомі фахівцю в даній галузі (див. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011) на сайті lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, доступ до якого можна одержати у всесвітній мережі Інтернет за допомогою префікса "www"). Інсектицидна активність білків Cry добре відома

фахівцю в даній галузі (для огляду див. van Frannkenhuyzen, (2009) *J. Invert. Path.* 101:1-16). Застосування білків Cry як ознак трансгенної рослини добре відоме фахівцю в даній галузі, та трансгенні рослини з Cry, зокрема без обмеження з Cry1Ac, Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1F, Cry1Fa2, Cry1F+Cry1Ac, Cry2Ab, Cry3A, mCry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Vip3A, mCry3A, Cry9c та CBI-Bt, одержали дозвіл органів контролю (див. Sanahuja, (2011) *Plant Biotech Journal* 9:283-300 та CERA (2010) GM Crop Database Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Вашингтон, сайт cera-gmc.org/index.php?action=gmc_crop_database, доступ до якого можна одержати у всесвітній мережі Інтернет із застосуванням префікса "www"). Використовуваний у даному документі термін "відмінна від *Bt* ознака" стосується будь-якого з інсектицидного гену або ознаки в рослині, одержаних або модифікованих з бактерії, рослини або тварини, що зустрічаються в природі, за винятком будь-якого штаму *Bacillus thuringiensis*. Відмінні від *Bt* ознаки включають в себе без обмеження ознаки для RNAi або dsRNA, одержану від *Psuedomonas* ознаку або одержану від рослини ознаку.

В одному варіанті здійснення даних винахід стосується застосування штамів ентомопатогенних грибів, розкритих у даному документі, з ознакою для RNAi, що містить конструкцію для сайленсингу з одного або декількох полінуклеотидів, які становлять інтерес, що приводять до супресії одного або декількох цільових поліпептидів патогенів, шкідників або комах. Під "елементом сайленсингу" мають на увазі полінуклеотид, який при контакті з комахою або при поглинанні нею, здатний знижувати рівень експресії або усувати експресію цільового полінуклеотиду або поліпептиду, що кодується ним. Використовуваний елемент сайленсингу може знижувати рівень експресії або усувати експресію цільової послідовності шляхом впливу на рівень цільового РНК-транскрипту або, як альтернатива, шляхом впливу на трансляцію та, внаслідок цього, впливу на рівень кодованого поліпептиду. Елементи сайленсингу можуть включати в себе без обмеження сенсовий елемент супресії, антисенсовий елемент супресії, двониткову РНК, siRNA, amiRNA, miRNA або елемент супресії у вигляді шпильки.

В іншому варіанті здійснення даних винахід стосується застосування штамів ентомопатогенних грибів, розкритих у даному документі, з композицією, що містить молекули нуклеїнової кислоти, зокрема елементи сайленсингу для цілеспрямованого впливу на Н-субодиницю вакуолярної АТФази, придатні для контролю популяції шкідників, що належать до ряду твердокрилих, і зараження як описано в публікації заявки на видачу патенту США 2012/0198586. У публікації за РСТ WO 2012/055982 описана рибонуклеїнова кислота (РНК або дволанцюгова РНК), яка інгібує або знижувально регулює експресію цільового гена, який кодує: рибосомальний білок комахи, такий як рибосомальний білок L19, рибосомальний білок L40 або рибосомальний білок S27A; субодиницю протеасоми комахи, таку як білок Rpn6, Pro5 25, білок Rpn2, білок бета-1 субодиниці протеасоми або білок бета-2 Pro5; β -коатомер СОРІ-везикули комахи, γ -коатомер СОРІ-везикули, β '-коатомерний білок або ζ -коатомер СОРІ-везикули; білок тетраспанін 2 А комахи, який являє собою ймовірний білок трансмембранного домену; білок комахи, що належить до родини актину, такий як актин 5С; білок убіквітин-5Е комахи; білок Sec23 комахи, який являє собою активатор ГТФази, залученої у внутрішньоклітинний транспорт білків; білок "crinkled" комахи, який являє собою нестандартний міозин, який залучений у рухову активність; білок "crooked neck" комахи, який є залученим у регуляцію ядерного альтернативного сплайсингу mRNA; білок G-субодиниці вакуолярної Н⁺-АТФази комахи й Tbp-1 комахи, такий як Tat-зв'язувальний білок. У публікації за РСТ WO 2007/035650 описана рибонуклеїнова кислота (РНК або двониткова РНК) яка пригнічує або знижувально регулює експресію цільового гена, який кодує Snf7. У публікації заявки на видачу патенту США 2011/0054007 описані полінуклеотидні елементи сайленсингу, що цілеспрямовано впливають на RPS10. У публікаціях заявок на видачу патентів США 2014/0275208 і US2015/0257389 описані полінуклеотидні елементи сайленсингу, що цілеспрямовано впливають на RyanR і PAT3. У публікаціях за РСТ WO 2016/060911, WO 2016/060912, WO 2016/060913 і WO 2016/060914 описані полінуклеотидні елементи сайленсингу, що цілеспрямовано впливають на молекули нуклеїнової кислоти субодиниці коатомеру СОРІ, які забезпечують стійкість до шкідників, що належать до рядів твердокрилих і напівтвердокрилих. У міжнародній заявці з номером РСТ/US2016/037748 описані полінуклеотидні елементи сайленсингу, що цілеспрямовано впливають на VgR, MAEL, NCLB і BOULE, які контролюють комах-шкідників, що належать до ряду твердокрилих. У публікаціях заявок на видачу патентів США 2012/029750, US 20120297501 і 2012/0322660 описані інтерферувальні рибонуклеїнові кислоти (РНК або двониткова РНК), які функціонують при поглинанні видами комах-шкідників зі знижувальним регулюванням експресії цільового гена у вказаній комасі-шкіднику, де РНК містить щонайменше один елемент сайленсингу, де елемент сайленсингу являє собою ділянку двониткової РНК, що містить

гібридизовані комплементарні нитки, з яких одна нитка передбачає послідовність нуклеотидів, яка щонайменше частково комплементарна цільовій нуклеотидній послідовності у межах цільового гена, або складається з неї. У публікації заявки на видачу патенту США 2012/0164205 описані потенційні мішені для інтерферувальних двониткових рибонуклеїнових кислот для пригнічення безхребетних шкідників, зокрема гомологічна послідовність Chd3, гомологічна послідовність бета-тубуліну, гомологічна послідовність V-АТФази вагою 40 кДа, гомологічна послідовність EF1 α , гомологічна послідовність субодиниці p28 протеосоми 26S, гомологічна послідовність епоксидгідролази ювенільного гормону, гомологічна послідовність білка хлоридних каналів, залежних від набрякання, гомологічна послідовність білка глюкозо-6-фосфат-1-дегідрогенази, гомологічна послідовність білка Act42A, гомологічна послідовність фактора 1 АДФ-рибозилування, гомологічна послідовність білка фактора ІІВ транскрипції, гомологічні послідовності хітинази, гомологічна послідовність ферменту, що кон'югує убіквітин, гомологічна послідовність гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, гомологічна послідовність убіквітину В, гомолог естерази ювенільного гормону й гомологічна послідовність альфа-тубуліну.

Один варіант здійснення даного винаходу передбачає додатковий компонент, який може являти собою носій, допоміжний засіб, солюбілізуючий засіб, суспендувальний засіб, розріджувач, поглинач кисню, антиоксидант, поживну речовину, засіб, що запобігає забрудненню, або їх комбінації.

В іншому варіанті здійснення додатковий(додаткові) компонент(компоненти) може(можуть) бути потрібен(потрібні) для застосування, щодо якого штам або композицію передбачається використовувати. Наприклад, якщо штам або композицію передбачається використовувати на або в сільськогосподарському продукті, то додатковий(додаткові) компонент(компоненти) може(можуть) являти собою прийнятний з погляду сільського господарства носій, наповнювач або розріджувач. Аналогічно, якщо штам або композицію передбачається використовувати на або в продукті харчування, то додатковий(додаткові) компонент(компоненти) може(можуть) являти собою іствні носій, наповнювач або розріджувач.

В одному аспекті одним або декількома додатковими компонентами є носій, наповнювач або розріджувач.

"Носії" або "середовища-носії" означають матеріали, придатні для введення сполук і включають в себе будь-який такий матеріал, відомий з рівня техніки, такий як, наприклад, будь-які рідина, гель, розчинник, рідкий розріджувач, солюбілізатор тощо, який є нетоксичним і не взаємодіє з будь-якими компонентами композиції шкідливим чином.

Приклади прийнятних для застосування в їжу носіїв включають в себе, наприклад, воду, сольові розчини, спирт, кремнійорганічну смолу, види воску, вазелінове масло, рослинні масла, поліетиленгліколі, пропіленгліколь, ліпосоми, цукри, желатин, лактозу, амілозу, стеарат магнію, тальк, поверхнево-активні речовини, кремнієву кислоту, в'язкий парафін, парфумерне масло, моногліцериди та дигліцериди жирних кислот, естери нафтових жирних кислот, гідроксиметилцелюлозу, полівінілпіролідон тощо.

Приклади наповнювачів включають в себе без обмеження мікрокристалічну целюлозу й інші види целюлози, лактозу, цитрат натрію, карбонат кальцію, двозаміщений фосфат кальцію, гліцин, крохмаль, молочний цукор і високомолекулярні поліетиленгліколі.

Приклади розріджувачів включають в себе без обмеження воду, етанол, пропіленгліколь і гліцерин і їх комбінації.

Додаткові компоненти можна застосовувати одночасно зі штамом ентомопатогенного гриба та/або композицією, розкритими в даному документі (наприклад, у випадку, якщо вони знаходяться в суміші разом або навіть у випадку, якщо їх доставляють різними шляхами) або послідовно (наприклад, їх можна доставляти різними шляхами).

Штам ентомопатогенного гриба та/або композиція, розкриті в даному документі, та/або її розріджувач можуть також містити засоби, що сприяють утворенню хелатів, такі як EDTA, лимона кислота, винна кислота тощо. Крім того, штам ентомопатогенного гриба та/або композиція, розкриті в даному документі, та/або її розріджувач можуть містити активні засоби, вибрані з естерів жирних кислот, таких як моно- і дигліцериди, неіонні поверхнево-активні речовини, такі як полісорбати, фосфоліпіди тощо. Штам ентомопатогенного гриба та/або композиція, розкриті в даному документі, та/або її розріджувач можуть також містити емульгатори, які можуть підвищувати стабільність штаму ентомопатогенного гриба та/або композиції, особливо після розведення.

Штам ентомопатогенного гриба та/або композицію, розкриті в даному документі, можна застосовувати в будь-якій придатній формі, або при застосуванні окремо, або за присутності в композиції. Штам ентомопатогенного гриба та/або композицію, розкриті в даному документі,

можна складати будь-яким придатним способом для забезпечення того, що композиція містить активний штам ентомопатогенного гриба.

5 Штам ентомопатогенного гриба та/або композиції можуть бути у формі сухого порошку, яким можна посипати продукт або який можна змішувати з продуктом. Штами ентомопатогенних грибів та/або композиції за варіантами здійснення даного винаходу, розкриті в даному документі, у формі сухого порошку можуть включати добавку, таку як мікрокристалічна целюлоза, трагакантова камедь, желатин, крохмаль, лактоза, альгінова кислота, Primojel® або кукурудзяний крохмаль (який можна застосовувати як розпушувач).

10 У ще одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції, розкриті в даному документі, можуть бути висушені розпилюванням, ферментовані й ресуспендовані в H₂O до значення відсоткового вмісту, вибраного з наступного: 0,05-1, 1-3, 3-5, 5-7, 7-10, 10-15, 15-20 і більше 20%. В іншому варіанті здійснення стадію освітлення можна виконувати перед висушуванням розпилюванням.

15 В одному варіанті здійснення композиції, розкриті в даному документі, можуть передбачати суспензію пропагул, таких як спори, зі штамів ентомопатогенних грибів, розкритих у даному документі. В одному варіанті здійснення суспензія пропагул, таких як спори, може становити в діапазоні від 1×10^2 до 1×10^{14} КУО/мл.

20 В одному варіанті здійснення композиції, розкриті в даному документі, можуть містити концентровані висушені пропагули, такі як спори, зі штамів ентомопатогенних грибів, розкритих у даному документі. В одному варіанті здійснення концентровані висушені спори можуть бути в діапазоні від 1×10^2 до 1×10^{14} КУО/г.

В одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції на основі ентомопатогенних грибів, розкриті в даному документі, можна застосовувати у вологій або частково або повністю зневодненій формі або у формі зависі, гелю або іншій формі.

25 У щонайменше деяких варіантах здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції можна висушувати сублімацією або ліофілізувати. У щонайменше деяких варіантах здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції на основі ентомопатогенних грибів можна змішувати з носієм. Носій включає без обмеження молочну сироватку, мальтодекстрин, сахарозу, декстрозу, вапняк (карбонат кальцію), рисове лушпиння, дріжджову культуру, висушений крохмаль, глину й натрієвокремнієвий алюмінат. Однак немає необхідності у висушуванні сублімацією штамів до їх застосування. Штами також можна застосовувати з консервантами або без них і в концентрованій, неконцентрованій або розведений формі. В одному варіанті здійснення штами можуть бути у формі осаду або біологічно чистого осаду.

30 Штам ентомопатогенного гриба та/або композицію, описані в даному документі, можна додавати до одного або декількох носіїв. При використанні носій(носії) і штами можна додавати до стрічкової або лопатевої мішалки й змішувати протягом приблизно 15 хвилин, однак час можна збільшувати або зменшувати. Компоненти змішують таким чином, що одержують однорідну суміш культури і носія(носіїв). Кінцевий продукт переважно являє собою сухий сипкий порошок.

40 В одному варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба та/або композиції можна складати у формі рідини, сухого порошку або гранули. Сухий порошок або гранули можна одержувати за допомогою засобів, відомих фахівцям у даній галузі, таких як в глазурувальній машині з псевдорозрідженим шаром і розпилюванням у верхній частині, у Wurster з розпилюванням в нижній частині або шляхом барабанної грануляції (наприклад, грануляції з високою швидкістю зсуву), екструзія, дражування або в мішалці для змішування інгредієнтів в мікро-кількостях.

В іншому варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції можна одержувати у вигляді висушеного розпилюванням або висушеного сублімацією порошку.

50 У ще одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції представлені рідким складом. Такий рідкий склад може містити одне або декілька з наступного: буферу, солі, сорбіту та/або гліцерину.

В одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції, розкриті в даному документі, можна складати зі щонайменше одним фізіологічно прийнятним носієм, вибраним зі щонайменше одного з мальтодекстрину, кальцинованої (ілітової) глини, вапняку (карбонату кальцію), циклодекстрину, пшениці або компонента пшениці, сахарози, крохмалю, Na₂SO₄, тальку, PVA, сорбіту, бензоату, сорбіату, гліцерину, сахарози, пропіленгліколю, 1,3-пропандіолу, глюкози, парабенів, хлориду натрію, цитрату, ацетату, фосфату, кальцію, метабісульфіту, форміату або їх сумішей.

60 В одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції, розкриті в даному документі, можна складати за допомогою технології інкапсулювання для поліпшення

характеристик грибової пропагули, такої як спори, стабільності та з метою захисту грибкових пропагун від застосовуваних щодо насіння фунгіцидів. В одному варіанті здійснення технологія інкапсулювання може передбачати полімер для утворення гранул для розрахованого на визначений час вивільнення грибкових пропагун, таких як спори, впродовж часу. В одному
5 варіанті здійснення інкапсулюванні штами ентомопатогенних грибів та/або композиції на основі ентомопатогенних грибів можна застосовувати при окремому внесенні гранул у борозну щодо насіння. В іншому варіанті здійснення інкапсулюванні штами ентомопатогенних грибів та/або композиції на основі ентомопатогенних грибів можна одночасно застосовувати з насінням.

Покривний засіб, застосовуваний для тривалого вивільнення мікрочастинок у варіанті
10 здійснення з використанням інкапсуляції, може являти собою речовину, яка придатна для покриття мікрогранулярної форми речовиною для підтримання на ній. Можна використовувати загалом без будь-якого певного обмеження будь-який покривний засіб, який здатний утворювати покриття, що є важкопроникним для речовини, яка присутня в складі. Наприклад, можна застосовувати жирну кислоту з більш високим ступенем насичення, віск, термопластичну
15 смолу, терморезактивну смолу та подібні їм.

Приклади придатної жирної кислоти з більш високим ступенем насичення включають в себе стеаринову кислоту, стеарат цинку, амід стеаринової кислоти і етилен-біс-амід стеаринової кислоти; приклади воску включають в себе види синтетичного воску, такі як поліетиленовий віск, вуглецевий віск, віск Hoechst і естер жирної кислоти; види природного воску, такі як
20 карнаубський віск, бджолиний віск і японський віск; і види воску з нафтопродуктів, такі як парафіновий віск і пертолдум. Приклади термопластичної смоли включають в себе поліолефіни, такі як поліетилен, поліпропілен, полібутен і полістирол; вінілполімери, такі як полівінілацетат, полівінілхлорид, полівініліденхлорид, поліакрилова кислота, поліметакрилова кислота, поліакрилат і поліметакрилат; полідієни, такі як бутадієновий полімер, ізопреновий
25 полімер, хлоропреновий полімер, співполімер бутадієну та стиролу, співполімер етилену, пропілену та дієну, співполімер стиролу та ізопрену, співполімер MMA і бутадієну і співполімер акрилонітрилу та бутадієну; поліолефінові співполімери, такі як співполімер етилену та пропілену, співполімер бутену та етилену, співполімер бутену та пропілену, співполімер етилену та вінілацетату, співполімер етилену та акрилової кислоти, співполімер стиролу та акрилової
30 кислоти, співполімер етилену та метакрилової кислоти, співполімер етилену та метакрилового естеру, співполімер етилену та оксиду вуглецю, співполімер етиленвінілацетату та оксиду вуглецю, співполімер етиленвінілацетату та вінілхлориду та співполімер етиленвінілацетату й акрилової кислоти; і вінілхлоридні співполімери, такі як співполімер вінілхлориду та вінілацетату та співполімер вініліденхлориду та вінілхлориду. Приклади терморезактивної смоли включають в себе поліуретанову смолу, епоксидну смолу, алкідну смолу, ненасичену поліестерну смолу, фенольну смолу, меламін-сечовинну смолу, сечовинну смолу і силіконову смолу. Із них терморезактивні смола на основі естеру акрилової кислоти, смола на основі співполімеру
35 бутадієну та стиролу, терморезактивна поліуретанова смола та епоксидна смола є переважними, а серед цих переважних смол особливо переважною є терморезактивна поліуретанова смола. Ці покривні засоби можна використовувати як окремо, так і в комбінації двох або більше різновидів засобів.

В одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції можуть передбачати насінину, частину насінини, рослину або частину рослини.

Усі рослини, частини рослин, насіння або ґрунт можна обробляти відповідно штамами
45 ентомопатогенних грибів, композиціями та способами, розкритими у даному документі. Композиції, розкриті в даному документі, можуть передбачати рослину, частину рослини, насінину, частину насінини або ґрунт. Штами ентомопатогенних грибів, композиції на основі ентомопатогенних грибів і способи, розкриті в даному документі, можна застосовувати щодо насінини, рослини або частин рослини, плоду або ґрунту, в якому ростуть рослини.

Один варіант здійснення стосується способу зниження пошкодження рослини або частини
50 рослини з боку рослинного патогена, шкідника або комахи, що передбачає (а) обробку перед сіянням насінини штамом ентомопатогенного гриба або композицією на основі ентомопатогенного гриба, розкритими в даному документі. В іншому варіанті здійснення спосіб додатково передбачає (b) обробку частини рослини, одержаної з насінини, штамом
55 ентомопатогенного гриба або композицією на основі ентомопатогенного гриба, розкритими в даному документі. Штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба, застосовувані на стадії (а), можуть бути такими самими або відмінними від штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, застосовуваних на стадії (b).

Один варіант здійснення стосується способу зниження пошкодження рослини або частини рослини з боку рослинного патогена, шкідника або комахи, що передбачає (а) обробку ґрунту, який оточує насінину або рослину, штамом ентомопатогенного гриба або композицією на основі ентомопатогенного гриба. В іншому варіанті здійснення спосіб додатково передбачає (b) обробку частини рослини штамом ентомопатогенного гриба або композицією на основі ентомопатогенного гриба, розкритими в даному документі. Штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба, застосовувані на стадії (а), можуть бути такими самими або відмінними від штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, застосовуваних на стадії (b).

Один варіант здійснення стосується способу зниження пошкодження рослини або частини рослини з боку рослинного патогена, шкідника або комахи, що передбачає (а) обробку насінини перед садженням штамом ентомопатогенного гриба або композицією на основі ентомопатогенного гриба, розкритих в даному документі. В іншому варіанті здійснення спосіб додатково передбачає (b) обробку ґрунту, який оточує насінину або рослину, штамом ентомопатогенного гриба або композицією на основі ентомопатогенного гриба, розкритими в даному документі. У ще одному варіанті здійснення спосіб додатково передбачає (с) обробку частини рослини щодо рослини, одержаної з насінини, штамом ентомопатогенного гриба або композицією на основі ентомопатогенного гриба, розкритими в даному документі. Штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба, застосовувані на стадії (а), можуть бути такими самими або відмінними від штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, застосовуваних на стадії (b). Штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба, застосовувані на стадії (а), можуть бути такими самими або відмінними від штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, застосовуваних на стадії (с). Штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба, застосовувані на стадії (b), можуть бути такими самими або відмінними від штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба, застосовуваних на стадії (с).

В одному варіанті здійснення види дикорослих рослин і культивари рослин або такі, одержані за допомогою стандартної біологічної селекції, такої як схрещування або злиття протопластів, або їхні частини, можна обробляти за допомогою одного або декількох штамів ентомопатогенних грибів, композицій і способів, розкритих у даному документі. В іншому варіанті здійснення трансгенні рослини і культивари рослин, одержані за допомогою генної інженерії, та їхні частини рослин обробляють за допомогою одного або декількох штамів ентомопатогенних грибів, композицій на основі ентомопатогенних грибів і способів, розкритих у даному документі.

В іншому варіанті здійснення рослини і культивари рослин (одержані за допомогою способів біотехнології, таких як генна інженерія), які можна обробляти відповідно до штамів, композицій і способів, розкритих у даному документі, є рослинами з переносимістю гербіцидів, тобто рослинами, створеними такими, які переносять один або декілька визначених гербіцидів. Такі рослини можна одержувати або за допомогою генетичної модифікації, або за допомогою відбирання рослин, що містять мутацію, яка додає таку переносимість гербіцидів. Стійкі до гербіцидів рослини являють собою, наприклад, рослини з переносимістю гліфосату, тобто рослини, створені такими, які переносять гербіцид гліфосат або його солі. Рослини можна створювати такими, які переносять гліфосат, за допомогою різних способів. Наприклад, рослини з переносимістю гліфосату можна одержувати за допомогою трансформації рослини геном, що кодує фермент 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS).

Насіння, рослини або культивари рослин (одержані за допомогою способів біотехнології, таких як генна інженерія), які також можна обробляти згідно з варіантами здійснення, розкритими в даному документі, є стійкими до комах генетично модифікованими рослинами (або трансгенними рослинами), тобто рослинами, створеними стійкими до нападу визначених цільових комах. Такі рослини можна одержувати за допомогою генетичної трансформації або за допомогою відбирання рослин, що містять мутацію, яка додає таку стійкість до комах.

В іншому варіанті здійснення насіння, рослини або культивари рослин (одержані за допомогою способів біотехнології, таких як генна інженерія), які можна обробляти згідно з даним винаходом, є такими, які переносять абіотичні стреси. Такі рослини можна одержувати за допомогою генетичної трансформації або за допомогою відбирання рослин, що містять мутацію, яка додає таку стійкість до стресів.

В іншому варіанті здійснення насіння, рослини або культивари рослин (одержані за допомогою способів біотехнології рослин, таких як генна інженерія), які можна обробляти згідно з даним винаходом, традиційно розмножують, за допомогою мутагенезу, або генетично

конструюють з одержанням комбінації або "пакету" цінних ознак, зокрема без обмеження переносимості гербіцидів, стійкості до комах і переносимості абіотичних стресів. Варіанти здійснення, розкриті в даному документі, також застосовуються щодо сортів рослин, які будуть створені або представлені на ринку в майбутньому та які мають ці генетичні ознаки або ознаки, які передбачається розробити в майбутньому.

Як використовується в даному документі, застосування штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба щодо насінини, рослини або частини рослини передбачає приведення в контакт, розпилення, покриття, зрошення та/або застосування щодо насінини, рослини або частини рослини безпосередньо та/або опосередковано штаму ентомопатогенного гриба або композиції на основі ентомопатогенного гриба. В одному варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба можна застосовувати безпосередньо у вигляді спрею, засобу для полоскання або порошку або їх комбінації. Стадія приведення в контакт може відбуватися у той час, коли насінини, рослина або частина рослини росте, в той час, коли рослину або частину рослини удобрюють, в той час, коли рослину або частину рослини збирають, після того, як рослину або частину рослини зібрали, в той час, коли рослину або частину рослини піддають обробці, в той час, коли рослину або частину рослини упаковують, або в той час, коли рослину або частину рослини зберігають на складі або на полиці в магазині.

Як використовується в даному документі, спрей стосується туману з рідких частинок, які містять штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба за даним винаходом. В одному варіанті здійснення спрею можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини в той час, коли рослина або частина рослини росте. В іншому аспекті спрею можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини в той час, коли насінину, рослину або частину рослини удобрюють. В іншому аспекті спрею можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини в той час, коли рослину або частину рослини збирають. В іншому аспекті спрею можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини після того, як насінину, рослину або частину рослини зібрали. В іншому аспекті спрею можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини в той час, коли рослину або частину рослини піддають обробці. В іншому аспекті спрею можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини в той час, коли насінину, рослину або частину рослини упаковують. В іншому аспекті спрею можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини в той час, коли насінину, рослину або частину рослини зберігають.

В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба, розкриті в даному документі, можна застосовувати безпосередньо щодо насінини, рослини або частини рослини у вигляді засобу для полоскання. Використовуваний у даному документі термін засіб для полоскання являє собою рідину, яка містить штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба, розкриті в даному документі. Такий засіб для полоскання можна виливати на насінину, рослину або частину рослини. Рослину або частину рослини можна також умочувати або занурювати в засіб для полоскання, потім витягувати і забезпечувати можливість висихання.

В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба можна застосовувати щодо насінини, рослини або частини рослини і нею можна покривати 50% площі поверхні рослинного матеріалу. В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба можна застосовувати щодо рослини або частини рослини і нею можна покривати відсоток поверхні рослинного матеріалу, що становить від 50% до приблизно 95%, від 60% до приблизно 95%, від 70% до приблизно 95%, від 80% до приблизно 95% і від 90% до приблизно 95%. В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба, розкриті в даному документі, можна застосовувати щодо середовища, яке оточує насінину, рослину або частину рослини, і нею можна покривати 50% площі середовища, яке оточує насінину, рослину або частину рослини. В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба можна застосовувати щодо середовища, яке оточує насінину, рослину або частину рослини, і нею можна покривати відсоток поверхні середовища, яке оточує насінину, рослину або частину рослини, що становить від 50% до приблизно 95%, від 60% до приблизно 95%, від 70% до приблизно 95%, від 80% до приблизно 95% і від 90% до приблизно 95%.

В іншому аспекті штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба можуть покривати від приблизно 20% до приблизно 30%, від приблизно 30% до приблизно 40%, від приблизно 40% до приблизно 50%, від приблизно 50%

до приблизно 60%, від приблизно 60% до приблизно 70%, від приблизно 70% до приблизно 80%, від приблизно 80% до приблизно 90%, від приблизно 90% до приблизно 95%, від приблизно 95% до приблизно 98%, від приблизно 98% до приблизно 99% або 100% площі поверхні насінини, рослини або частини рослини або площі середовища, яке оточує насінину, рослину або частину рослини.

В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба, розкриті в даному документі, можна застосовувати безпосередньо щодо насінини, рослини або частини рослини або середовища, яке оточує насінину, рослину або частину рослини, у вигляді порошку. Використовуваний у даному документі порошок являє собою суху або практично суху тверду речовину у насипній формі, яка складається з великої кількості дуже дрібних частинок, які вільно течуть при струшуванні або нахилі. Композиція сухого або практично сухого порошку, розкрита в даному документі, переважно містить низький відсоток води, як, наприклад, в різних аспектах менше 5%, менше 2,5% або менше 1% за вагою.

В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба можна застосовувати опосередковано щодо насінини, рослини або частини рослини або середовища, яке оточує насінину, рослину або частину рослини. Наприклад, насінина, рослина або частина рослини, щодо яких уже застосовували штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба, можуть стосуватися других насінини, рослини або частини рослини таким чином, що штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба переходять через тертя на другі насінину, рослину або частину рослини. У додатковому аспекті штам ентомопатогенного гриба або композицію на основі ентомопатогенного гриба можна застосовувати за допомогою аплікатора. У різних аспектах аплікатор може включати без обмеження шприц, губку, паперовий рушник або тканину або будь-яку їх комбінацію.

Стадія приведення в контакт може відбуватися в той час, коли рослинний матеріал росте, в той час, коли насінину, рослину або частину рослини удобрюють, в той час, коли рослину або частину рослини збирають, після того, як насінину, рослину або частину рослини зібрали, в той час, коли рослину або частину рослини піддають обробці, в той час, коли рослину або частину рослини упаковують, або в той час, коли рослину або частину рослини зберігають на складі.

В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенного гриба або композиція на основі ентомопатогенного гриба, розкриті в даному документі, можуть являти собою колоїдну дисперсію. Колоїдна дисперсія являє собою тип хімічної суміші, де одна речовина рівномірно диспергована в іншій. Частинки диспергованої речовини лише суспендуються в суміші, на відміну від розчину, в якому вони повністю розчиняються. Це відбувається оскільки частинки в колоїдній дисперсії є більш великими, ніж в розчині, достатньо маленькими для того, щоб рівномірно диспергуватися і підтримувати гомогенний зовнішній вид, але достатньо великими для того, щоб розсіювати світло і не розчинятися. Колоїдні дисперсії є проміжними між гомогенними й гетерогенними сумішами та іноді класифікуються як або "гомогенні", або "гетерогенні" на основі їх зовнішнього вигляду.

В одному варіанті здійснення штам ентомопатогенних грибів, композиції та способи, розкриті в даному документі, придатні для застосування з насіниною. В іншому варіанті здійснення штам ентомопатогенних грибів, композиції та способи, розкриті в даному документі, придатні для застосування з насіниною однієї або декількох з будь-яких рослин, згаданих раніше.

У ще одному варіанті здійснення штам ентомопатогенних грибів, композиції та способи, розкриті в даному документі, можна застосовувати для обробки трансгенного або генетично модифікованого насіння. Гетерологічний ген в трансгенному насінні може походити, наприклад, з мікроорганізмів видів *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Clavibacter*, *Glomus* або *Gliocladium*.

В одному варіанті здійснення насінину обробляють в стані, в якому вона є достатньо стабільною, тому обробка не викликає ніякого пошкодження. Зазвичай обробка насінини може відбуватися в будь-який момент часу між збиранням урожаю й сіянням. В одному варіанті здійснення застосовувану насінину відокремлюють від рослини та звільняють від початків, лушпиння, стебел, покривів, волосків або м'якоті плодів. Таким чином, можна застосовувати, наприклад, насінину, яка була зібрана, очищена й висушена. Як альтернатива, можна також застосовувати насінину, яка після висушування була оброблена, наприклад, водою і потім повторно висушена.

В одному варіанті здійснення насінину обробляють штамами ентомопатогенних грибів, композиціями й способами, розкритими у даному документі, таким чином, що проростання

насінини не знаходиться під несприятливим впливом або що рослина, яка в результаті утворюється, не пошкоджується.

В одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів і композиції, розкриті в даному документі, можна застосовувати безпосередньо щодо насінини. Наприклад, штами ентомопатогенних грибів, композиції та способи, розкриті в даному документі, можна застосовувати без додаткових компонентів і без розведення.

В іншому варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів і композиції на основі штамів ентомопатогенних грибів, розкриті в даному документі, застосовують щодо насінини у формі придатного складу. Придатні склади й способи обробки насінини відомі фахівцю в даній галузі та описані, наприклад, у наступних документах: US 4272417 A, US 4245432 A, US 4808430 A, US 5876739 A, US 2003/0176428 A1, WO 2002/080675 A1, WO 2002/028186 A2.

Штами ентомопатогенних грибів і композиції на основі ентомопатогенних грибів, розкриті в даному документі, можна перетворювати на загальноприйнятні склади для протравлювання насіння, такі як розчини, емульсії, суспензії, порошки, піни, зависі або інші покриті матеріали для насінини, а також складу ULV. Ці суміші одержують відомим шляхом в результаті змішування штамів ентомопатогенних грибів і, розкритих у даному документі, зі звичайними добавками, такими як, наприклад, звичайні добавки для об'єму, а також розчинники або розріджувачі, барвники, змочувальні засоби, диспергувальні засоби, емульгатори, піногасники, консерванти, вторинні загусники, адгезивні засоби, гібереліни, а також вода.

В іншому варіанті здійснення придатні барвники, які можуть бути присутніми в складі для протравлювання насіння, включають в себе всі барвники, які є загальноприйнятими для таких цілей. Можна використовувати як пігменти, що характеризуються помірною розчинністю у воді, так і барви, розчинні у воді. Приклади, які можна згадати, включають барвники, відомі під назвами родамін В, С.І. червоний пігмент 112 і С.І. червоний розчинник 1.

В іншому варіанті здійснення придатні змочувальні засоби, які можуть бути присутніми в складі для протравлювання насіння, включають в себе всі речовини, які стимулюють змочування та є загальноприйнятими в складі активних агрохімічних речовин. Переважно можна використовувати алкілнафталінсульфонати, наприклад діізопропіл- або діізобутилнафталінсульфонати.

У ще одному варіанті здійснення придатні диспергувальні засоби та/або емульгатори, які можуть бути присутніми в складі для протравлювання насіння, включають в себе всі неіонні, аніонні й катіонні диспергувальні засоби, які є загальноприйнятими в складі активних агрохімічних речовин. В одному варіанті здійснення можна застосовувати неіонні або аніонні диспергувальні засоби або суміші неіонних або аніонних диспергувальних засобів. В одному варіанті здійснення неіонні диспергувальні засоби включають в себе без обмеження блок-співполімери етиленоксиду та пропіленоксиду, алкілфенолполігліколеві етери та тристирилфенолполігліколеві етери та їх фосфатовані та сульфатовані похідні.

У ще одному варіанті здійснення піногасники, які можуть бути присутніми в складі для протравлювання насіння, призначеному для застосування згідно з варіантами здійснення даного винаходу, включають в себе всі сполуки, що пригнічують утворення піни, які є загальноприйнятими в складі агрохімічно активних сполук, зокрема без обмеження силіконові піногасники, стеарат магнію, силіконові емульсії, спирти з довгим ланцюгом, жирні кислоти та їх солі, а також фторорганічні сполуки та їх суміші.

У ще одному варіанті здійснення вторинні загусники, які можуть бути присутніми в складі для протравлювання насіння, включають в себе всі сполуки, які можна застосовувати для таких цілей в агрохімічних композиціях, зокрема без обмеження похідні целюлози, похідні акрилової кислоти, полісахариди, такі як ксантанова камедь або вігум, різновиди модифікованої глини, філосилікати, такі як атапульгіт і бентоніт, а також дрібнодисперсні різновиди кремнієвої кислоти.

Придатні адгезивні засоби, які можуть бути присутніми в складі для протравлювання насіння, призначеному для застосування, можуть включати в себе всі загальноприйнятні зв'язувальні речовини, які можна застосовувати в складах для протравлювання насіння. Як переважні можна згадати полівінілпіролідон, полівінілацетат, полівініловий спирт і тилозу.

У ще одному варіанті здійснення складу для протравлювання насіння можна застосовувати безпосередньо або після розведення водою перед обробкою насінини будь-якого з дуже широкого різноманіття типів. Склади для протравлювання насіння або їх розведені препарати також можна застосовувати для протравлювання насіння трансгенних рослин. У цьому контексті синергічні ефекти можуть також виникати при взаємодії з речовинами, утвореними в результаті експресії.

Придатне обладнання для змішування для обробки насіння складом для протравлювання насіння або препаратами, одержаними з них за допомогою додавання води, включає в себе все обладнання для змішування, яке можна зазвичай застосовувати для протравлювання. Конкретна процедура, прийнята при протравлюванні, включає в себе введення насіння в змішувач, додавання визначеної необхідної кількості складу для протравлювання насіння, або в тому вигляді, в якому він є, або після попереднього розведення водою і здійснення змішування до тих пір, доки склад не буде розподілений рівномірно на насінні. Необов'язково після цього йде процес висушування.

У різних варіантах здійснення один або декілька штамів ентомопатогенних грибів, композицій на основі ентомопатогенних грибів або складів на основі ентомопатогенних грибів можна додавати до рослини, частини рослини та/або насіння в кількості, що становить від приблизно 10 до 1×10^{14} колонієутворюючих одиниць (КУО) на насінну, зокрема приблизно 1×10^3 КУО/насінна, або приблизно 1×10^4 КУО/насінна, 1×10^5 КУО/насінна, або приблизно 1×10^6 КУО/насінна, або приблизно 1×10^7 КУО/насінна, або приблизно 1×10^8 КУО/насінна, або приблизно 1×10^9 КУО/насінна, або приблизно 1×10^{10} КУО/насінна, або приблизно 1×10^{11} КУО/насінна, або приблизно 1×10^{12} КУО/насінна, або приблизно 1×10^{13} КУО/насінна, зокрема приблизно від 1×10^3 до 1×10^8 КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^7 КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^5 КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^6 КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^4 КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^9 КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^{10} КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^{11} КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^3 до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^8 КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^7 КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^5 КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^6 КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^9 КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^{10} КУО/насінна, приблизно від 1×10^{11} до 1×10^9 КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^4 до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^7 КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^6 КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^8 КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^9 КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^{10} КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^{11} КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^5 до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^6 до 1×10^8 КУО/насінна, приблизно від 1×10^6 до 1×10^7 КУО/насінна, приблизно від 1×10^6 до 1×10^{10} КУО/насінна, приблизно від 1×10^6 до 1×10^{11} КУО/насінна, приблизно від 1×10^6 до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^6 до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^7 до 1×10^9 КУО/насінна, приблизно від 1×10^7 до 1×10^{10} КУО/насінна, приблизно від 1×10^7 до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^7 до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^8 до 1×10^{10} КУО/насінна, приблизно від 1×10^8 до 1×10^{11} КУО/насінна, приблизно від 1×10^8 до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^8 до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^9 до 1×10^{10} КУО/насінна, приблизно від 1×10^9 до 1×10^{11} КУО/насінна, приблизно від 1×10^9 до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^9 до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^{10} до 1×10^{11} КУО/насінна, приблизно від 1×10^{10} до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^{10} до 1×10^{13} КУО/насінна, приблизно від 1×10^{11} до 1×10^{12} КУО/насінна, приблизно від 1×10^{11} до 1×10^{13} КУО/насінна. Використовуваний у даному документі термін "колонієутворююча одиниця" або "КУО" являє собою одиницю, яка містить структури ентомопатогенних грибів, здатні до росту й утворенню колонії за сприятливих умов. Значення КУО виступає в ролі оцінки числа життєздатних структур або клітин у зразку.

В одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів і композиції на основі ентомопатогенних грибів можна складати у формі рідкого засобу для обробки насіння. Засіб для обробки насіння містить щонайменше один штам ентомопатогенного гриба або одну композицію на основі ентомопатогенного гриба. Насіння може бути практично рівномірно покрите одним або декількома шарами ентомопатогенного гриба або композиції за допомогою стандартних способів змішування, розпилення або їх комбінації. Нанесення можна виконувати за допомогою обладнання, яке точно, безпечно й ефективно наносить продукти для обробки насіння на насіння. В такому обладнанні застосовують різні типи технології покриття, такі як ротаційні пристрої для нанесення покриття, барабанні пристрої для нанесення покриття, методики із застосуванням псевдозрідженого шару, фонтанувальні шари, ротаційні спреї або їх комбінація.

В одному варіанті здійснення нанесення виконують за допомогою або "пульверизаційного" диска, що обертається, або розпилювальної форсунки, яка рівномірно розподіляє засіб для обробки насіння на насіння по мірі свого просування за схемою розпилення. У ще одному варіанті здійснення насінину потім змішують або перемішують протягом додаткового періоду часу для досягнення додаткового розподілу обробки та висушування. Насіння можна праймувати або можна не праймувати перед покриттям композиціями за даним винаходом для підвищення однорідності проростання й появи. В альтернативному варіанті здійснення композицію сухого порошку можна відміряти на насіння, що рухається.

У ще одному варіанті здійснення насінину можна покривати за допомогою безперервного або періодичного способу покриття. При безперервному способі покриття обладнання з безперервним потоком одночасно відміряє як потік насіння, так і продукти обробки насіння. Ковзний замок, конус і вхідний отвір, котушка пристрою, що висіває, або пристрій для зважування (стрічка або відвідний пристрій) регулює потік насіння. Одразу після визначення швидкості потоку насіння через обладнання для обробки швидкість потоку засобу для обробки насіння калібрують відносно до швидкості потоку насіння для доставки необхідної дози до насіння, по мірі просування через обладнання для обробки насіння. Крім того, комп'ютерна система може відстежувати вхід насіння в пристрій для покриття, завдяки цьому здійснюється підтримка постійного потоку відповідної кількості насіння.

При періодичному способі покриття обладнання для періодичної обробки відважає передбачену кількість насіння й поміщає насіння в закриту камеру або резервуар для обробки, де потім проводять відповідну обробку насіння. Насіння й засіб для обробки насіння потім змішують з досягненням практично однорідного покриття на кожній насінині. Цю партію потім видаляють з камери для обробки при підготовці до обробки наступної партії. За допомогою комп'ютерних систем контролю цей періодичний спосіб автоматизують, забезпечуючи безперервний повтор процесу періодичної обробки.

Ряд добавок можна додавати до засобу для обробки насіння. Можна додавати зв'язувальні речовини та вони включають в себе такі, що складаються переважно з адгезивного полімеру, який може бути природним або синтетичним без виявлення фітотоксичного ефекту на насіння, що підлягає покриттю. Можна застосовувати ряд барвників, зокрема органічні хромофори, що класифікуються як нітрузо, нітро, азо, зокрема моноазо, бісазо й поліазо, діфенілметан, триарилметан, ксантен, метан, акридин, тіазол, тіазин, індамін, індофенол, азин, оксазин, антрахінон і фталоціанін. Інші добавки, які можна додавати, включають поживні речовини в слідових кількостях, такі як солі заліза, магнію, бору, міді, кобальту, молібдену й цинку. Полімер або інший засіб контролю пилоутворення можна застосовувати для утримання засобів для обробки на поверхні насінини.

Інші стандартні добавки для обробки насіння включають без обмеження покривні засоби, змочувальні засоби, буферні засоби й полісахариди. Щонайменше один прийнятний з погляду сільського господарства носій можна додавати до складу для обробки насіння, такий як вода, тверді речовини або сухі порошки. Сухі порошки можуть бути одержані з ряду матеріалів, таких як кора дерев, карбонат кальцію, гіпс, вермікуліт, тальк, гумус, активоване вугілля й різні фосфорні сполуки.

В одному варіанті здійснення покриття насіння містить щонайменше один наповнювач, який являє собою органічний або неорганічний, природний або синтетичний компонент, з яким штами ентомопатогенних грибів і композиції на їх основі об'єднують для полегшення його нанесення на насіння. В одному варіанті здійснення наповнювач являє собою інертну тверду речовину, таку як глини, природні або синтетичні силікати, кремнезем, смоли, види воску, тверді добрива (наприклад, солі амонію), природні ґрунтові мінерали, такі як каоліни, глини, тальк, вапняк, кварц, атапульгіт, монтморилоніт, бентоніт або види діатомової землі, або синтетичні мінерали, такі як кремнезем, глінозем або силікати, зокрема, силікати алюмінію й магнію.

В одному варіанті здійснення штами ентомопатогенних грибів та/або композиції на основі ентомопатогенних грибів, розкриті в даному документі, можна складати за допомогою технології інкапсулювання для поліпшення характеристик грибової спори, стабільності та з метою захисту грибових спор від застосовуваних щодо насіння фунгіцидів. В одному варіанті здійснення технологія інкапсулювання може передбачати полімер для утворення гранул для розрахованого на визначений час вивільнення грибових спор впродовж часу. В одному варіанті здійснення технологія інкапсулювання може передбачати матеріал на основі цеоліту. В одному варіанті здійснення інкапсульовані штами ентомопатогенних грибів та/або композиції на основі ентомопатогенних грибів можна застосовувати при окремому внесенні гранул у борозну щодо насіння. В іншому варіанті здійснення інкапсульовані штами ентомопатогенних грибів та/або композиції на основі ентомопатогенних грибів можна одночасно застосовувати з насінням.

Контроль стійкості до комах (IRM) являє собою термін, використовуваний для опису варіантів здійснення на практиці, направлених на зниження можливості для комах-шкідників набувати стійкості до тактики контролю комах. У зв'язку з підтриманням пестицидних білків, що походять з *Bt* (*Bacillus thuringiensis*), інших пестицидних білків, хімічної речовини, ентомопатогенного біологічного засобу або інших біологічних препаратів, IRM має велике значення через загрозу, яку стійкість комах несе для подальшого застосування пестицидних захисних засобів, включених в рослини, і технології із застосуванням інсектицидної ознаки загалом. Конкретні стратегії IRM, такі як стратегія сховища, зменшує стійкість комах до специфічних інсектицидних білків, які продукуються в кукурудзі, сої, бавовнику та інших сільськогосподарських культурах. Однак в результаті застосування таких стратегій частина сільськогосподарських культур залишається сприйнятливою до одного або декількох шкідників, щоб забезпечити можливість нестійким комахам розвинути та набути здатності до парування з будь-яким зі стійких шкідників, що з'явилися серед захищених сільськогосподарських культур. Відповідно, з погляду фермера/виробника, надзвичайно необхідно мати сховища якомога меншого розміру та при цьому управляти стійкістю комах, щоб добитися якомога більшого врожаю, зберігаючи при цьому ефективність застосовуваного способу контролю шкідника, незалежно від того, чи передбачає він *Bt*, інший пестицидний білок, хімічну речовину, ентомопатогенний біологічний засіб або інші біологічні препарати, який-небудь інший спосіб або їх комбінації.

Часто використовуваною стратегією IRM є засівання сховища (частини посівної площі в акрах насінням без *Bt*/пестицидної ознаки), оскільки загальноприйнято, що це загальмує розвиток стійкості комах до пестицидних ознак шляхом підтримання чутливості комах. Теоретична основа стратегії сховища для гальмування розвитку стійкості основана на припущенні, що частота і рецесивність стійкості комах обернено пропорційні чуттєвості шкідника; прояв стійкості буде рідким і рецесивним лише тоді, коли шкідники є дуже сприйнятливими до токсину, і навпаки, стійкість буде більш частою і менш рецесивною, коли шкідники не є високо сприйнятливим. Крім того, стратегія припускає, що стійкість до інсектицидної ознаки є рецесивною і забезпечується одним локусом з двома алелями, в результаті чого утворюється три генотипи: сприйнятливі гомозиготи (SS), гетерозиготи (RS) і стійкі гомозиготи (RR). Також стратегія припускає низьку вихідну частоту зустрічальності алелю стійкості та високу частоту випадкового парування між стійкими й сприйнятливими дорослими особинами. В ідеальних умовах лише рідкі особини RR зможуть вижити на фоні пестицидного токсину, що продукується культурою. Як особини SS, так і особини RS будуть сприйнятливими до пестицидного токсину. Структуроване сховище являє собою частину поля рослинника або сукупності полів без *Bt*/інсектицидної ознаки, що забезпечують одержання сприйнятливих (SS) комах, які можуть випадково паруватися з рідкими стійкими (RR) комахами, які виживають в умовах сільськогосподарської культури з інсектицидною ознакою, яка може являти собою культуру з ознакою *Bt*, з одержанням сприйнятливих гетерозигот RS, які будуть знищені в умовах сільськогосподарської культури з *Bt*/інсектицидною ознакою. Інтегроване сховище являє собою визначену частину випадково посадженої частини поля рослинника або сукупності полів без *Bt*/інсектицидної ознаки, що забезпечують одержання сприйнятливих (SS) комах, які можуть випадково паруватися з рідкими стійкими (RR) комахами, що виживають в умовах сільськогосподарської культури з інсектицидною ознакою, з одержанням сприйнятливих гетерозигот RS, які будуть знищені в умовах сільськогосподарської культури з пестицидною ознакою. За допомогою кожної стратегії сховища будуть видалятися стійкі (R) алелі з популяцій комах й затримуватися розвиток стійкості.

Інша стратегія зниження потреби у сховищі полягає в пірамидуванні ознак з різними механізмами дії проти цільової комахи-шкідника. Наприклад, токсини *Bt*, які характеризуються різними механізмами дії, пірамідовані в одній трансгенній рослині, можуть характеризуватися зниженими вимогами до сховища у зв'язку зі зниженим ризиком стійкості. Різні механізми дії в пірамідній комбінації також збільшують стійкість кожної ознаки, оскільки стійкість до кожної ознаки розвивається повільніше.

На даний час розмір, розташування й контроль сховища часто вважаються ключовими для успішного здійснення стратегій сховища зі зменшенням стійкості комах до *Bt*/пестицидної ознаки, що продукується у кукурудзі, бавовнику, сої та інших сільськогосподарських культур. Із приводу зниження врожайності на оброблюваних ділянках, відведених для сховища, деякі фермери відмовляються від вимоги створення сховища, а інші не дотримуються вимог щодо розміру та/або розташування. Ці проблеми приводять або до відсутності сховища, або до менш ефективного сховища, і відповідному ризику збільшення вірогідності розвитку стійких шкідників.

Таким чином, залишається потреба в способах управління стійкістю шкідників на ділянці, засіяній культурними рослинами, стійкими до шкідників. Було б доцільно забезпечити поліпшений спосіб захисту рослин, особливо кукурудзи або інших культурних рослин, від пошкодження, яке спричиняється поїданням шкідниками. Було б особливо доцільно, якщо такий спосіб буде забезпечувати скорочення потрібного рівня внесення традиційних хімічних пестицидів, а також буде обмежувати кількість окремих польових технологічних операцій, які необхідні для сіяння й культивування культурних рослин. Крім того, було б доцільно мати спосіб застосування засобів біологічного контролю, яке підвищує стійкість інсектицидної ознаки або підвищує ефективність багатьох стратегій контролю стійкості.

Один варіант здійснення стосується способу зниження або попередження розвитку стійкості до рослинної інсектицидної/пестицидної композиції шкідника в популяції, що передбачає забезпечення композиції для захисту рослини, такої як пестицидний білок *Bt*, трансгенний пестицидний білок, інші пестицидні білки, хімічні пестициди або ентомопатогени з біологічною пестицидною активністю для насінини, рослини, частини рослини або посівної площі. Інший варіант здійснення стосується способу зниження або попередження стійкості до інсектицидної ознаки рослини, що передбачає забезпечення композиції, що містить інсектицидну ознаку рослини та штам ентомопатогенного гриба, описаний в даному документі. Додатковий варіант здійснення стосується способу зниження або попередження стійкості до інсектицидної ознаки рослини щодо ряду твердокрилих, що передбачає забезпечення композиції, що містить інсектицидну ознаку рослини щодо ряду твердокрилих і штам ентомопатогенного гриба та/або композицію на основі ентомопатогенного гриба, описані в даному документі. Інший варіант здійснення стосується способу зниження або попередження стійкості до інсектицидної ознаки рослин щодо *Diabrotica virgifera virgifera*, що передбачає забезпечення інсектицидної ознаки рослини щодо *Diabrotica virgifera virgifera* і штаму ентомопатогенного гриба та/або композиції на основі ентомопатогенного гриба, описаних в даному документі. У певних варіантах здійснення інсектицидна ознака включає в себе ознаку *Bt*, ознаку, відмінну від *Bt* ознаки, або ознаку для RNAi.

Додатковий варіант здійснення стосується способу підвищення стійкості композицій для боротьби зі шкідниками рослин, що передбачає забезпечення композиції для захисту рослин для насінини, рослини або посівної площі, і забезпечення штамів ентомопатогенних грибів, композицій та/або способів, описаних у даному документі, щодо насінини, рослини або посаженої ділянки, де штами ентомопатогенних грибів, композиції та/або способи, описані в даному документі, характеризуються різним механізмом дії, ніж композиція для захисту рослин.

У ще одному додатковому варіанті здійснення необхідне сховище може бути зменшено або усунуто через присутність штамів ентомопатогенних грибів, композицій та/або способів, описаних у даному документі, застосовуваних щодо рослин, які не належать до сховища. В іншому варіанті здійснення сховище може включати штами ентомопатогенних грибів, композиції та/або способи, описані в даному документі, як спреї, приманки або у вигляді іншого механізму дії.

В одному варіанті здійснення композиція, що містить грибковий ентомопатоген і відмінну від *Bt* інсектицидну ознаку, підвищує стійкість до патогену, шкідника або комахи. В іншому варіанті здійснення грибковий ентомопатоген вибраний із групи, яка складається з *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 і *Metarhizium anisopliae* 3213-1, або що складається з нього, або що складається головним чином з нього. В іншому варіанті здійснення відмінна від *Bt* інсектицидна ознака являє собою інсектицидний білок, одержаний з рослини, інсектицидний білок, одержаний з бактерії/археї, що не належить до *Bt* (такий як інсектицидний білок *Pseudomonas*), інсектицидний білок, одержаний з тварини, або елемент сайленсингу. В іншому варіанті здійснення композиція, що містить грибковий ентомопатоген і відмінну від *Bt* інсектицидну ознаку, підвищує стійкість відмінної від *Bt* інсектицидної ознаки. В іншому варіанті здійснення відмінна від *Bt* інсектицидна ознака являє собою поліпептид PIP-72 з публікації за РСТ з реєстраційним номером РСТ/US14/55128. В іншому варіанті здійснення відмінна від *Bt* інсектицидна ознака являє собою елементи сайленсингу, що цілеспрямовано діють на RyanR, HP2 або PAT3 (публікація заявки на видачу патенту США 2014/0275208 і US2015/0257389). В іншому варіанті здійснення відмінна від *Bt* інсектицидна ознака являє собою полінуклеотидний елемент сайленсингу, що цілеспрямовано діє на RyanR (публікація заявки на видачу патенту США 2014/0275208) і поліпептид PIP-72 з публікації за РСТ з реєстраційним номером РСТ/US14/55128.

У додатковому варіанті здійснення даного винаходу композиція, яка підвищує стійкість до патогену, шкідника або комахи, містить грибковий ентомопатоген, такий як штам ентомопатогенного гриба, розкритий в даному документі, та інсектицидну ознаку *Bt*, яка

підвищує стійкість до патогену, шкідника або комахи. Інсектицидна ознака *Bt* може характеризуватися активністю щодо шкідників рослин ряду твердокрилих, таких як *Diabrotica virgifera virgifera*. Композиції, розкриті в даному документі, можуть надавати рослині або частині рослини додаткову або синергічну стійкість до патогену, шкідника або комахи в комбінації з інсектицидною ознакою *Bt*. В одному варіанті здійснення композиція містить грибовий ентомопатоген й інсектицидну ознаку *Bt*, де інсектицидна ознака *Bt* включає в себе токсин Cry3B, розкритий в патентах США з номерами 8101826, 6551962, 6586365, 6593273 і публікації за РСТ WO 2000/011185, токсин mCry3B, розкритий в патентах США з номерами 8269069 і 8513492, токсин mCry3A, розкритий в патентах США з номерами 8269069, 7276583 і 8759620, або токсин Cry34/35, розкритий в патентах США з номерами 7309785, 7524810, 7985893, 7939651 і 6548291, і трансгенні об'єкти, що містять ці інсектицидні токсини *Bt*, та інші активні щодо твердокрилих інсектицидні ознаки *Bt*, наприклад, об'єкт MON863, розкритий в патенті США з номером 7705216, об'єкт MIR604, розкритий в патенті США з номером 8884102, об'єкт 5307, розкритий в патенті США з номером 9133474, об'єкт DAS-59122, розкритий в патенті США з номером 7875429, об'єкт DP-4114, розкритий в патенті США з номером 8575434, об'єкт MON 87411, розкритий в опублікованій заявці на видачу патенту США з номером 2013/0340111 і об'єкт MON88017, розкритий в патенті США з номером 8686230, всі з яких включені в даний документ за допомогою посилання.

Штами ентомопатогенних грибів, композиції на основі ентомопатогенних грибів і способи будуть додатково зрозумілі за допомогою посилання на наступні необмежувальні приклади. Наступні приклади представлені лише для ілюстративних цілей. Приклади включені виключно для полегшення більш повного розуміння описаних варіантів здійснення даного винаходу. Приклади не обмежують обсяг описаних або заявлених у формулі винаходу варіантів здійснення даного винаходу.

ПРИКЛАД 1

Методика біологічного аналізу

Лабораторні біологічні аналізи проводили при використанні очищених культур окремо взятих спор ентомопатогенних грибів з метою ідентифікації штамів, інфекційних щодо *Diabrotica virgifera virgifera*. Личинки другої стадії *D. virgifera virgifera* занурювали в 1×10^7 /мл суспензію кожного штаму грибів на 1-2 хвилини й переносили в чашки Петрі з вологим фільтрувальним папером на 24 години. Личинки другої стадії *D. virgifera virgifera* також занурювали в 0,01% розчин Tween 80 (необроблений контроль), а також в 1×10^7 /мл суспензію ізоляту *Beauveria spp.*, який походив від інфікованих *D. virgifera virgifera* і, як було раніше показано в умовах лабораторії, був інфекційним (позитивний контроль). Обробки позитивного та необробленого контролю служили для підтвердження достовірності кожного біологічного аналізу. Біологічний аналіз вважали достовірним, якщо були відсутні інфіковані личинки в необробленому контролі та були присутні інфіковані личинки в позитивному контролі. Через 24 години личинки в асептичних умовах переносили в чашки Петрі, що містили вологий фільтрувальний папір і три проростки кукурудзи на стадії колеоптилю. Всі штами грибів досліджували в трьох повторностях з 10 личинками на повторність. Чашки Петрі, що містили личинки та проростки кукурудзи, інкубували протягом 14 днів при 25°C, після цього часу личинки досліджували на наявність грибової інфекції. Грибову інфекцію підтверджували за наявності конідій на поверхні загиблих об'єктів (таблиця 1).

Таблиця 1

Біологічний аналіз	Штам	% інфікованих личинок CRW
1	3213-1	50
1	Негативний контроль	0
2	23013-3	26,67
2	15013-1	33,33
2	Негативний контроль	0

Результати біологічного аналізу

Результати лабораторного біологічного аналізу показали, що штами 15013-1, 23013-3 і 3213-1 були інфекційними щодо личинок другої стадії *D. virgifera virgifera*. Біологічні аналізи виконували за відмінної дози, за якої личинок піддавали впливу концентрації спор, яка забезпечувала ідентифікацію високоінфекційних штамів, в той час як штами, які не були високоінфекційними щодо *D. virgifera virgifera*, не приводили до інфекції личинок або приводили до дуже низьких рівнів інфекції личинок. Позитивний контроль приводив до інфекції личинок в

кожному з описуваних біологічних аналізів, а негативний контроль не приводив до інфекції личинок.

ПРИКЛАД 2

Методика біологічного аналізу введення в ґрунт

5 Біологічні аналізи цілих рослин в умовах теплиці проводили з найбільш ефективними штамми ентомопатогенних грибів, ідентифікованими в лабораторних біологічних аналізах. Штами грибів вводили безпосередньо перед саджанням в суміш 50:50 комерційного ґрунту для горщиків і рослинного ґрунту за норми, еквівалентної польовому застосуванню, що становить 2×10^{13} спор/акр. Обробка негативного контролю складалася з ґрунту, в який не вводили спори
10 грибів. Експеримент являв собою повний факторний план з двома факторами (штам та ідіоплазма грибів). Використовуване насіння складалося з докомерційного гібриду кукурудзи DuPont Pioneer або з інсектицидною ознакою (DP-4114, PCT/US10/60818), або рослини дикого типу (без ознаки) того самого генетичного фону без інсектицидної ознаки з активністю щодо *D. virgifera virgifera*. П'ятнадцять окремих насінин гібридної кукурудзи (кожного типу) висаджували в
15 пластикові горщики об'ємом 3,78 л і тримали в теплиці (80°F, 15:9 L:D) і по мірі необхідності поливали. Коли рослини досягали стадії листя V2, їх заражали 100 яйцями *D. virgifera virgifera*, що не перебували в діапаузі. Рослини контролювали щоденно та аналіз завершували через 14 днів після появи першого жука. Число дорослих особин *D. virgifera virgifera*, які з'явилися з кожного горщика, визначали в GH аналогічним чином, як описано в Meihls et al. (2008) PNAS
20 105: 19177-19182. У цих біологічних аналізах появу дорослих особин не оцінювали кількісно; аналіз оцінювали за появи першого жука. По завершенню аналізу рослини зрізали над лінією ґрунту й підраховували загальне число дорослих особин. Потім кореневу грудку промивали і визначали індекс пошкодження вузлів (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (Таблиця 2).

25

Таблиця 2

№ БІОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ GH	ШТАМ	ІНДЕКС CRWNIS WT*	ІНДЕКС CRWNIS DP-4114*	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН WT*	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН DP-4114*
1	15013-1	0,90a	0,15a	8,93b	3,88b
1	Негативний контроль	1,89b	0,62b	21,87a	8,68a
2	23013-3	0,30a	0,05a	1,32a	1,74a
2	Негативний контроль	0,78b	0,20b	4,84b	8,09b
3	3213-1	0,85a	0,17a	Н/Д	Н/Д
3	Негативний контроль	1,68b	0,41b	Н/Д	Н/Д

* Попарні порівняння виконували, порівнюючи кожний штам гриба з негативним контролем з урахуванням кожного генотипу. Використовували критерій множинних порівнянь Даннетта та скоректовані р-значення вважали статистично значущими при менше 0,05. Середні значення з того самого біологічного аналізу GH з різними буквами ("a" або "b") (CRWNIS або поява дорослих особин) в межах гібридного генотипу кукурудзи (WT або DP-4114) були достовірно відмінними (P<0,05).

Статистичний аналіз

30 Пошкодження коренів, вимірюване за допомогою CRWNIS, аналізували окремо для кожного проведеного аналізу, за допомогою процедури MIXED в програмному забезпеченні SAS версії номер 9.4 (SAS Institute Inc., 100 SAS Campus Drive, Кері, Північна Кароліна 27513, США). З метою кращої відповідності допущенням моделі, перед аналізом значення, що спостерігалися, CRWNIS перетворювали з використанням перетворення квадратного кореня.

Використовувану модель можна позначити:

$$y = b + t + g + t * g + \epsilon$$

35 де y означає відповідь, b означає блок/повтор, t означає обробку штаму, g означає генотип, і ϵ означає дисперсію рослина-рослина із залишковою помилкою. Обробку і генотип приймали за

фіксовані ефекти. Всі інші ефекти вважали незалежними нормально розподіленими випадковими змінними із середніми значеннями, що дорівнюють нулю.

Найкращі лінійні незсунені оцінки відзначали для кожної комбінації обробки й генотипу, згідно зі зворотним перетворенням (тобто e^{η}). Попарні порівняння виконували, порівнюючи кожну обробку грибом з контролем із урахуванням кожного генотипу. Використовували критерій множинних порівнянь Даннетта і скоректовані р-значення вважали статистично значущими при менше 0,05. Дані щодо появи жука аналізували окремо для кожного аналізу за допомогою процедури GLIMMIX в програмному забезпеченні SAS версії номер 9.4 (SAS Institute Inc., 100 SAS Campus Drive, Кері, Північна Кароліна 27513, США). Узагальнена лінійна змішана модель відповідала даним, враховуючи розподіл Пуассона для числа появ і логарифмічну функцію зв'язування.

Використовуваний лінійний прогностичний параметр можна позначити:

$$\eta = b + t + g + t * g + p$$

де η означає логарифм числа жуків, що з'явилися, b означає блок/повтор, t означає обробку штаму, g означає генотип, і p означає рослину. Обробку і генотип приймали за фіксовані ефекти. Всі інші ефекти вважали незалежними нормально розподіленими випадковими змінними із середніми значеннями, що дорівнюють нулю.

Оцінки значень для кожної обробки залежно від комбінації генотипів описували за допомогою зворотної зв'язувальної шкали (e^{η}). Попарні порівняння виконували, порівнюючи кожний штаб гриба з контролем з урахуванням кожного генотипу. Використовували критерій множинних порівнянь Даннетта та скоректовані р-значення вважали статистично значущими при менше 0,05. Середні значення з того самого біологічного аналізу GH з різними буквами (CRWNIS або поява дорослих особин) в межах гібридного генотипу кукурудзи (WT або DP-4114) були достовірно відмінними ($P < 0,05$).

Результати біологічного аналізу введення в ґрунт

Усі штами ентомопатогенних грибів, оцінювані в біологічних аналізах 1, 2 і 3 в умовах теплиці, значно знижували ступінь пошкодження коренів в обох генотипах оцінюваної гібридної кукурудзи. Ефективність, що забезпечується кожним з ентомопатогенних грибів при введенні при саджанні, була адитивною без значущого взаємозв'язку з поглядом ефективності щодо комах, при використанні з інсектицидною ознакою або без неї. У біологічних аналізах 1 і 2, де визначали число дорослих жуків, обидва штами при введенні в ґрунт при саджанні значно знижували число дорослих особин *D. virgifera virgifera*, які з'являлися з обох генотипів гібридної кукурудзи без значущого взаємозв'язку, що спостерігався. Застосування цих штамів грибів забезпечувало значущий рівень захисту коренів і зниження появи дорослих особин в результаті безпосередньої смертності *D. virgifera virgifera*, вказуючи на те, що ці гриби є важливими новими засобами для застосування при розробці інтегрованих програм з боротьби зі шкідниками щодо цієї комах. В одному аспекті штами можна застосовувати для підвищення стійкості інсектицидною ознаки.

ПРИКЛАД 3

Біологічні аналізи цілих рослин в умовах теплиці проводили з використанням штаму 15013-1 як біологічної обробки насіння для контролю *D. virgifera virgifera*. Спори грибів застосовували щодо насінини гібридної кукурудзи в лабораторії безпосередньо перед саджанням в суміш 50:50 комерційного ґрунту для горщиків і рослинного ґрунту. Спори грибів суспендували в 10% розчині гуміарабіку (для полегшення прилипання спор до насінини), в який занурювали позбавлене оболонки насіння кукурудзи на 1-2 хвилини. Оцінювані дози для обробки насіння складали 1×10^4 , 1×10^5 і 1×10^6 КУО/насінини. Обробка негативного контролю складалася з насінини, необробленої спорами грибів, і зануреної в 10% розчин гуміарабіку окремо. Експеримент являв собою повний факторний план з двома факторами (обробка насіння та ідіоплазма). Використовуване насіння складалося з докомерційного гібриду кукурудзи DuPont Pioneer або з інсектицидною ознакою (DP-4114, PCT/US10/60818), або рослини дикого типу того самого генетичного фону без інсектицидної ознаки з активністю щодо *D. virgifera virgifera*. П'ятнадцять окремих насінин гібридної кукурудзи (кожного типу) висаджували в пластикові горщики об'ємом 3,78 л і тримали в теплиці (80°F, 15:9 L:D) і по мірі необхідності поливали. Коли рослини досягали стадії листя V2, їх заражали 100 яйцями *D. virgifera virgifera*, що не перебували в діапаузі. Рослини контролювали щоденно та аналіз завершували через 14 днів після появи першого жука. Число дорослих особин *D. virgifera virgifera*, які з'являлися з кожного горщика, визначали в GH аналогічним чином, як описано в Meihls et al. (2008) PNAS 105: 19177-19182. У цих біологічних аналізах появу дорослих особин не оцінювали кількісно; аналіз оцінювали за появи першого жука. Рослини зрізали над лінією ґрунту, потім кореневу грудку промивали і визначали індекс пошкодження вузлів (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, Journal of

Economic Entomology 98: 1-8.) (Таблиця 3). Очікуваний індекс CRWNIS розраховували, як в прикладі 2.

Таблиця 3

ШТАМ	ІНДЕКС CRWNIS WT	ІНДЕКС CRWNIS DP-4114
15013-1 при $\sim 1 \times 10^4$ /насінина	0,53	0,41
15013-1 при $\sim 1 \times 10^5$ /насінина	0,57	0,39
15013-1 при $\sim 1 \times 10^6$ /насінина	0,49	0,35
Необроблений контроль	0,63	0,34

5 **Результати**

Застосування засобів для обробки насіння на основі штаму 15013-1 щодо позбавленого оболонки насіння загалом знижувало ступінь пошкодження коренів, що викликане *D. virgifera virgifera* (таблиця 3). Ступінь поїдання *D. virgifera virgifera* в цьому аналізі в умовах теплиці було незначним. Як результат, ступінь поїдання комахами був найбільший у випадку генотипу кукурудзи без PIP, який сприяв тому, щоб вплив обробки насіння грибами був найбільш видимим. Експериментальне нанесення спор грибів на насіння кукурудзи в цьому прикладі із застосуванням 10% розчину гуміарабіку й одержаних в результаті характеристик, порівнюваних з найбільш ефективними характеристиками, що спостерігалися в прикладі 6 (таблиця 7), вірогідно, знаходилося під впливом застосування обладнання для комерційної обробки насіння та комерційних полімерів, що приводило до більш однорідного й стійкого нанесення спор грибів на насіння кукурудзи.

15 **ПРИКЛАД 4**

Біологічні аналізи цілих рослин в умовах теплиці проводили з використанням штаму 15013-1 як біологічної обробки насіння для контролю *D. virgifera virgifera* окремо та в комбінації з комерційними застосовуваними щодо насіння хімічними речовинами. Насіння гібридної кукурудзи спочатку оброблювали стандартними комерційно доступними застосовуваними щодо насіння інсектицидами й фунгіцидами й надавали можливість висихати. Потім спори грибів вносили безпосередньо перед садженням в суміш 50:50 комерційного ґрунту для горщиків і рослинного ґрунту. Спори грибів суспендували в 10% розчині гуміарабіку (для полегшення прилипання спор до насіння), в який занурювали насіння кукурудзи на 1-2 хвилини. Оцінювані дози для обробки насіння складали 1×10^7 і 1×10^8 КУО/насінина. Обробка негативного контролю складалася з насіння, обробленого 10% розчином гуміарабіку окремо, або насіння із застосовуваними щодо нього хімічних речовин і 10% розчину гуміарабіку. Експеримент являв собою повний факторний план з двома факторами (обробка насіння та ідіоплазма). Використовуване насіння складалося з докомерційного гібриду кукурудзи DuPont Pioneer або з інсектицидною ознакою (DP-4114, PCT/US10/60818), або рослини дикого типу того самого генетичного фону без інсектицидної ознаки з активністю щодо *D. virgifera virgifera*. П'ятнадцять окремих насінин гібридної кукурудзи (кожного типу) висаджували в пластикові горщики об'ємом 3,78 л і тримали в теплиці (80°F, 15:9 L:D) і по мірі необхідності поливали. Коли рослини досягали стадії листя V2, їх заражали 100 яйцями *D. virgifera virgifera*, що не перебували в діапаузі. Рослини контролювали щоденно та аналіз завершували через 14 днів після появи першого жука. Число дорослих особин *D. virgifera virgifera*, які з'являлися з кожного горщика, визначали в GH аналогічним чином, як описано в Meihls et al. (2008) *PNAS* 105: 19177-19182. У цих біологічних аналізах появу дорослих особин не оцінювали кількісно; аналіз оцінювали за появи першого жука. Рослини зрізали над лінією ґрунту і потім кореневу грудку промивали і визначали індекс пошкодження вузлів (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (Таблиця 4). Очікуваний індекс CRWNIS і появу дорослих особин розраховували як в прикладі 2.

Таблиця 4

ШТАМ	ІНДЕКС CRWNIS WT	ІНДЕКС CRWNIS DP-4114	ПОЯВА ДОРОСЛИХ ОСОБИН WT	ПОЯВА ДОРОСЛИХ ОСОБИН DP-4114
15013-1 при $\sim 1 \times 10^7$ /насінина з гуміарабіком	0,53	0,25	1,19	0,42

45

ШТАМ	ІНДЕКС CRWNIS WT	ІНДЕКС CRWNIS DP-4114	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН WT	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН DP-4114
15013-1 при ~1 x 10 ⁸ /насіннина з гуміарабіком	0,61	0,24	1,31	0,43
15013-1 при ~1 x 10 ⁷ /насіннина з гуміарабіком і застосовуваними щодо насіння хімічними речовинами	0,65	0,19	1,06	0,13
15013-1 при ~1 x 10 ⁸ /насіннина з гуміарабіком і застосовуваними щодо насіння хімічними речовинами	0,52	0,17	1,07	0,65
Контроль з гуміарабіком	0,91	0,30	1,12	0,21
Контроль з гуміарабіком і застосовуваними щодо насіння хімічними речовинами	0,55	0,17	0,66	0,18

Результати обробки насіннини

Застосування засобів для обробки насіння на основі штаму 15013-1 знижувало ступінь пошкодження коренів *D. virgifera virgifera* у випадку обох генотипів кукурудзи при застосуванні окремо або в комбінації з хімічними засобами для обробки насіння. Ступінь поїдання *D. virgifera virgifera* в обох з експериментів по обробці насіння в умовах теплиці була незначною. Як результат, ступінь поїдання комахами був найбільший у випадку генотипу кукурудзи без інсектицидної ознаки, яка сприяла тому, щоб вплив кожної обробки насіння був найбільш видимим (таблиця 4). Штам 15013-1, застосований окремо або в комбінації з хімічною обробкою насіння, знижував ступінь поїдання личинками *D. virgifera virgifera* (таблиця 4). Вплив біологічної обробки насіння на появу дорослих особин був більш слабким (таблиця 4). Експериментальне нанесення спор грибів на насіння кукурудзи в цьому прикладі із застосуванням 10% розчину гуміарабіку й одержаних в результаті характеристик, порівнюваних з найбільш ефективними характеристиками, що спостерігалися в прикладі 6 (таблиця 7), вірогідно, знаходилося під впливом застосування обладнання для комерційної обробки насіння та комерційних полімерів, що приводило до більш однорідного й стійкого нанесення спор грибів на насіння кукурудзи.

ПРИКЛАД 5

Методика біологічного аналізу введення в ґрунт

Біологічні аналізи цілих рослин в умовах теплиці проводили з найбільш ефективними штамми ентомопатогенних грибів, ідентифікованими в лабораторних біологічних аналізах. Штами грибів вводили безпосередньо перед саджанням в суміш 50:50 комерційного ґрунту для горщиків і рослинного ґрунту за норми, еквівалентної польовому застосуванню, що становить 2 x 10¹³ КУО/акр. Обробка негативного контролю складалася з ґрунту, в який не вводили спори грибів. Експеримент являв собою повний факторний план з двома факторами (штам і генотип грибів). Використовуване насіння складалося з докомерційного гібриду кукурудзи DuPont Pioneer або з інсектицидною ознакою DP-4114 (DP-4114, US 8575434), DP-4114 x MIR604 (DP-4114, US 8575434), MIR604 (US 8884102), або рослин дикого типу того самого генетичного фону без інсектицидної ознаки з активністю щодо *D. virgifera virgifera*. П'ятнадцять окремих насінин гібридної кукурудзи (кожного типу) висаджували в пластикові горщики об'ємом 3,78 л і тримали в теплиці (80°F, 15:9 L:D) і по мірі необхідності поливали. Коли рослини досягали стадії листя V2, їх заражали 100 яйцями *D. virgifera virgifera*, що не перебували в діапаузі. Рослини

контролювали щоденно та аналіз завершували через 14 днів після появи першого жука. Число дорослих особин *D. virgifera virgifera*, які з'являлися з кожного горщика, визначали в GH аналогічним чином, як описано в Meihls et al. (2008) *PNAS* 105: 19177-19182. У цих біологічних аналізах появу дорослих особин не оцінювали кількісно; аналіз оцінювали за появи першого жука. По завершенню аналізу рослини зрізали над лінією ґрунту й підраховували загальне число дорослих особин (таблиця 5). Потім кореневу грудку промивали і визначали індекс пошкодження вузлів (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (Таблиця 6). Очікуваний індекс CRWNIS і появу дорослих особин розраховували як в прикладі 2.

Таблиця 5

ШТАМ	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН WT*	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН DP-4114*	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН DP-4114xMIR604*	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН MIR604*
15013-1	4,91a	4,44a	4,18a	2,45a
3213-1	4,61a	7,77b	5,10a	7,04a
23013-3	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Негативний контроль	7,18b	9,76b	8,64b	10,75b

* Попарні порівняння виконували, порівнюючи кожний штам гриба з негативним контролем з урахуванням кожного генотипу. Використовували критерій множинних порівнянь Даннетта та скоректовані р-значення вважали статистично значущими при менше 0,05. Середні значення з того самого біологічного аналізу GH з різними буквами ("a" або "b") (CRWNIS або поява дорослих особин) в межах гібридного генотипу кукурудзи (WT або DP-4114) були достовірно відмінними (P<0,05).

10

Таблиця 6

ШТАМ	ІНДЕКС CRWNIS WT*	ІНДЕКС CRWNIS DP-4114*	ІНДЕКС CRWNIS DP-4114xMIR604*	ІНДЕКС CRWNIS MIR604*
15013-1	0,88a	0,20a	0,07b	0,19a
3213-1	0,85a	0,25a	0,03a	0,36a
23013-3	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Негативний контроль	1,47b	0,56b	0,18b	0,73b

* Попарні порівняння виконували, порівнюючи кожний штам гриба з негативним контролем з урахуванням кожного генотипу. Використовували критерій множинних порівнянь Даннетта та скоректовані р-значення вважали статистично значущими при менше 0,05. Середні значення з того самого біологічного аналізу GH з різними буквами ("a" або "b") (CRWNIS або поява дорослих особин) в межах гібридного генотипу кукурудзи (WT, DP-4114, або DP4114*MIR604, або MIR604) були достовірно відмінними (P < 0,05).

Результати біологічного аналізу

Всі штамми ентомопатогенних грибів, оцінювані в біологічному аналізі в умовах теплиці, значно знижували ступінь пошкодження коренів в усіх генотипах оцінюваної гібридної кукурудзи, за винятком 15013-1 при застосуванні щодо DP-4114xMIR604. Однак 15013-1 знижував пошкодження коренів внаслідок поїдання на більше 50% порівняно з продуктом з пірамідованими ознаками DP-4114xMIR604 окремо. Ефективність, що забезпечується кожним з ентомопатогенних грибів при введенні при саджанні, була адитивною без значущого взаємозв'язку з поглядом ефективності щодо комах, при використанні з інсектицидною ознакою або без неї. Всі штамми грибів значно знижували число дорослих жуків *D. virgifera virgifera*, які з'являлися при введенні в ґрунт при саджанні на усіх оцінюваних генотипах гібридної кукурудзи, за винятком 3213-1 при застосуванні щодо DP-4114 окремо. Однак 3213-1 знижував ступінь появи дорослих особин на більше 20% порівняно з DP-4114 окремо. Зниження появи дорослих жуків, яке забезпечувалося кожним з ентомопатогенних грибів при введенні при саджанні, було адитивним без значущого взаємозв'язку при використанні з інсектицидною ознакою або без неї.

25

Застосування цих штамів грибів забезпечувало значущий рівень захисту коренів і зниження появи дорослих особин в результаті безпосередньої смертності *D. virgifera virgifera*, вказуючи на те, що ці гриби є важливими новими засобами для застосування при розробці інтегрованих програм з боротьби зі шкідниками щодо цієї комахи. В одному аспекті штамми можна застосовувати для підвищення стійкості інсектицидною ознаки.

ПРИКЛАД 6

Методика біологічного аналізу комерційної обробки насіння

Біологічні аналізи цілих рослин в умовах теплиці проводили зі штамми ентомопатогенних грибів, ідентифікованими в прикладі 1. Штами грибів застосовували як засоби біологічної обробки насіння при цільовій концентрації $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ КУО/насіння разом зі стандартними комерційними застосовуваними щодо насіння інсектицидами (тіаметоксамом і хлорантраніліпролом), фунгіцидами (азоксистробіном, флудіоксонілом, тіабендазолом, металаксиллом і тебуконазолом) і полімерами. Конідіоспори застосовували у вигляді водного рідкого складу або послідовно у вигляді сухих конідіоспор з полімером для обробки насіння щодо заздалегідь хімічно обробленого насіння. Як склади спор грибів, так і всі застосовувані щодо насіння хімічні речовини застосовували за допомогою комерційного пристрою для протравлювання. Насіння висаджували в суміш 50:50 комерційного ґрунту для горщиків і рослинного ґрунту. Обробка негативного контролю складалася з насіння без спор грибів, але обробленого тими самими стандартними й комерційно доступними застосовуваними щодо насіння інсектицидами, фунгіцидами, барвниками, біологічними препаратами й полімерами. Експеримент являв собою повний факторний план з двома факторами (штам і генотип грибів). Використовуване насіння складалося з докомерційного гібриду кукурудзи DuPont Pioneer або з інсектицидною ознакою DP-4114 (DP-4114, PCT/US10/60818), або рослин дикого типу того самого генетичного фону без інсектицидної ознаки з активністю щодо *D. virgifera virgifera*. П'ятнадцять окремих насінин гібридної кукурудзи (кожного типу) висаджували в пластикові горщики об'ємом 3,78 л і тримали в теплиці (80°F, 15:9 L:D) і по мірі необхідності поливали. Коли рослини досягали стадії листя V2, їх заражали 100 яйцями *D. virgifera virgifera*, що не перебували в діпаузі. Рослини контролювали щоденно та аналіз завершували через 14 днів після появи першого жука. Число дорослих особин *D. virgifera virgifera*, які з'являлися з кожного горщика, визначали в GH аналогічним чином, як описано в Meihls et al. (2008) *PNAS* 105: 19177-19182. У цих біологічних аналізах появу дорослих особин не оцінювали кількісно; аналіз оцінювали за появи першого жука. По завершенню аналізу рослини зрізали над лінією ґрунту й підраховували загальне число дорослих особин (таблиця 7). Потім кореневу грудку промивали і визначали індекс пошкодження вузлів (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (Таблиця 7).

Таблиця 7

ШТАМ	СКЛАД	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН WT*	ПОЯВА ДОРΟΣЛИХ ОСОБИН DP-4114*	ІНДЕКС CRWNIS WT*	ІНДЕКС CRWNIS DP-4114*
15013-1	Рідкий	8,32	6,65	0,56a	0,12a
3213-1	Рідкий	6,99	6,99	0,60a	0,13a
23013-3	Рідкий	10,26	7,72	0,44a	0,16a
15013-1	Для послідовного нанесення	7,84	7,18	0,57a	0,19a
3213-1	Для послідовного нанесення	8,06	8,12	0,56a	0,16a
23013-3	Для послідовного нанесення	9,22	7,13	0,49a	0,25a
Негативний контроль	Н/Д	10,36	7,89	0,82b	0,41b

* Попарні порівняння виконували, порівнюючи кожний штам гриба з негативним контролем з урахуванням кожного генотипу. Використовували критерій множинних порівнянь Даннетта та скоректовані р-значення вважали статистично значущими при менше 0,05. Середні значення з того самого біологічного аналізу GH з різними буквами ("a" або "b") (CRWNIS або поява дорослих особин) в межах гібридного генотипу кукурудзи (WT або DP-4114) були достовірно відмінними (P<0,05).

Результати біологічного аналізу

Всі штами ентомопатогенних грибів, в обох типах складів, оцінювані в біологічному аналізі в умовах теплиці, знижували ступінь пошкодження коренів як у WT, так і в гібридній кукурудзи з ознакою DP-4114, при доставці у вигляді засобу для обробки насіння разом зі стандартними застосовуваними щодо насіння хімічними речовинами. Це було неочікуваним, оскільки ріст і проростання *Metarhizium* spp. значно сповільнювалися в результаті дії всіх застосовуваних щодо насіння кукурудзи фунгіцидів з активністю щодо міцеліальних грибів, як в прикладі 8. Ефективність, що забезпечується кожним з ентомопатогенних грибів при застосуванні у вигляді засобу для обробки насіння, була аддитивною без значущого взаємозв'язку з погляду ефективності комах при використанні з інсектицидною ознакою DP-4114 і без неї. Застосування цих штамів грибів забезпечувало значущі рівні адитивного захисту коренів і в середньому знижувало число дорослих особин, які з'являлися з кожного горщика. Ці дані вказують на те, що гриби є важливими новими засобами для застосування при розробці інтегрованих програм з боротьби зі шкідниками щодо *Diabrotica virgifera virgifera*, та їх можна ефективно доставляти у вигляді засобу для обробки насіння у багатьох типах складів, навіть в присутності фунгіциду, або заздалегідь змішаними у вигляді рідини з фунгіцидом, або застосовних щодо насіння, уже обробленого фунгіцидом.

ПРИКЛАД 7

Методика біологічного аналізу введення в ґрунт

Біологічні аналізи цілих рослин в умовах теплиці проводили з ефективними штамми ентомопатогенних грибів, ідентифікованими в лабораторних біологічних аналізах. Штами грибів вводили безпосередньо перед садженням в суміш 50:50 комерційного ґрунту для горщиків і рослинного ґрунту за норми, еквівалентної польовому застосуванню, що становить 2×10^{13} КУО/акр. Обробка негативного контролю складалася з ґрунту, в який не вводили спори грибів. Експеримент являв собою повний факторний план з двома факторами (штам і генотип грибів). Використовуване насіння складалося з гібридів кукурудзи, або з інсектицидною ознакою, RyanR (DvSSJ1, 2014/0275208 і US2015/0257389), IPD072 (PCT/US14/55128), або рослин того самого генетичного фону без інсектицидної ознаки з активністю щодо *D. virgifera virgifera*. П'ятнадцять окремих насінин гібридної кукурудзи (кожного типу) висаджували в пластикові горщики об'ємом 3,78 л і тримали в теплиці (80°F, 15:9 L:D) і по мірі необхідності поливали. Коли рослини досягали стадії листя V2, їх заражали 100 яйцями *D. virgifera virgifera*, що не перебували в діапаузі. Рослини контролювали щоденно та аналіз завершували через 14 днів після появи першого жука. Число дорослих особин *D. virgifera virgifera*, які з'являлися з кожного горщика, визначали в GH аналогічним чином, як описано в Meihls et al. (2008) PNAS 105: 19177-19182. По завершенню аналізу рослини зрізали над лінією ґрунту й підраховували загальне число дорослих особин (таблиця 8). Потім кореневу грудку промивали і визначали індекс пошкодження вузлів (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, Journal of Economic Entomology 98: 1-8.) (Таблиця 8). Очікуваний індекс CRWNIS і появу дорослих особин розраховували як в прикладі 2.

Таблиця 8

ШТАМ	ІНДЕКС CRWNIS WT*	ІНДЕКС CRWNIS DvSSJ1*	ІНДЕКС CRWNIS IPD072*
15013-1	0,30a	0,05a	0,00a
3213-1	0,34a	0,16b	0,00a
23013-3	0,46a	0,17b	0,00a
Негативний контроль	1,10b	0,12b	0,08b
ШТАМ	ПОЯВА ДОРОСЛИХ ОСОБИН WT*	ПОЯВА ДОРОСЛИХ ОСОБИН DvSSJ1*	ПОЯВА ДОРОСЛИХ ОСОБИН IPD072*
15013-1	10,47a	5,60a	8,07a
3213-1	8,43a	8,33a	9,21b
23013-3	12,42a	8,29a	11,30b
Негативний контроль	18,13b	11,26b	10,27b

* Попарні порівняння виконували, порівнюючи кожний штам гриба з негативним контролем з урахуванням кожного генотипу. Використовували критерій множинних порівнянь Даннетта та скоректовані р-значення вважали статистично значущими при менше 0,05. Середні значення з того самого біологічного аналізу GH з різними буквами ("a" або "b") (CRWNIS або поява дорослих особин) в межах гібридного генотипу кукурудзи (WT, DvSSJ1 або IPD072) були достовірно відмінними (P<0,05).

Результати біологічного аналізу

Всі штами ентомопатогенних грибів, оцінювані в біологічному аналізі в умовах теплиці, значно знижували ступінь пошкодження коренів у всіх генотипах оцінюваної гібридної кукурудзи, за винятком штамів 3213-1 і 23013-3 при застосуванні щодо DvSSJ1. Ефективність, що забезпечується кожним з ентомопатогенних грибів при введенні при саджанні, була адитивною без значущого взаємозв'язку з погляду ефективності щодо комах, при використанні з інсектицидною ознакою або без неї. Усі штами грибів значно знижували число дорослих жуків *D. virgifera virgifera*, які з'являлися при введенні в ґрунт при саджанні на всіх оцінюваних генотипах гібридної кукурудзи, за винятком штамів 3213-1 і 23013-3 при застосуванні щодо IPD072. Однак 3213-1 знижував ступінь появи дорослих особин на 10% порівняно з IPD072 окремо. Зниження появи дорослих жуків, яке забезпечувалося кожним з ентомопатогенних грибів при введенні при саджанні, було адитивним без значущого взаємозв'язку при використанні з інсектицидною ознакою або без неї. Застосування цих штамів грибів забезпечувало значущий рівень захисту коренів і зниження появи дорослих особин в результаті безпосередньої смертності *D. virgifera virgifera* з інсектицидними ознаками на основі білка, що не походить з *Bacillus thuringiensis*, і інсектицидними ознаками для RNAi. З результатів видно, що штами можна застосовувати для підвищення стійкості відмінних від *Bacillus thuringiensis* інсектицидних ознак.

ПРИКЛАД 8

Визначення сприйнятливості до фунгіцидів у *Metarhizium* spp.

Конідії *Metarhizium anisopliae* (15013-1) і *Metarhizium robertsii* (23013-3) одержували в результаті вирощування гриба в планшетах з картопляним агаром з декстрозою протягом 1-2 тижнів при 23°C при безперервному освітленні флуоресцентним світлом. Конідії збирали з планшета у воду, яка містила Tween-20 (0,01%) і підраховували за допомогою гемацитометра. Сприйнятливість до фунгіцидів визначали за допомогою змішування 5000 конідій в 0,5 мл YMA (2 г дріжджового екстракту, 4 г солодового екстракту на літр) рідких середовищ, що містили різні концентрації комерційно доступних фунгіцидів, активних щодо міцеліальних грибів, в 24-лунковому планшеті. Планшети інкубували протягом ~24 годин при 26°C і потім оцінювали ріст за візуальним спостереженням за допомогою стереомікроскопа.

Таблиця 9.

15013-1 (конідії в контролі, "без сполуки" (NC) показані поодинокі довгі проросткові трубочки, >20X діаметр проросткової трубочки. В результаті росту грибів лунка повністю заповнювалась.)

Таблиця 9

	Концентрація фунгіцидів		
	3 мкМ	10 мкМ	30 мкМ
Азоксистробін	++	+	-
Флудіоксоніл	+	+	+
Тіабендазол	++++	++++	++++

"++++" означає ріст на приблизно 50% або більше порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"+++ " означає ріст на приблизно 30% або пригнічення на приблизно 70% порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"++" означає ріст на приблизно 20% або пригнічення на приблизно 80% порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"+" означає ріст на приблизно 10% або пригнічення на приблизно 90% порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"-" означає відсутність росту або повне пригнічення порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

Таблиця 10.

23013-3 (конідії в контролі, "без сполуки" (NC) конідії показали довгі проросткові трубочки, >20X діаметр проросткової трубочки. В результаті росту грибів лунка майже повністю заповнювалась.)

Таблиця 10

	Концентрація фунгіцидів		
	3 мкМ	10 мкМ	30 мкМ
Азоксистробін	+	-	-
Флудіоксоніл	+	+	+
Тіабендазол	+++	++++	++++

"++++" означає ріст на приблизно 50% або більше порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"+++” означає ріст на приблизно 30% або пригнічення на приблизно 70% порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"++” означає ріст на приблизно 20% або пригнічення на приблизно 80% порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"+" означає ріст на приблизно 10% або пригнічення на приблизно 90% порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

"-" означає відсутність росту або повне пригнічення порівняно з контролем без будь-якого фунгіциду.

Результати

5 *M. anisopliae* і *M. robertsii* сприйнятливі до активних інгредієнтів у комерційно доступному фунгіцидному засобі для обробки насіння з відомою активністю щодо міцеліальних грибів (таблиця 9 і таблиця 10).

ПРИКЛАД 9

Відбір штамів *Metarhizium*, стійких до фунгіцидів

10 Виділення штамів грибів, стійких до фунгіцидів, має перевагу в тому, що стійкість до фунгіцидів найбільш часто виникає в результаті однієї точкової мутації в гені, який кодує цей білок, на який націлений фунгіцид. Ця точкова мутація приводить до амінокислотної зміни в білку, що знижує ступінь зв'язування фунгіциду з цільовим білком і надає штам, який несе цю мутацію, високий рівень стійкості до фунгіциду. Ізоляти грибів, стійких до фунгіцидів, відбирали наступним чином. Конідії *Metarhizium* spp. одержували в результаті вирощування гриба в

15 планшетах з картопляним агаром з декстрозою протягом 1-2 тижнів при 23°C при безперервному освітленні флуоресцентним світлом. Конідії збирали, підраховували і розводили до 10000000/мл у воді. Потім конідії піддавали впливу мутагену протягом різних проміжків часу. Наприклад, конідії могли піддавати впливу УФ-світла протягом 0,5-3 хвилин або етилметансульфонату (2-3% протягом 30-60 хвилин). Після впливу мутагену конідії залишали

20 для відновлення й експресії стійкої форми білка за допомогою занурення їх в розтоплену агарозу YMA з низькою температурою плавлення. Планшети інкубували протягом приблизно 24 годин при 26°C. Після періоду відновлення конідії піддавали впливу селективної сполуки (наприклад, азоксистробіну, флудіоксонілу або тіабендазолу) за допомогою накладення на конідії другого шару агарози YMA, що містила селективний фунгіцид. Фунгіцид застосовували

25 при концентрації в приблизно 10 раз вище, ніж мінімальна концентрація, необхідна для пригнічення росту грибів. Планшети, що містили конідії, які вирощували в присутності фунгіциду, потім інкубували протягом 3-10 днів і контролювали періодично на наявність росту грибів. При виявленні колоній, що ростуть, їх асептичним чином видаляли з планшетів для відбору і переносили на нові середовища для росту. Після росту на середовищах без фунгіциду ізоляти досліджували на наявність стійкості до фунгіцидів в результаті впливу на них різних

30 концентрацій фунгіцидів та їх сприйнятливості порівняно зі сприйнятливістю штаму дикого типу. Припускають, що вибраний штам буде характеризуватися більш високою ефективністю в пригніченні патогену, шкідника або комахи рослини в присутності засобу для обробки насіння, що містить фунгіцид, або застосування інших фунгіцидів щодо рослини або частини рослини.

35 ПРИКЛАД 10

Дванадцять досліджуваних ділянок розміщували в областях комерційного вирощування маїсу Північної Америки, де виникають зараження *Diabrotica virgifera virgifera* (WCRW) і *Diabrotica barberi* (NCRW). Місця посадок включали Брукнгс, Північна Дакота; Гудленд, Індіана; Фаулер, Індіана; (2) Джонстон, Айова; Сеймур, Іллінойс; Манкейто, Мінесота; Йорк, Небраска;

40 Графтон, Небраска і Рошель, Іллінойс.

Дослідні господарства включали насіння, оброблене як в прикладі 6, та його висаджували на однорядній ділянці маїсу 10 футів у довжину з проміжком між рядами 30 дюймів. Організовували чотири повтори на обробку в дрібно-ділянковій схемі з генотипом кукурудзи як основного фактора та засобом для обробки насіння як вторинного фактора. Кожне дослідне господарство заражали приблизно 750 яйцями західного кукурудзяного жука на ранній вегетативній стадії та 2 рослини/дослідне господарство викопували й присвоювали CRWNIS. Використовували два гібриди кукурудзи без ознаки. Штами грибів застосовували щодо насіння разом зі стандартними комерційними застосовуваними щодо насіння інсектицидами (тіаметоксамом і хлорантраніліпролом), фунгіцидами (азоксистробіном, флудіоксонілом, тіабендазолом, металаксиллом і тебуконазолом) і полімерами. Норма кожного інсектициду (250 мг активного інгредієнта/насіння) представляла собою позначену норму для контролю визначених вторинних комах-шкідників маїсу. Однак при використуванні нормам жоден зі стандартних інсектицидних засобів для обробки насіння не забезпечував активність щодо кукурудзяного жука. Позитивним контролем засобу для обробки насіння для CRW був PonchoVotivo 1250[®]. По завершенню польового експерименту рослини зрізали над лінією ґрунту, промивали кореневу грудку і визначали CRWNIS (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8).

Статистичний аналіз

Комп'ютерну програму ASReml версії 3.0, доступну з TTRS (Transgenic Trait Research System), використовували для підбирання лінійних змішаних моделей і досліджування різниць, які становлять інтерес. З метою кращої відповідності допущенням моделі, перед аналізом значення, що спостерігалися, CRWINS перетворювали з використанням перетворення квадратного кореня. Накращі лінійні незсунені оцінки відзначали для засобів для обробки насіння після зворотного перетворення. Попарні порівняння виконували серед засобів для обробки насіння, при цьому різниця вважалася статистично значущою, якщо р-значення тестування різниці становило менше 0,05.

Результати

При оцінці активних засобів щодо їх ефективності проти WCRW і NCRW найбільш інформативними локаціями були такі з високим тиском комах (> 1,5 вузлів поїдання CRW). Коли дві локації з польових досліджень 2015 року (Джонстон, Айова і Йорк, Небраска) об'єднували для аналізу, рідкий склад штаму 3213-1, застосований як засіб для обробки насіння щодо генотипу без ознаки, забезпечував статистично значущий захист коренів порівняно з негативним контролем за рівня достовірності 0,05 (фігура 1). Рівень контролю з боку рідкого складу 3213-1 в генотипі без ознаки за високого тиску кукурудзяного жука був статистично подібним ефективності, яку забезпечували за допомогою застосованого на даний час комерційного стандартного засобу для обробки насіння (Poncho Votivo 1250[®]) для контролю кукурудзяного жука (фігура 1). Відносна загальна функціональна активність усіх штамів грибів в обох складах (рідкому і сухому для послідовного нанесення) поліпшувала захист коренів гібридів без ознаки приблизно на 0,25 вузла порівняно з негативним контролем.

Усі публікації, патенти і заявки на видачу патентів, згадані в даному описі, відзначають рівень фахівців в даній галузі, яких стосується даний винахід. Усі публікації, патенти і заявки на видачу патентів включені за допомогою посилання в тій же мірі, як якби кожні окремі публікація, патент або заявка на видачу патенту були конкретно і окремо вказані для включення за допомогою посилання в повному обсязі.

Хоча з метою ясності розуміння вищенаведений винахід був доволі детально описаний за допомогою ілюстрації та прикладу, на практиці можна здійснювати певні зміни та модифікації в межах обсягу формули винаходу, яка додається.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Насіння рослини, оброблене композицією, що містить прийнятний з погляду сільського господарства носій та грибковий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073.

2. Насіння рослини за п. 1, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, ентомопатогенної нематоди, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.

3. Насіння рослини за п. 1, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду та нематоциду.

4. Насіння рослини за п. 3, де агрохімічно активна сполука являє собою фунгіцид.

5. Насіння рослини за п. 4, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.
6. Насіння рослини за п. 1, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавону та модулятора ріанодинового рецептора.
7. Насіння рослини за п. 1, де насіння рослини є генетично модифікованим або трансгенним.
8. Насіння рослини за п. 1, де грибовий ентомопатоген зберігає інсектицидну активність в присутності фунгіциду або є стійким до фунгіциду.
9. Насіння рослини за п. 1, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
10. Насіння рослини за п. 1, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
11. Насіння рослини за п. 1, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
12. Насіння рослини за п. 1, де насіння рослини є генетично модифікованим або трансгенним.
13. Насіння рослини за п. 12, де насіння рослини містить ознаку, де ознака являє собою інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих, що забезпечує контроль шкідника рослин ряду твердокрилих.
14. Насіння рослини за п. 13, де шкідник рослини ряду твердокрилих являє собою шкідника рослин *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barbieri* або *Diabrotica speciosa*.
15. Насіння рослини за п. 12, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, ентомопатогенної нематоди, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.
16. Насіння рослини за п. 12, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду та нематоциду.
17. Насіння рослини за п. 16, де агрохімічно активна сполука являє собою фунгіцид.
18. Насіння рослини за п. 17, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.
19. Насіння рослини за п. 12, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавону та модулятора ріанодинового рецептора.
20. Насіння рослини за п. 13, де генетично модифіковане або трансгенне насіння рослини додатково містить додаткову ознаку, вибрану з групи, яка складається з інсектицидної ознаки та ознаки переносимості гербіцидів.
21. Насіння рослини за п. 12, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
22. Насіння рослини за п. 12, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
23. Насіння рослини за п. 12, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
24. Насіння рослини за п. 13, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою об'єкт, вибраний із групи, яка складається з об'єкта MON863, об'єкта MIR604, об'єкта 5307, об'єкта DAS-59122, об'єкта DP-4114, об'єкта MON 87411 і об'єкта MON88017.
25. Насіння рослини за п. 13, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою відмінну від *Bt* інсектицидну ознаку, вибрану з групи, яка складається з інсектицидного білка та елемента сайленсингу.
26. Насіння рослини за п. 25, де інсектицидний білок вибраний із групи, яка складається з інсектицидного білка, одержаного з рослини, інсектицидного білка, одержаного з бактерії/археї, відмінного від *Bt*, інсектицидного білка, одержаного з тварини, поліпептиду AfIP-1A та/або AfIP-1B, поліпептиду PHI-4, поліпептиду PIP-47, поліпептиду PIP-72, поліпептиду PtIP-50 і поліпептиду PtIP-65, поліпептиду PtIP-83 і поліпептиду PtIP-96.
27. Насіння рослини за п. 25, де елемент сайленсингу націлений на ген, вибраний із групи, яка складається з PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPази, коатомерної субодиниці α , β або γ COPI і RPS10.
28. Інсектицидна композиція, що містить фунгіцид і грибовий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073.
29. Композиція за п. 28, де композиція додатково містить склад для обробки насіння або склад для позакореневого внесення.
30. Композиція за п. 28, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, ентомопатогенної нематоди, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.

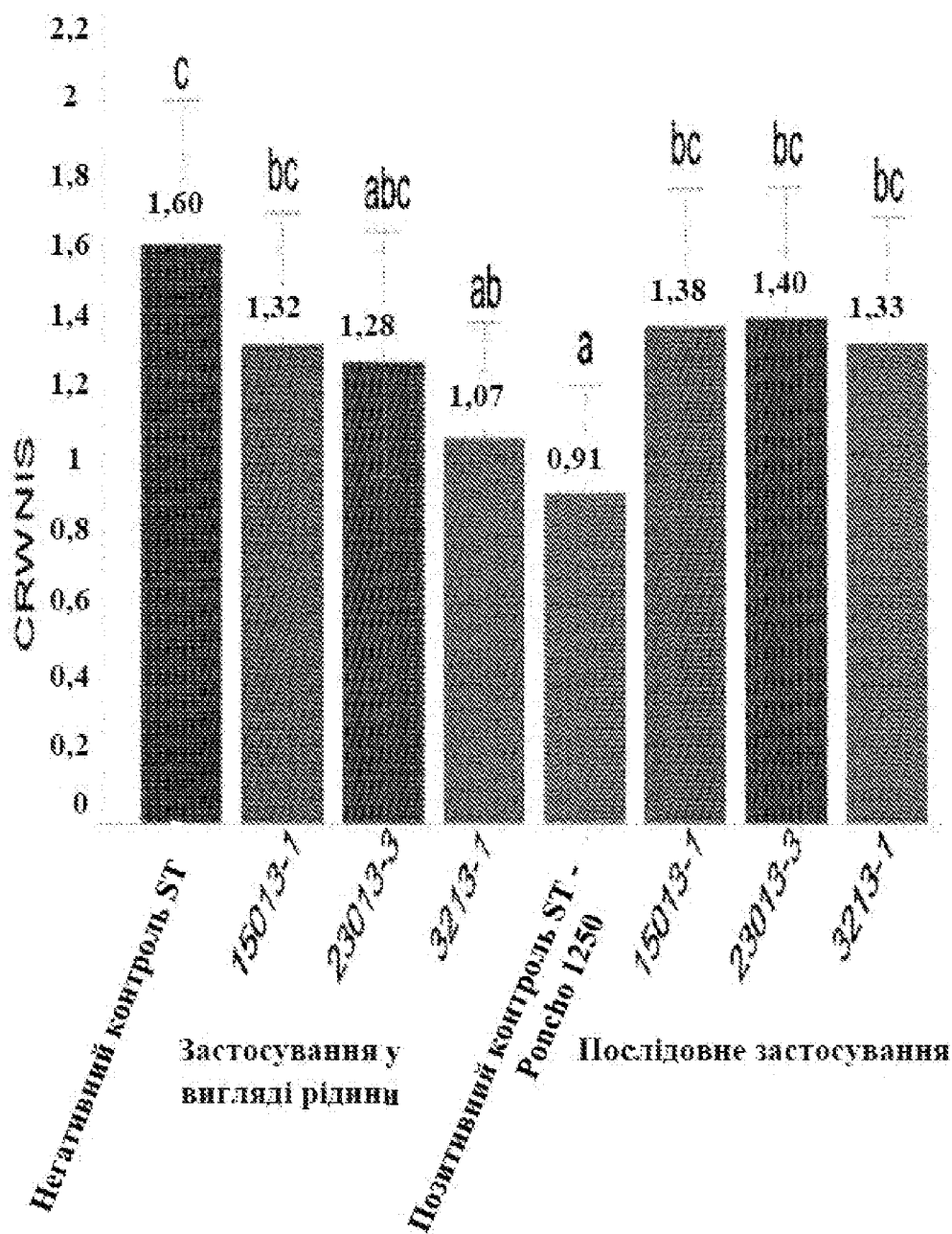
31. Композиція за п. 28, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, бактерициду та нематоциду.
32. Композиція за п. 31, де агрохімічно активна сполука являє собою інсектицид.
33. Композиція за п. 28, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.
34. Композиція за п. 28, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавану та модулятора ріанодинового рецептора.
35. Композиція за п. 28, що додатково містить генетично модифіковану або трансгенну рослину або частину рослини.
36. Композиція за п. 35, де генетично модифікована частина рослини являє собою насінину.
37. Композиція за п. 35, де генетично модифікована частина рослини являє собою лист.
38. Композиція за п. 28, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
39. Композиція за п. 38, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
40. Композиція за п. 38, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
41. Композиція за п. 35, де генетично модифікована або трансгенна рослина або частина рослини містить інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих.
42. Композиція за п. 41, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою об'єкт, вибраний із групи, яка складається з об'єкта MON863, об'єкта MIR604, об'єкта 5307, об'єкта DAS-59122, об'єкта DP-4114, об'єкта MON 87411 і об'єкта MON88017.
43. Композиція за п. 41, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою відмінну від *Bt* інсектицидну ознаку, вибрану з групи, яка складається з інсектицидного білка та елемента сайленсингу.
44. Композиція за п. 43, де інсектицидний білок вибраний із групи, яка складається з інсектицидного білка, одержаного з рослини, інсектицидного білка, одержаного з бактерії/археї, відмінного від *Bt*, інсектицидного білка, одержаного з тварини, поліпептиду AfIP-1A та/або AfIP-1B, поліпептиду PHI-4, поліпептиду PIP-47, поліпептиду PIP-72, поліпептиду PtIP-50 і поліпептиду PtIP-65, поліпептиду PtIP-83 і поліпептиду PtIP-96.
45. Композиція за п. 43, де елемент сайленсингу націлений на ген, вибраний із групи, яка складається з PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPази, коатомерної субодиниці α , β або γ COPI і RPS10.
46. Інсектицидна композиція, що містить грибовий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073, і генетично модифіковану або трансгенну насінину, яка містить відмінну від *Bt* інсектицидну ознаку, де відмінна від *Bt* інсектицидна ознака являє собою інсектицидний білок або елемент сайленсингу.
47. Композиція за п. 46, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, ентомопатогенної нематоїди, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.
48. Композиція за п. 46, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду та нематоциду.
49. Композиція за п. 48, де агрохімічно активна сполука являє собою фунгіцид.
50. Композиція за п. 49, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.
51. Композиція за п. 46, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавану та модулятора ріанодинового рецептора.
52. Композиція за п. 46, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
53. Композиція за п. 46, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
54. Композиція за п. 46, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
55. Композиція за п. 46, де інсектицидний білок вибраний із групи, яка складається з інсектицидного білка, одержаного з рослини, інсектицидного білка, одержаного з бактерії/археї, відмінного від *Bt*, інсектицидного білка, одержаного з тварини, поліпептиду AfIP-1A та/або AfIP-1B, поліпептиду PHI-4, поліпептиду PIP-47, поліпептиду PIP-72, поліпептиду PtIP-50 і поліпептиду PtIP-65, поліпептиду PtIP-83 і поліпептиду PtIP-96.
56. Композиція за п. 46, де елемент сайленсингу націлений на ген, вибраний із групи, яка складається з PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPази, коатомерної субодиниці α , β або γ COPI і RPS10.

57. Спосіб підвищення стійкості рослини до патогену, шкідника або комахи, що передбачає інокуляцію рослини, частини рослини або середовища, яке оточує рослину або частину рослини, композицією, що містить грибовий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073.
- 5 58. Спосіб за п. 57, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, ентомопатогенної нематоди, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.
- 10 59. Спосіб за п. 57, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду та нематоциду.
60. Спосіб за п. 59, де агрохімічно активна сполука являє собою фунгіцид.
61. Спосіб за п. 60, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.
- 15 62. Спосіб за п. 57, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавонолу та модулятора ріанодинового рецептора.
63. Спосіб за п. 57, де рослина, частина рослини або середовище, яке оточує рослину або частину рослини, додатково являють собою генетично модифіковані або трансгенні рослину або частину рослини або середовище, яке оточує генетично модифіковану або трансгенну рослину або частину рослини.
- 20 64. Спосіб за п. 63, де генетично модифікована або трансгенна рослина або частина рослини містить інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих.
65. Спосіб за п. 64, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою ознаку *Bt*, елемент сайленсінгу або відмінний від *Bt* інсектицидний білок.
- 25 66. Спосіб за п. 57, де генетично модифікована частина рослини являє собою насінину.
67. Спосіб за п. 57, де генетично модифікована частина рослини являє собою лист.
68. Спосіб за п. 57, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
69. Спосіб за п. 57, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
- 30 70. Спосіб за п. 57, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
71. Спосіб за п. 65, де інсектицидний білок, відмінний від *Bt*, вибраний із групи, яка складається з інсектицидного білка, одержаного з рослини, інсектицидного білка, одержаного з бактерії/археї, відмінного від *Bt*, інсектицидного білка, одержаного з тварини, поліпептиду AfIP-1A та/або AfIP-1B, поліпептиду PHI-4, поліпептиду PIP-47, поліпептиду PIP-72, поліпептиду PtIP-50 і поліпептиду PtIP-65, поліпептиду PtIP-83 і поліпептиду PtIP-96.
- 35 72. Спосіб за п. 65, де елемент сайленсінгу націлений на ген, вибраний із групи, яка складається з PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPази, коатомерної субодиниці α , β або γ COPI і RPS10.
73. Спосіб за п. 65, де ознака *Bt* являє собою об'єкт, вибраний із групи, яка складається з об'єкта MON863, об'єкта MIR604, об'єкта 5307, об'єкта DAS-59122, об'єкта DP-4114, об'єкта MON 87411 і об'єкта MON88017.
- 40 74. Спосіб підвищення стійкості інсектицидної ознаки щодо ряду твердокрилих генетично модифікованих або трансгенних рослини або частини рослини до патогену, шкідника або комахи, що передбачає інокуляцію генетично модифікованої або трансгенної рослини або частини рослини композицією, що містить грибовий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073, де генетично модифікована або трансгенна рослина або частина рослини містить інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих.
- 45 75. Спосіб за п. 74, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, ентомопатогенної нематоди, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.
76. Спосіб за п. 74, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду та нематоциду.
- 50 77. Спосіб за п. 76, де агрохімічно активна сполука являє собою фунгіцид.
- 55 78. Спосіб за п. 77, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.

79. Спосіб за п. 74, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антитоду, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавоону та модулятора ріанодинового рецептора.
- 5 80. Спосіб за п. 74, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою ознаку *Bt*, елемент сайленсінгу або відмінний від *Bt* інсектицидний білок.
81. Спосіб за п. 74, де генетично модифікована частина рослини являє собою насінину.
82. Спосіб за п. 74, де генетично модифікована частина рослини являє собою лист.
83. Спосіб за п. 74, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
- 10 84. Спосіб за п. 74, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
85. Спосіб за п. 74, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
86. Спосіб за п. 80, де інсектицидний білок, відмінний від *Bt*, вибраний із групи, яка складається з інсектицидного білка, одержаного з рослини, інсектицидного білка, одержаного з бактерії/археї, відмінного від *Bt*, інсектицидного білка, одержаного з тварини, поліпептиду AfIP-1A та/або AfIP-1B, поліпептиду PHI-4, поліпептиду PIP-47, поліпептиду PIP-72, поліпептиду PtIP-15 50 і поліпептиду PtIP-65, поліпептиду PtIP-83 і поліпептиду PtIP-96.
87. Спосіб за п. 80, де елемент сайленсінгу націлений на ген, вибраний із групи, яка складається з PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPази, коатомерної субодиниці α , β або γ COPI і RPS10.
- 20 88. Спосіб за п. 80, де ознака *Bt* являє собою об'єкт, вибраний із групи, яка складається з об'єкта MON863, об'єкта MIR604, об'єкта 5307, об'єкта DAS-59122, об'єкта DP-4114, об'єкта MON 87411 і об'єкта MON88017.
89. Спосіб за п. 57, де композиція додатково містить фунгіцид.
90. Спосіб за п. 89, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, 25 ентомопатогенної нематої, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.
91. Спосіб за п. 89, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, бактерициду та нематоциду.
92. Спосіб за п. 91, де агрохімічно активна сполука являє собою інсектицид.
- 30 93. Спосіб за п. 92, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.
94. Спосіб за п. 89, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антитоду, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавоону та модулятора 35 ріанодинового рецептора.
95. Спосіб за п. 89, де рослина, частина рослини або середовище, яке оточує рослину або частину рослини, додатково являють собою генетично модифіковані або трансгенні рослину, частину рослини або середовище, яке оточує генетично модифіковану або трансгенну рослину або частину рослини.
- 40 96. Спосіб за п. 95, де генетично модифікована або трансгенна рослина або частина рослини містить інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих.
97. Спосіб за п. 96, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою ознаку *Bt*, елемент сайленсінгу або відмінний від *Bt* інсектицидний білок.
98. Спосіб за п. 89, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
- 45 99. Спосіб за п. 89, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
100. Спосіб за п. 89, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
101. Спосіб за п. 97, де інсектицидний білок, відмінний від *Bt*, вибраний із групи, яка складається з інсектицидного білка, одержаного з рослини, інсектицидного білка, одержаного з бактерії/археї, відмінного від *Bt*, інсектицидного білка, одержаного з тварини, поліпептиду AfIP-1A та/або AfIP-1B, поліпептиду PHI-4, поліпептиду PIP-47, поліпептиду PIP-72, поліпептиду PtIP-50 50 і поліпептиду PtIP-65, поліпептиду PtIP-83 і поліпептиду PtIP-96.
102. Спосіб за п. 97, де елемент сайленсінгу націлений на ген, вибраний із групи, яка складається з PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPази, коатомерної субодиниці α , β або γ COPI і RPS10.
- 55 103. Спосіб за п. 97, де ознака *Bt* являє собою об'єкт, вибраний із групи, яка складається з об'єкта MON863, об'єкта MIR604, об'єкта 5307, об'єкта DAS-59122, об'єкта DP-4114, об'єкта MON 87411 і об'єкта MON88017.
104. Спосіб підвищення стійкості відмінної від *Bt* інсектицидної ознаки генетично модифікованих або трансгенних рослини або частини рослини до патогену, шкідника або комахи, що 60 передбачає інокуляцію генетично модифікованої або трансгенної рослини або частини рослини

композицією, що містить грибовий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073, де генетично модифікована або трансгенна рослина або частина рослини містить інсектицидну ознаку щодо ряду твердокрилих.

- 5 105. Спосіб за п. 104, де композиція додатково містить засіб біологічного контролю, вибраний із групи, яка складається з бактерії, гриба, клітини дріжджів, найпростішого, вірусу, ентомопатогенної нематоди, рослинного екстракту, білка, нуклеїнової кислоти, вторинного метаболіту та інокулянту.
106. Спосіб за п. 104, де композиція додатково містить агрохімічно активну сполуку, вибрану з групи, яка складається з інсектициду, фунгіциду, бактерициду та нематоциду.
- 10 107. Спосіб за п. 106, де агрохімічно активна сполука являє собою фунгіцид.
108. Спосіб за п. 106, де фунгіцид передбачає фунгіцидну композицію, вибрану з групи, яка складається з азоксистробіну, тіабендазолу, флудіоксонілу, металаксилу, тебуконазолу, протіокназолу, іпконазолу, пенфлуфену та седаксану.
109. Спосіб за п. 104, де композиція додатково містить сполуку, вибрану з групи, яка складається з антидоту, ліпохітоолігосахариду, триглюкозамінліпогліцинової солі, ізофлавону та модулятора ріанодинового рецептора.
- 15 110. Спосіб за п. 104, де інсектицидна ознака щодо ряду твердокрилих являє собою елемент сайленсингу або відмінний від *Bt* інсектицидний білок.
111. Спосіб за п. 104, де генетично модифікована частина рослини являє собою насінину.
- 20 112. Спосіб за п. 104, де генетично модифікована частина рослини являє собою лист.
113. Спосіб за п. 104, де грибовий ентомопатоген являє собою спору.
114. Спосіб за п. 104, де грибовий ентомопатоген являє собою конідію.
115. Спосіб за п. 104, де грибовий ентомопатоген являє собою мікросклероцій.
116. Спосіб за п. 110, де інсектицидний білок, відмінний від *Bt*, вибраний із групи, яка складається з інсектицидного білка, одержаного з рослини, інсектицидного білка, одержаного з бактерії/археї, відмінного від *Bt*, інсектицидного білка, одержаного з тварини, поліпептиду AfIP-1A та/або AfIP-1B, поліпептиду PHI-4, поліпептиду PIP-47, поліпептиду PIP-72, поліпептиду PtIP-50 і поліпептиду PtIP-65, поліпептиду PtIP-83 і поліпептиду PtIP-96.
- 25 117. Спосіб за п. 110, де елемент сайленсингу націлений на ген, вибраний із групи, яка складається з PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPази, коатомерної субодиниці α , β або γ COPI і RPS10.
118. Інсектицидний грибовий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073.
- 30 119. Інсектицидна композиція, що містить грибовий ентомопатоген *Metarhizium anisopliae* 15013-1, депонований за № Патентного депонування NRRL 67073, та прийнятний з погляду сільського господарства носій.
- 35



Фігура 1