

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201890945 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2018.10.31

(51) Int. Cl. A01N 25/30 (2006.01)  
A01N 63/00 (2006.01)  
A01N 63/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2016.10.07

(54) БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ РАСТЕНИЙ

(31) 62/240,138

(32) 2015.10.12

(33) US

(86) PCT/US2016/055952

(87) WO 2017/066094 2017.04.20

(71) Заявитель:

ПАЙОНИР ХАЙ-БРЕД  
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК.; Е.И. ДЮПОН  
ДЕ НЕМУР ЭНД КОМПАНИ (US)

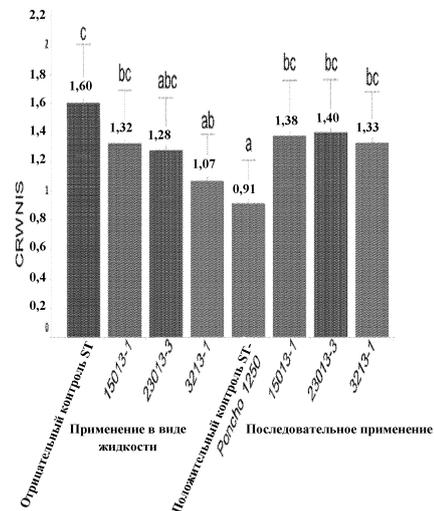
(72) Изобретатель:

Брук Денни Джозеф, Бернс II  
Фредерик С., Преснэйл Джеймс Кевин  
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Штаммы энтомопатогенных грибов, композиции и способы применения штаммов для снижения общего повреждения насекомыми.



201890945 A1

201890945 A1

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОТНОШЕНИИ РАСТЕНИЙ**

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Штаммы энтомопатогенных грибов, композиции на основе энтомопатогенных грибов и способы применения штаммов и композиций для снижения общего повреждения насекомыми.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Существовала давно испытываемая потребность в не оказывающих негативного влияния на окружающую среду композициях и способах контроля или уничтожения насекомых-вредителей сельскохозяйственного значения, т. е. способах, которые являются избирательными, экологически инертными, нестойкими и биоразлагаемыми, и которые хорошо вписываются в схемы контроля насекомых-вредителей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к композиции, содержащей штамм энтомопатогенного гриба, выбранного из *Metarhizium robertsii* и *Metarhizium anisopliae*. В определенных вариантах осуществления грибковый энтомопатоген представляет собой спору, микросклероций или конидию. В некоторых вариантах осуществления грибковый энтомопатоген характеризуется инсектицидной активностью.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции для повышения устойчивости к вредителю, патогену или насекомому-вредителю растения, или для улучшения здоровья и/или урожайности растения, содержащей один или несколько штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073), *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075), *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074) или любой их комбинации. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель и грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 или любой их

комбинации. В дополнительном варианте осуществления грибковый энтомопатоген представляет собой спору, конидию или микросклероций. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей один или несколько штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073), *Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075), *Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074), мутантов этих штаммов, метаболита или комбинации метаболитов, продуцируемых штаммом, раскрытым в данном документе, который характеризуется инсектицидной активностью в отношении растительного вредителя, патогена или насекомого, или любой их комбинации.

В еще одном другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере два штамма энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 или любой их комбинации, в эффективном количестве для достижения эффекта подавления роста растительного патогена, вредителя или насекомого. В другом варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерий, грибов, дрожжей, простейших, вирусов, энтомопатогенных нематод, растительных экстрактов, белков, вторичных метаболитов и инокулянтов.

В другом варианте осуществления композиция содержит грибковый энтомопатоген и одно или несколько агрохимически активных соединений, выбранных из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида. В одном варианте осуществления фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиоконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана. В другом варианте осуществления композиция содержит грибковый энтомопатоген, где грибковый энтомопатоген является устойчивым к фунгициду. В другом варианте осуществления композиция содержит грибковый

энтомопатоген, где грибковый энтомопатоген сохраняет инсектицидную активность в присутствии фунгицида. В еще одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, изофлавонона и модулятора рианодинового рецептора.

В другом варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, дополнительно содержит по меньшей мере одно семя, растение или часть растения. В одном варианте осуществления семя, растение или часть растения представляют собой генетически модифицированные или трансгенные семя, растение или часть растения. В дополнительном варианте осуществления генетически модифицированные или трансгенные семя, растение или часть растения содержат инсектицидный признак, полученный от растения, бактерии, бактерии, отличной от *Bt*, археи, насекомого или животного. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный признак представляет собой инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный признак может включать признак *Bt*, признак, отличный от *Bt*, и/или признак RNAi. В некоторых вариантах осуществления композиции, раскрытые в данном документе, применяют в виде покрытия семени, применения в борозду или внекорневого применения.

В одном варианте осуществления раскрытая композиция контролирует один или несколько растительных патогенов, вредителей или насекомых, или подавляет рост одного или нескольких растительных патогенов, вредителей или насекомых, в том числе без ограничения бактерии, гриба, вируса, простейшего, нематоды или членистоногого. В одном варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, обеспечивает контроль или подавляет рост насекомого, в том числе без ограничения насекомого отряда жесткокрылых, полужесткокрылых или чешуекрылых. В еще одном варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, обеспечивает контроль или подавляет рост *Diabrotica virgifera virgifera*.

В другом варианте осуществления композицию, раскрытую в

данном документе, применяют в эффективном количестве для обеспечения пестицидной активности в отношении бактерий, растений, растительных клеток, тканей и семян. В другом варианте осуществления композицию применяют в эффективном количестве для обеспечения пестицидной активности в отношении насекомых отряда жесткокрылых и чешуекрылых. В еще одном варианте осуществления композицию применяют в эффективном количестве для обеспечения пестицидной активности в отношении *Diabrotica virgifera virgifera*.

В другом варианте осуществления композицию, раскрытую в данном документе, применяют в эффективном количестве для улучшения характеристик растения, в том числе без ограничения усиленного корнеобразования, повышенной корневой массы, улучшенного функционирования корней, увеличенной высоты побегов, улучшенного функционирования побегов, увеличенного присутствия цветочных почек, усиленного образования цветочных почек, усиленного прорастания семян, повышенной урожайности, повышенного общего влажного веса растения и повышенного общего сухого веса растения.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему применение композиции, содержащей один или несколько штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 или любой их комбинации.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему применение композиции, содержащей один или несколько штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 или любой их комбинации, в отношении семени, растения, части растения или почвы в эффективном количестве для достижения эффекта, выбранного из группы, состоящей из подавления растительного патогена, вредителя или насекомого или предупреждения повреждения растения патогеном, вредителем или насекомым, улучшения характеристик растения, повышения

урожайности растения, повышения мощности растения, повышения доступности фосфатов, повышения продукции растительного гормона, усиления корнеобразования, увеличения высоты побегов у растения, увеличения длины листьев у растения, усиления образования цветочных почек у растения, повышения общего сырого веса растения, повышения общего сухого веса растения и усиления прорастания семени.

В еще одном другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу, предусматривающему применение композиции, содержащей по меньшей мере два штамма энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 или любой их комбинации, в отношении семени, растения, части растения или почвы в эффективном количестве для достижения эффекта, выбранного из группы, состоящей из подавления растительного патогена, вредителя или насекомого, предупреждения повреждения растения патогеном, вредителем или насекомым, улучшения характеристик растения, повышения урожайности растения, повышения мощности растения, повышения доступности фосфатов, повышения продукции растительного гормона, усиления корнеобразования, увеличения высоты побегов у растения, увеличения длины листьев у растения, усиления образования цветочных почек у растения, повышения общего сырого веса растения, повышения общего сухого веса растения и усиления прорастания семени.

В другом варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно предусматривают применение композиции, дополнительно содержащей средство биологического контроля, где средство биологического контроля выбрано из группы, состоящей из бактерий, грибов, дрожжей, простейших, вирусов, энтомопатогенных нематод, растительных экстрактов, белков, вторичных метаболитов и инокулянтов.

В еще одном другом варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно предусматривают применение композиции, дополнительно содержащей по меньшей мере два штамма, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium*

*anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 и их комбинаций.

В еще одном другом варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно предусматривают применение композиции, содержащей одно или несколько агрохимически активных соединений, выбранных из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида. В одном варианте осуществления фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиокконазола, ипконазола, пенфлуфена, седаксана. В другом варианте осуществления композиция содержит грибковый энтомопатоген, где грибковый энтомопатоген является устойчивым к фунгициду. В другом варианте осуществления композиция содержит грибковый энтомопатоген, где грибковый энтомопатоген сохраняет инсектицидную активность в присутствии фунгицида.

В еще одном варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно предусматривают применение композиции, дополнительно содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, изофлавонона и модулятора рианодинового рецептора.

В другом варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно предусматривают применение композиции в эффективном количестве для подавления роста растительного патогена, в том числе без ограничения бактерии, гриба, нематоды, насекомого, вируса или простейшего.

В другом варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, дополнительно предусматривают применение композиции в эффективном количестве для обеспечения пестицидной активности в отношении бактерий, растений, растительных клеток, тканей и семян. В другом варианте осуществления композицию применяют в эффективном количестве для обеспечения пестицидной активности в отношении насекомых отряда жесткокрылых, полужесткокрылых и чешуекрылых. В еще одном варианте осуществления композицию применяют в эффективном количестве для обеспечения пестицидной активности в отношении *Diabrotica virgifera virgifera*.

В еще одном варианте осуществления способы, раскрытые в данном документе, относятся к повышению устойчивости инсектицидного признака в отношении отряда жесткокрылых генетически модифицированных или трансгенных семени, части растения или растения к растительному патогену, вредителю или насекомому, предусматривающие инокуляцию генетически модифицированных или трансгенных семени, части растения или растения композицией, содержащей грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1, где генетически модифицированные или трансгенные семя, часть растения или растение содержат инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых.

#### ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**Фигура 1.** Результаты полевого исследования CRWNIS жидкого или последовательного применения составов на основе штаммов 15013-1, 23013-3 и 3213-1 при давлении насекомых.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения не ограничены раскрытыми иллюстративными способами и материалами, и любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным, можно применять при практическом осуществлении или испытании вариантов осуществления настоящего изобретения. Область числовых значений включает числа, определяющие диапазон.

Представленные заголовки не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения, которые могут присутствовать посредством ссылки к настоящему описанию.

Другие определения терминов могут появляться по всему описанию. Необходимо понимать, что варианты осуществления настоящего изобретения не ограничены описанными определенными вариантами осуществления, и дополнительные варианты осуществления могут варьироваться. Также необходимо понимать, что используемая терминология предназначена только для описания вариантов осуществления, и не предполагает ограничительный характер, поскольку объем вариантов осуществления настоящего

изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Формы единственного числа применяются для обозначения одного или нескольких (т. е. по меньшей мере одного) грамматических объектов. Например, "элемент" означает один или несколько элементов.

Используемый в данном документе термин "вводить" относится к действию по введению штамма и/или композиции в окружающую среду для подавления патогена, вредителя или насекомого или для улучшения характеристик растения.

Используемый в данном документе термин "агрохимически активные соединения" относится к любому веществу, которое применяется или может традиционно применяться для лечения растений, в том числе без ограничения фунгицидам, бактерицидам, инсектицидам, акарицидам, нематоцидам, моллюскоцидам, антидотам, регуляторам роста растений и питательным веществам для растений, а также микроорганизмам. Композиции, раскрытые в данном документе, могут содержать фунгициды, которые могут включать без ограничения ингибиторы дыхания, такие как азоксистробин, которые целенаправленно воздействуют на комплекс III митохондриального электронного транспорта; ингибиторы тубулинов, такие как тиабендазол, которые связываются с бета-тубулином; связанный с осмотическим стрессом ингибитор киназы флудиоксонил; ингибитор РНК-полимеразы оомицетов, группы грибоподобных организмов, такой как металаксил; ингибиторы биосинтеза стерола, которые включают ингибиторы C-14 деметилазы пути биосинтеза стерола (обычно называемые ингибиторами деметилазы или DMI), такие как тебуконазол, протиоконазол и ипконазол; ингибитор дыхания, который целенаправленно воздействует на комплекс II митохондриального электронного транспорта, такой как пенфлуфен; ингибитор дыхания, который целенаправленно воздействует на комплекс II митохондриального электронного транспорта, такой как седаксан. Другие классы фунгицидов с различными или аналогичными механизмами действия можно найти по адресу [frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2](http://frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2) (доступ к которому можно получить во

всемирной сети с помощью приставки "www"; см. Hirooka and Ishii (2013), *Journal of General Plant Pathology*). Фунгицид может содержать все или любую комбинацию из различных классов фунгицидов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит азоксистробин, тиабендазол, флудиоксонил и металаксил. В другом варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит тебуконазол. В другом варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит протиокназол, металаксил и пенфлуфен. В другом варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит ипконазол и металаксил. В другом варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит седаксан. Как используется в данном документе, композиция может представлять собой жидкость, гетерогенную смесь, гомогенную смесь, порошок, раствор, дисперсию или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, достаточному для подавления роста патогенного микроорганизма или для задержки скорости роста патогенного микроорганизма. В другом варианте осуществления термин "эффективное количество" относится к количеству штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, достаточному для улучшения характеристик растения. В другом варианте осуществления термин "эффективное количество" относится к количеству штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, достаточному для контроля, уничтожения, подавления или уменьшения числа, появления или роста патогена, вредителя или насекомого. В другом варианте осуществления термин "эффективное количество" относится к количеству штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, достаточному для предотвращения повреждения со стороны патогена, вредителя или насекомого. Специалист в данной области техники поймет, что эффективное количество штамма энтомопатогенного гриба или композиции на

основе энтомопатогенного гриба может не снижать число патогенов, вредителей или насекомых, однако является эффективным в снижении повреждения растений и/или частей растения в результате действия патогена, вредителя или насекомого. Например, пестицидно эффективное количество может снижать появление патогенов, вредителей или насекомых, или повреждение семян, корней, побегов или листвы растений, которые обработаны, по сравнению необработанными.

Используемый в данном документе термин "штамм энтомопатогенного гриба" или "композиция на основе энтомопатогенного гриба" включает без ограничения конидиоспоры, споры, мицелий, микросклероций и/или любую другую стадию жизненного цикла грибкового энтомопатогена.

Используемый в данном документе термин "подавлять" относится к нарушению, предотвращению, ослаблению, противодействию, контролю, снижению, замедлению или иному препятствию росту и выживанию патогена, вредителя или насекомого по сравнению с ростом или выживанием патогена, вредителя или насекомого в необработанном контроле. Любые из терминов подавлять, нарушать, предотвращать, контролировать, снижать, замедлять, препятствовать, противодействовать или ослаблять можно использовать взаимозаменяемо. В одном варианте осуществления термин "подавлять" означает нарушать, предотвращать, контролировать, ослаблять, противодействовать, снижать, замедлять или иным образом препятствовать росту, появлению или выживанию патогена, вредителя или насекомого на по меньшей мере от приблизительно 3% до по меньшей мере приблизительно 100%, или любое значение между ними, например, на по меньшей мере приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с ростом или выживанием патогена, вредителя или насекомого в необработанном контроле. Величину ингибирования можно измерить, как описано в данном документе, или с помощью других способов, известных из уровня техники. Используемое в данном документе выражение "защищает растение от патогена, вредителя или насекомого-вредителя" предназначено для

обозначения ограничения или устранения патогена, вредителя или насекомого, связанных с повреждением растения и/или части растения, например, посредством подавления способности патогена, вредителя или насекомого расти, появляться, питаться и/или размножаться или посредством уничтожения патогена, вредителя или насекомого. Используемый в данном документе термин пестицидная и/или инсектицидная активность относится к активности соединения, композиции и/или способу, который защищает растение и/или часть растения от патогена, вредителя или насекомого.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения подавление патогена, вредителя или насекомого длится или обеспечивает защиту в течение более одного дня, двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, недели, двух недель, трех недель, месяца или дольше после применения штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, раскрытых в данном документе, в отношении исследуемого материала. В другом варианте осуществления подавление патогена, вредителя или насекомого длится от одного до семи дней, от семи до 14 дней, от 14 до 21 дня или от 21 до 30 дней или дольше. В другом варианте осуществления подавление роста патогена, вредителя или насекомого длится или обеспечивает защиту в течение времени, более длительного чем от применения до появления взрослых форм патогена, вредителя или насекомого.

Используемый в данном документе термин "генетически модифицированный" предназначен для обозначения любого вида, содержащего генетический признак, локусы или последовательность, которая не встречается у вида или штамма перед манипуляцией. Генетически модифицированное растение может быть трансгенным, цис-генным, с геномным редактированием или скрещенным с целью получения нового генетического признака, локусов или последовательности. Генетически модифицированное растение можно получить с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, таких как трансформация с помощью бомбардировки, с помощью систем Cas/CRISPR или TALENS или с помощью методик скрещивания. Используемый в данном документе

термин "признак" представляет собой новый или модифицированный локус или последовательность генетически модифицированного растения, в том числе без ограничения трансгенного растения. Признак может придавать генетически модифицированному растению гербицидную устойчивость или устойчивость к насекомому. Используемый в данном документе термин "трансгенное" растение, часть растения или семя относится к растению, части растения или семени, содержащему по меньшей мере один гетерологический ген, который обеспечивает экспрессию полинуклеотида или полипептида, не встречающегося в растении в природе.

Используемый в данном документе термин "среда, окружающая растение или часть растения" предназначен для обозначения пространства, окружающего растение или часть растения, в том числе без ограничения почву, воздух или борозду. Среда, окружающая растение или часть растения, может находиться в непосредственной близости, возле или на том же участке, что и растение или часть растения. Композиции, описанные в данном документе, можно применять в отношении среды, окружающей растение или часть растения, в виде обработки семени, в виде внекорневого применения, в виде гранулярного применения, в виде почвенного применения или в виде инкапсулированного применения. Используемый в данном документе термин "в борозде" предназначен для обозначения пространства в пределах или возле участка, где посажено семя. Композиции, раскрытые в данном документе, можно применять в отношении борозды одновременно или последовательно с семенем. В другом варианте осуществления композиции, раскрытые в данном документе, можно применять последовательно, либо перед либо после посадки семени.

Используемый в данном документе термин "другой механизм действия" относится к пестицидной композиции, контролирующей патоген, вредителя или насекомое посредством пути или рецептора, который отличается от другой пестицидной композиции. Используемый в данном документе термин "другой механизм действия" включает пестицидные эффекты одной или нескольких пестицидных композиций в отношении других участков связывания (т. е. других рецепторов токсинов и/или других участков того же

рецептора токсина) в оболочках кишечника насекомых или посредством пути РНК-интерференции в отношении других целевых генов.

Используемый в данном документе термин "патоген, вредитель или насекомое" включает без ограничения патогенные грибы, бактерии, клещи, иксодовые клещи, патогенные микроорганизмы и нематоды, а также насекомых из отрядов *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* и других, в том числе без ограничения *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Diabrotica speciosa* и *Diabrotica barberi*.

Варианты осуществления настоящего изобретения пригодны при подавлении личинок или взрослых особей отряда жесткокрылые из семейств ложнослоники, зерновки и долгоносики (в том числе без ограничения *Anthonomus grandis* Boheman (долгоносик хлопковый); *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel (долгоносик рисовый водяной); *Sitophilus granarius* Linnaeus (долгоносик амбарный); *S. oryzae* Linnaeus (долгоносик рисовый); *Hypera punctata* Fabricius (долгоносик точечный); *Cylindrocopturus adspersus* LeConte (долгоносик подсолнечниковый стеблевой); *Smicronyx fulvus* LeConte (красный подсолнечниковый долгоносик); *S. sordidus* LeConte (серый подсолнечниковый долгоносик); *Sphenophorus maidis* Chittenden (долгоносик маисовый)); земляные блошки, огуречные листоеды, корневые черви, листоеды, картофельные жуки и листовые минеры семейства Chrysomelidae (в том числе без ограничения *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадский жук); *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (западный кукурузный жук); *D. barberi* Smith and Lawrence (северный кукурузный жук); *D. undecimpunctata howardi* Barber (южный кукурузный жук); *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer (земляная кукурузная блошка); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (блошка крестоцветная); *Phyllotreta striolata* (полосатая блошка); *Colaspis brunnea* Fabricius (листоед виноградный); *Oulema melanopus* Linnaeus (пьявица красногрудая); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (подсолнечниковый листоед)); жуки из семейства Coccinellidae (в

том числе без ограничения *Epilachna varivestis* Mulsant (мексиканская фасолевая коровка)); хрущи и другие жуки из семейства Scarabaeidae (в том числе без ограничения *Popillia japonica* Newman (хрущик японский); *Cyclocephala borealis* Arrow (дупляк северный, хрущ); *C. immaculata* Olivier (дупляк южный, хрущ); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (хрущ европейский); *Phyllophaga crinita* Burmeister (личинка хруща); *Ligyris gibbosus* De Geer (жук морковный)); кожееды семейства Dermestidae; проволочники из семейства Elateridae, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp.; *Conoderus* spp.; *Limonius* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; короеды из семейства Scolytidae и жуки из семейства Tenebrionidae.

Способы измерения пестицидной активности хорошо известны из уровня техники. См., например, 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 и патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте. Как правило, пестицид смешивают и применяют в анализах с поеданием. См., например, Marrone, et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такие анализы могут включать приведение растений в контакт с одним или несколькими вредителями и определение способности растения выживать и/или вызывать гибель вредителей.

Используемый в данном документе термин "растение" относится ко всем растениям, частям растения или популяциям растения, таким как желательные и нежелательные дикорастущие растения, культивары, трансгенные растения и сорта растений (защищенные или незащищенные сортом растений или правами растениеводов). Культивары и сорта растений могут представлять собой растения, полученные с помощью стандартных способов размножения и селекции, которые могут проходить с использованием одного или нескольких биотехнологических способов, или могут быть дополнены таковыми, например, с применением двойных гаплоидов, слияния протопластов, случайного и направленного мутагенеза, молекулярных или генетических маркеров или с помощью способов биоинженерии и генетической инженерии.

Варианты осуществления настоящего изобретения можно в целом применять для любых видов растений, в том числе без ограничения однодольных и двудольных. Примеры растений, представляющих интерес, включают без ограничения кукурузу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (например, *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), в частности виды *Brassica*, пригодные в качестве источников масла из семян растений, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, пеннисетум рогозовидный (*Pennisetum glaucum*), просо культурное (*Panicum miliaceum*), щетинник итальянский (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), разновидности арахиса (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофейное дерево (*Coffea* spp.), кокосовую пальму (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (*Citrus* spp.), шоколадное дерево (*Theobroma cacao*), чайный куст (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), маслину (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамиию (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), разновидности сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* spp.), разновидности овса, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные деревья.

Используемый в данном документе термин "части растения" относится ко всем наземным и подземным частям и органам растений, таким как побег, лист, цветок и корень, тем самым, включены, например, листья, иголки, стволы, ветви, цветки, плодовые тела, плоды и семена, а также корни, корнеплоды, луковицы и корневища. Сельскохозяйственные культуры и материал для вегетативного и генеративного размножения, например, черенки, луковицы, корневища, корнеплоды, побеги и семена также являются частями растения.

Используемый в данном документе термин "спора" включает без ограничения конидиоспоры, споры, мицелий, микросклероций и/или любую другую стадию жизненного цикла грибкового энтомопатогена. "Воздушная конидиоспора" (АС) относится к конидиоспорам, образованным в результате вегетативного цикла развития на поверхности среды с агаром или другим твердом субстрате соответствующего состава. Используемый в данном документе термин "погруженные споры" относится к погруженным конидиоспорам и/или бластоспорам, которые развиваются в жидкой культуре.

Используемый в данном документе термин "жизнеспособный" относится к клетке микроорганизма, пропагуле или споре, которая является метаболически активной и способной к дифференциации. Таким образом, пропагулы, такие как споры, являются "жизнеспособными", когда они находятся в состоянии покоя и способны к прорастанию.

Биологический контроль насекомых-вредителей, имеющих сельскохозяйственное значение, с применением микробного средства, такого как грибы, бактерии или другие виды насекомых, представляет собой не оказывающую негативного влияния на окружающую среду и коммерчески привлекательную альтернативу синтетическим химическим пестицидам. В целом можно сказать, что применение биопестицидов создает меньший риск загрязнения и неблагоприятных воздействий на окружающую среду, и биопестициды обеспечивают специфичность в отношении большего числа мишеней, чем та, которая характерна для традиционных химических инсектицидов широкого спектра действия. Кроме того, зачастую производство биопестицидов стоит дешевле, и вследствие этого улучшается экономически эффективный выход продукции для широкого спектра сельскохозяйственных культур.

Известно, что определенные виды микроорганизмов рода *Bacillus* обладают пестицидной активностью в отношении ряда насекомых-вредителей, в том числе *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* и других. *Bacillus thuringiensis* (Bt) и *Bacillus popilliae* входят в число наиболее успешных средств биологического контроля, обнаруженных на сегодняшний день. Патогенность в отношении насекомых также приписывалась штаммам

*B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* и *B. cereus*. Микробные инсектициды, в частности полученные из штаммов *Bacillus*, сыграли важную роль в сельском хозяйстве как альтернатива химическому контролю вредителей.

Были разработаны сельскохозяйственные культуры с повышенной устойчивостью к насекомым с помощью геной инженерии культурных растений для выработки пестицидных белков *Bacillus*. Например, с помощью геной инженерии были созданы растения кукурузы и хлопчатника с целью выработки пестицидных белков, выделенных из штаммов *Bt* (в данном документе называемых как "признак *Bt*") и/или разработанных на основе таковых. Эти генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры в настоящее время широко применяются в сельском хозяйстве и обеспечили фермера не оказывающей негативного влияния на окружающую среду альтернативой традиционным способам контроля насекомых. Несмотря на то, что они были признаны очень успешными с коммерческой точки зрения, эти генетически модифицированные устойчивые к насекомым культурные растения обеспечивают устойчивость лишь к узкому диапазону экономически важных насекомых-вредителей. В некоторых случаях насекомые могут развивать устойчивость к различным инсектицидным соединениям, что повышает необходимость в идентификации альтернативных средств биологического контроля для контроля вредителей.

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к штаммам энтомопатогенных грибов, композициям на основе энтомопатогенных грибов и способам применения штаммов и композиций. В одном варианте осуществления энтомопатогенные штаммы имеют инсектицидную активность и могут находить применение при подавлении, контроле или уничтожении патогена, вредителя или насекомого, в том числе без ограничения грибов, патогенных грибов, бактерий, клещей, иксодовых клещей, патогенных микроорганизмов и нематод, а также насекомых из отрядов *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera* *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera* и т. д., в частности, *Coleoptera*, в том числе без ограничения

*Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica undecimpunctata howardi* и *Diabrotica barberi*, и для получения композиций с пестицидной активностью.

В одном варианте осуществления штамм(штаммы) энтомопатогенных грибов выбраны из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1 и их комбинаций.

*Metarhizium anisopliae* 15013-1 (NRRL 67073) был депонирован 18 июня 2015 г. в коллекцию культур Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL), 1815 North University Street, Пеория, Иллинойс, 61604, и ему присвоен номер доступа в NRRL 67073. Депозиты были выполнены в соответствии с положениями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

*Metarhizium robertsii* 23013-3 (NRRL 67075) был депонирован 18 июня 2015 г. в коллекцию культур Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL), 1815 North University Street, Пеория, Иллинойс, 61604, и ему присвоен номер доступа в NRRL 67075. Депозиты были выполнены в соответствии с положениями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

*Metarhizium anisopliae* 3213-1 (NRRL 67074) был депонирован 18 июня 2015 г. в коллекцию культур Службы сельскохозяйственных исследований (NRRL), 1815 North University Street, Пеория, Иллинойс, 61604, и ему присвоен номер доступа в NRRL 67074. Депозиты были выполнены в соответствии с положениями Будапештского договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

В одном варианте осуществления раскрыт способ получения продукта на основе грибкового энтомопатогена при жидкой ферментации. В одном варианте осуществления способ предусматривает вначале получение воздушных конидиоспор грибкового энтомопатогена на среде с агаром, после чего инокулирование воздушных конидиоспор в жидкую среду с получением продукта на основе грибкового энтомопатогена. В другом варианте осуществления способ предусматривает вначале получение воздушных

конидиоспор грибкового энтомопатогена на твердом субстрате, в том числе без ограничения на средах с агаром или других твердых средах соответствующего состава, после чего инокулирование воздушных конидиоспор в жидкую среду с получением культуры грибкового энтомопатогена для посева, после чего инокулирование культуры грибкового энтомопатогена для посева в жидкую среду с получением продукта на основе грибкового энтомопатогена. В другом варианте осуществления первая культура грибкового энтомопатогена для посева может быть использована для получения второй культуры грибкового энтомопатогена для посева, где вторая культура для посева используется для инокуляции в жидкую среду с получением продукта на основе грибкового энтомопатогена. Жидкая среда, используемая для получения продукта на основе грибкового энтомопатогена, может содержать минералы, витамины, источник углерода и комбинированный источник азота. В другом варианте осуществления источник азота представляет собой комбинированный источник, который содержит углерод, но не является источником углерода. В одном варианте осуществления раскрыт способ получения продукта на основе грибкового энтомопатогена, содержащего споры, вегетативный мицелий, погруженную споры и/или микросклероций. В одном варианте осуществления композиция содержит продукт ферментации грибкового энтомопатогена, полученный в результате жидкой ферментации. Продукт ферментации может быть высушен посредством в вакууме, высушен распылением или высушен в псевдооживленном слое для применения в целях контроля растительных патогенов, вредителей или насекомых.

В одном варианте осуществления раскрыт способ получения продукта на основе грибкового энтомопатогена при жидкой ферментации, где жидкая ферментация предусматривает жидкую среду, содержащую минералы, витамины, источник углерода и источник азота. В одном варианте осуществления раскрыт способ получения продукта на основе грибкового энтомопатогена в жидкой культуре с применением источника углерода и источника азота. В другом варианте осуществления раскрыт способ получения продукта на основе грибкового энтомопатогена в жидкой культуре с применением двух источников углерода и источника азота. В другом

варианте осуществления раскрыт способ получения продукта на основе грибкового энтомопатогена в жидкой культуре с применением двух или более источников углерода и источника азота. В одном варианте осуществления источником углерода является глюкоза. В другом варианте осуществления источник углерода представляет собой молекулы фруктозы, галактозы, сорбита, сорбозы, сахарозы, арабинозы, мальтодекстрина, рибозы или ксилозы и их комбинации. В другом варианте осуществления первый источник углерода находится в предельной концентрации. В дополнительном варианте осуществления второй источник углерода создает неоптимальное или стрессовое условие, которое изменяет физиологическое состояние грибкового энтомопатогена. В другом варианте осуществления раскрыт способ получения грибкового энтомопатогена в жидкой культуре с применением источника углерода, первого источника азота и второго источника азота, где первый источник азота находится в предельной концентрации.

В другом варианте осуществления раскрыт способ получения грибкового энтомопатогена в жидкой культуре с применением источника углерода и источника азота и контроля параметра ферментации, где контроль параметра ферментации создает неоптимальное или стрессовое условие, которое изменяет физиологическое состояние грибкового энтомопатогена. В одном варианте осуществления параметр ферментации может включать уровень pH, скорость образования диоксида углерода, процент растворенного кислорода, профиль перемешивания, скорость подачи сахара или любой другой измеряемый параметр ферментации грибкового энтомопатогена, который может создавать неоптимальное или стрессовое условие, приводящее в результате к изменению физиологического состояния грибкового энтомопатогена. Физиологические изменения (переключение на вегетативный цикл) могут происходить в результате воздействия стресса или неоптимальных условий на грибковый энтомопатоген. (См. Steyaert et al. (2010), *Microbiol.* и Gao et al. (2007) *Mycol. Res*). В другом варианте осуществления раскрыт способ получения грибкового энтомопатогена в жидкой культуре с применением по меньшей мере двух источников углерода и источника азота и

контроля параметра ферментации, где контроль параметра ферментации создает неоптимальное или стрессовое условие, которое приводит к изменению физиологического состояния грибкового энтомопатогена. В одном варианте осуществления получение воздушных конидиоспор грибкового энтомопатогена предусматривает вначале получение воздушных конидиоспор на среде с агаром или твердофазной среде (Dorta and Arcas (1998), *Enzyme Microb. Technol.*).

В одном варианте осуществления способ получения продукта на основе грибкового энтомопатогена предусматривает получение воздушных конидиоспор (АС), применяемых в качестве инокулята для жидких культур или жидких ферментаций. Такие способы предусматривают без ограничения получение АС в результате инокуляции штамма грибкового энтомопатогена в больших планшетах с картофельным агаром с декстрозой (PDA) или планшетах с VM и инкубирование при 28°C в течение приблизительно 2-3 недель; наполнение планшетов раствором 0,05% Tween 80; и суспендирование АС в растворе в результате осторожного соскабливания поверхности культуры на планшете. В одном варианте осуществления суспензию АС можно фильтровать, и объединять АС до высокой концентрации. В дополнительном варианте осуществления концентрацию АС можно определять с помощью гемоцитометра, при этом АС центрифугируют и осадок АС ресуспендируют с применением раствора 15% глицерина в 0,05% Tween 80. В другом варианте осуществления воздушные конидиоспоры также можно получить с помощью твердофазной ферментации (Dorta and Arcas (1998), *Enzyme Microb. Technol.*).

В одном варианте осуществления получение продукта на основе грибкового энтомопатогена в жидкой культуре может предусматривать объемы сред, составляющие 50 мл при объеме ферментации во встряхиваемой колбе, от 1 л до 2 л при объеме ферментации в настольном режиме и 10 л при объеме ферментации в биореакторе, или в объеме ферментации до 600000 л. Среды для культур для посева или культур для продуцирования могут содержать компоненты, представленные в таблицах 1, 2 и 3. При объеме во встряхиваемой колбе среды можно инокулировать

непосредственно воздушными конидиоспорами (АС) в конечной концентрации приблизительно  $5 \times 10^6$  АС/мл. При объеме в настольном режиме или биореакторе среды можно инокулировать с помощью культуры для посева, составляющей приблизительно 40 мл или 400 мл культуры для посева соответственно. Культуру для посева можно получать для образования биомассы для культуры для продуцирования. Культуры для посева можно получать с помощью дополнительного инкубирования культуры от приблизительно 1 до 7 дней при приблизительно  $28^\circ\text{C}$ , и перемешивания при от приблизительно 100 до 300 об./мин. При добавлении инокулята культуры для продуцирования можно инкубировать от приблизительно 4 до 7 дней при от приблизительно  $16^\circ\text{C}$  до  $32^\circ\text{C}$  в орбитальном шейкере при приблизительно 300 об./мин. при объеме во встряхиваемой колбе; при перемешивании от приблизительно 500 до 1200 об./мин. при объеме в настольном режиме; или при скоростях перемешивания, эквивалентных окружной скорости мешалки в настольном режиме при объеме в биореакторе. В определенных вариантах осуществления во время ферментации можно добавлять воду для снижения вязкости бульона. Давление в ферментационном чане можно установить на уровне от приблизительно 0,5 до 1 бар изб. В определенных вариантах осуществления 50% (вес/вес) раствор фруктозы можно вводить после расходования исходного раствора глюкозы и фруктозы. В определенных вариантах осуществления культура для посева или культура для продуцирования может не иметь рН-контроля, иметь односторонний (с добавлением только основания) рН-контроль или двусторонний (с добавлением основания и кислоты) рН-контроль. Во время ферментации и/или в конце ферментации можно регистрировать ряд параметров, таких как без ограничения образование микросклероция (MS), образование погруженных спор (SS), накопление биомассы, выражаемой посредством грамм сухой массы клеток на килограмм бульона (DCW), скорость образования углерода (CER), скорость захвата кислорода (OUR), растворенный кислород (DO), концентрация аммония, рН, скорость подачи, содержание источника углерода и перемешивание.



	г	75 г	75 г	75 г	75 г	75 г	75 г	75 г	75 г	75 г
D-Фруктоза		37,1 25 г								
D-Галактоза			37,1 25 г							
D-Сорбит				37,1 25 г						
L-Сорбоза					37,1 25 г					
Сахароза						37,1 25 г				
L-Арабиноза							37,1 25 г			
Мальтодекстрин								37,1 25 г		
D-Рибоза									37,1 25 г	
D-Ксилоза										37,1 25 г

\*В некоторых случаях соевую муку замещали другими источниками азота, такими как без ограничения хлопковая мука, дрожжевой экстракт или казаминовые кислоты; в некоторых случаях соотношение углерода (С) и азота (N) составляло 30:1 или 50:1.

В определенных вариантах осуществления извлечение и составление продукта на основе грибкового энтомопатогена (*Metarhizium spp.*) из жидкой культуры предусматривает охлаждение и сбор ферментативного бульона. Ферментер можно ополаскивать приблизительно 1х-2х объемами ферментативного бульона и разведенный бульон объединять с получением чистого бульона. Разведенный материал на основе энтопатогенного гриба в ферментативном бульоне можно обрабатывать добавкой DE. Обработанный ферментативный бульон можно фильтровать через фильтр Бюхнера. Фильтрационный осадок можно обрабатывать незамедлительно или можно хранить в холодной комнате до обработки. Влажный фильтрационный осадок можно разломать и высушить в вакуумной сушилке в течение от приблизительно 48 ч. до 5 дней. Высушенный фильтрационный осадок можно измельчать с получением конечного порошкообразного продукта на основе

энтомопатогенного гриба.

Один вариант осуществления относится к композиции, содержащей, или состоящей из, или состоящей, по сути, из штамма энтомопатогенного гриба, выбранного из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1. В другом варианте осуществления композиция содержит, состоит из или состоит, по сути, из по меньшей мере двух или более штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3, *Metarhizium anisopliae* 3213-1. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит, состоит из или состоит, по сути, из штаммов энтомопатогенных грибов, выбранных из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1. В одном варианте осуществления композиция представляет собой биологически чистую культуру *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1 и их комбинаций.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к композиции, содержащей штаммы энтомопатогенных грибов, раскрытых в данном документе, и одно или несколько соединений или средств, выбранных из группы, состоящей из агрохимически активных соединений, средств биологического контроля, соединений на основе липохитоолигосахаридов (LCO), изофлавонов, хиназолинов, инсектицидных соединений, азолпиримидиниламинов, полимерных соединений, ионных соединений, замещенных тиофенов, замещенных дитиенов, флуопирама, соединений на основе енаминокарбонила, соединений на основе стриголактона и соединений на основе дитиено-тетракарбоксимидов и их комбинаций.

Дополнительный вариант осуществления относится к применению первой композиции, содержащей штаммы энтомопатогенных грибов, раскрытые в данном документе, и второй композиции, содержащей одно или несколько соединений или средств, выбранных из группы, состоящей из агрохимически активных соединений, средств биологического контроля, соединений на основе липохитоолигосахаридов (LCO), изофлавонов, хиназолинов,

инсектицидных соединений, азолпиримидиниламина, полимерных соединений, ионных соединений, замещенных тиофенов, замещенных дитиинон, флуопирама, соединений на основе енаминокарбонила, соединений на основе стриголактона и соединений на основе дитиино-тетракарбоксимиды и их комбинаций.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей один или несколько штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытые в данном документе, и одно или несколько средств биологического контроля. Используемый в данном документе термин "средство биологического контроля" ("BCA") включает бактерии, грибы или дрожжи, простейшие, вирусы, энтомопатогенные нематоды и растительные экстракты или продукты, продуцируемые микроорганизмами, в том числе белки или вторичные метаболиты, и инокулянты, которые имеют одну или обе из следующих характеристик: (1) подавляет или уменьшает заражение растения и/или рост патогенов, вредителей или насекомых, включая без ограничения патогенные грибы, бактерии и нематоды, а также членистоногих вредителей, таких как насекомые, паукообразные, губоногие, диплоподы, или подавляет заражение растения и/или рост комбинации патогенов растения, вредителей или насекомых; (2) улучшает характеристики растения; (3) повышает урожайность растения; (4) увеличивает мощность растения и (5) улучшает здоровье растения.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей штамм энтомопатогенного гриба, раскрытый в данном документе, и агрохимически активное соединение. Агрохимически активные соединения представляют собой вещества, которые применяют или можно применять для обработки или применения в отношении семени, растения, части растения или среды, окружающей семя или растение или часть растения, в том числе без ограничения фунгициды, бактерициды, инсектициды, акарициды, нематоциды, моллюскоциды, антитоксичные, регуляторы роста растений, питательные вещества для растений, химические молекулы с известным механизмом действия, дополнительные микроорганизмы и средства биологического контроля.

В одном варианте осуществления композиция, раскрытая в данном документе, содержит одно или несколько агрохимически активных соединений, где одно соединение представляет собой хлорантранилипрол (Rynaxypyr®). В другом варианте осуществления композиция содержит одно или несколько агрохимически активных соединений, где одно соединение представляет собой циантранилипрол (Cyazypyr®). В другом варианте осуществления композиция содержит как хлорантранилипрол, так и циантранилипрол.

В одном варианте осуществления первую и вторую композицию, раскрытые в данном документе, можно применять в отношении семени в одно и то же время. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении семени второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении семени первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении растения второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении растения первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении части растения второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении части растения первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении среды, окружающей семя, второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении среды, окружающей семя, первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении семени с последующим применением в отношении среды, окружающей растение, второй





окружающей растению, второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении части растения с последующим применением в отношении среды, окружающей растению, первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении части растения с последующим применением в отношении среды, окружающей часть растения, второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении части растения с последующим применением в отношении среды, окружающей часть растения, первой композиции.

В одном варианте осуществления первую и вторую композицию, раскрытые в данном документе, можно применять в отношении среды, окружающей семя, в одно и то же время. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении среды, окружающей семя, с последующим применением в отношении среды, окружающей семя, второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении среды, окружающей семя, с последующим применением в отношении среды, окружающей семя, первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении среды, окружающей семя, с последующим применением в отношении семени второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении среды, окружающей семя, с последующим применением в отношении семени первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении среды, окружающей семя, с последующим применением в отношении части растения второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении среды, окружающей семя, с последующим применением в отношении части растения первой композиции. В





варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении среды, окружающей часть растения, с последующим применением в отношении растения первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении среды, окружающей часть растения, с последующим применением в отношении среды, окружающей семя, второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении среды, окружающей часть растения, с последующим применением в отношении среды, окружающей семя, первой композиции. В другом варианте осуществления первую композицию можно применять в отношении среды, окружающей часть растения, с последующим применением в отношении среды, окружающей часть растения, второй композиции. В еще одном другом варианте осуществления вторую композицию можно применять в отношении среды, окружающей часть растения, с последующим применением в отношении среды, окружающей растение, первой композиции.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытых в данном документе, с композицией, содержащей инсектицидный белок из *Pseudomonas* sp., такой как PSEEN3174 (Monalysin; (2011) *PLoS Pathogens* 7:1-13); из *Pseudomonas protegens* штамма СНА0 и Pf-5 (панее *fluorescens*) (Pechy-Tarr, (2008) *Environmental Microbiology* 10:2368-2386; № доступа в GenBank EU400157); из *Pseudomonas taiwanensis* (Liu, et al., (2010) *J. Agric. Food Chem.*, 58:12343-12349) и из *Pseudomonas pseudoalcligenes* (Zhang, et al., (2009) *Annals of Microbiology* 59:45-50 и Li, et al., (2007) *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 89:159-168); инсектицидные белки из *Photorhabdus* sp. и *Xenorhabdus* sp. (Hinchliffe, et al., (2010) *The Open Toxicology Journal*, 3:101-118 и Morgan, et al., (2001) *Applied and Envir. Micro.* 67:2062-2069); патента США № 6048838 и патента США № 6379946; полипептид PIP-1 из публикации заявки на патент США US20140007292; полипептид AfIP-1A и/или AfIP-1B из публикации заявки на патент США US20140033361; полипептид PHI-4 из документа с серийным номером США 13/839702; полипептид PIP-47 из

публикации согласно РСТ с регистрационным номером РСТ/US14/51063; полипептид PIP-72 из публикации согласно РСТ с регистрационным номером; полипептид PtIP-50 и полипептид PtIP-65 из публикации согласно РСТ с номером WO2015/120270; полипептид PtIP-83 из публикации согласно РСТ с номером WO2015/120276; полипептид PtIP-96 из публикации согласно РСТ с регистрационным номером РСТ/US15/55502; РСТ/US14/55128 и  $\delta$ -эндотоксины, в том числе без ограничения гены  $\delta$ -эндотоксина классов 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 и Cry55 и гены цитолических токсинов Cyt1 и Cyt2 *B. thuringiensis*. Другие белки Cry хорошо известны специалисту в данной области техники (см. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011), на сайте по адресу [lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), доступ к которому можно получить во всемирной сети с использованием приставки "www"). Инсектицидная активность белков Cry хорошо известна специалисту в данной области техники (для обзора см. van Frankenhuyzen, (2009) *J. Invert. Path.* 101:1-16). Применение белков Cry в качестве признаков трансгенного растения хорошо известно специалисту в данной области техники, и трансгенные растения с Cry, в том числе без ограничения с Cry1Ac, Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1F, Cry1Fa2, Cry1F+Cry1Ac, Cry2Ab, Cry3A, mCry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Vip3A, mCry3A, Cry9c и CBI-Bt, были разрешены контролирующими органами (см. Sanahuja, (2011) *Plant Biotech Journal* 9:283-300 и CERA (2010) GM Crop Database Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. на сайте по адресу [cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database), доступ к которому можно получить во всемирной сети с применением приставки "www"). Используемый в данном документе термин "отличный от Bt признак" относится к любому инсектицидному гену

или признаку в растении, полученным или модифицированным из встречающихся в природе бактерии, растения или животного, за исключением любого штамма *Bacillus thuringiensis*. Отличные от *Bt* признаки включают без ограничения признаки RNAi или dsRNA, полученный от *Pseudomonas* признак или признак, полученный от растения.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытых в данном документе, с признаком RNAi, содержащим конструкцию сайленсинга из одного или нескольких полинуклеотидов, представляющих интерес, приводящих к подавлению одного или нескольких целевых полипептидов патогенов, вредителей или насекомых. Под "элементом сайленсинга" подразумевается полинуклеотид, который при контакте с насекомым или поглощении им, способен снижать уровень экспрессии или устранять экспрессию целевого полинуклеотида или полипептида, кодируемого им. Используемый элемент сайленсинга может снижать уровень экспрессии или устранять экспрессию целевой последовательности путем влияния на уровень целевого РНК-транскрипта или, в качестве альтернативы, путем влияния на трансляцию и, за счет этого воздействуя на уровень кодируемого полипептида. Элементы сайленсинга могут включать без ограничения смысловой элемент супрессии, антисмысловый элемент супрессии, двунитевую РНК, siRNA, amiRNA, miRNA или шпилечный элемент супрессии.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытых в данном документе, с композицией, содержащей молекулы нуклеиновой кислоты, в том числе элементы сайленсинга для целенаправленного воздействия на Н-субъединицу вакуолярной АТФазы, пригодной для контроля популяции жесткокрылых-вредителей и заражения, как описано в публикации заявки на патент США 2012/0198586. В публикации согласно РСТ WO 2012/055982 описана рибонуклеиновая кислота (РНК или двухнитевая РНК), которая подавляет или обеспечивает понижающую регуляцию целевого гена, который кодирует: рибосомальный белок насекомого, такой как рибосомальный белок L19, рибосомальный белок L40 или

рибосомальный белок S27A; субъединицу протеасомы насекомого, такую как белок Rpn6, Pros 25, белок Rpn2, белок бета 1 субъединицы протеасомы или белок бета 2 Pros;  $\beta$ -коатомер COPI-везикулы насекомого,  $\gamma$ -коатомер COPI-везикулы,  $\beta'$ -коатомерный белок или  $\zeta$ -коатомер COPI-везикулы; белок тетраспанин 2 А насекомого, который представляет собой предполагаемый белок трансмембранного домена; белок насекомого, принадлежащий к семейству актина, такой как актин 5C; белок убиквитин-5E насекомого; белок Sec23 насекомого, который представляет собой активатор ГТФазы, вовлеченной во внутриклеточный транспорт белков; белок "crinkled" насекомого, который представляет собой нестандартный миозин, который вовлечен в двигательную активность; белок "crooked neck" насекомого, который вовлечен в регуляцию ядерного альтернативного сплайсинга мРНК; белок G-субъединицы вакуолярной H<sup>+</sup>-АТФазы насекомого и Tbr-1 насекомого, такой как Tat-связывающий белок. В публикации согласно РСТ WO 2007/035650 описана рибонуклеиновая кислота (РНК или двухнитевая РНК) которая подавляет или понижающе регулирует экспрессию целевого гена, кодирующего Snf7. В публикации заявки на патент США 2011/0054007 описаны полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на RPS10. В публикациях заявки на патент США 2014/0275208 и US2015/0257389 описаны полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на RyanR и PAT3. В публикациях согласно РСТ WO 2016/060911, WO 2016/060912, WO 2016/060913 и WO 2016/060914 описываются полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на молекулы нуклеиновой кислоты субъединицы коатомера COPI, которые обеспечивают устойчивость к вредителям, относящимся к отрядам жесткокрылых и полужесткокрылых. В международной заявке с номером РСТ/US2016/037748 описаны полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на VgR, MAEL, NCLB и BOULE, которые контролируют насекомых-вредителей из отряда жесткокрылых. В публикациях заявок на выдачу патентов США 2012/029750, US 20120297501 и 2012/0322660 описаны

интерферирующие рибонуклеиновые кислоты (РНК или двухнитевая РНК), которые функционируют при поглощении видами насекомых-вредителей с понижающей регуляцией экспрессии целевого гена в указанном насекомом-вредителе, где РНК содержит по меньшей мере один элемент сайленсинга, где элемент сайленсинга представляет собой участок двухнитевой РНК, содержащий гибридные комплементарные нити, из которых одна нить содержит или состоит из последовательности нуклеотидов, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой нуклеотидной последовательности в пределах целевого гена. В публикации заявки на патент США 2012/0164205 описаны потенциальные мишени для интерферирующих двухнитевых рибонуклеиновых кислот для подавления беспозвоночных вредителей, в том числе гомологичная последовательность Chd3, гомологичная последовательность бета-тубулина, гомологичная последовательность весом 40 кДа V-АТФазы, гомологичная последовательность EF1 $\alpha$ , гомологичная последовательность субъединицы р28 протеосомы 26S, гомологичная последовательность эпоксидгидролазы ювенильного гормона, гомологичная последовательность белка хлоридных каналов, зависящих от набухания, гомологичная последовательность белка глюкоза-6-фосфат-1-дегидрогеназы, гомологичная последовательность белка Act42A, гомологичная последовательность фактора 1 АДФ-рибозилирования, гомологичная последовательность белка фактора транскрипции IIB, гомологичные последовательности хитиназы, гомологичная последовательность фермента, конъюгирующего убиквитин, гомологичная последовательность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гомологичная последовательность убиквитина В, гомолог эстеразы ювенильного гормона и гомологичная последовательность альфа-тубулина.

Один вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает дополнительный компонент, который может представлять собой носитель, вспомогательное средство, солюбилизующее средство, суспендирующее средство, разбавитель, поглотитель кислорода, антиоксидант, питательное вещество, средство, предохраняющее от загрязнения, или их комбинации.

В другом варианте осуществления дополнительный (дополнительные) компонент (компоненты) может (могут) требоваться для применения, в отношении которого штамм или композицию предполагается использовать. Например, если штамм или композицию предполагается использовать на или в сельскохозяйственном продукте, дополнительный (дополнительные) компонент (компоненты) может (могут) представлять собой приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель, наполнитель или разбавитель. Аналогично, если штамм или композицию предполагается использовать на или в продукте питания, дополнительный (дополнительные) компонент (компоненты) может (могут) представлять собой съедобные носитель, наполнитель или разбавитель.

В одном аспекте одним или несколькими дополнительными компонентами являются носитель, наполнитель или разбавитель.

"Носители" или "среды-носители" означают материалы, пригодные для введения соединений и включают любой такой материал, известный из уровня техники, такой как, например, любую жидкость, гель, растворитель, жидкий разбавитель, солибилизатор и т.п., который является нетоксичным и не взаимодействует с какими-либо компонентами композиции с разрушительным характером.

Примеры приемлемых для применения в пищу носителей включают, например, воду, солевые растворы, спирт, силикон, воски, вазелиновое масло, растительные масла, полиэтиленгликоли, пропиленгликоль, липосомы, сахара, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, поверхностно-активные вещества, кремниевую кислоту, вязкий парафин, парфюмерное масло, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, сложные эфиры нефтяных жирных кислот, гидроксиметиллцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Примеры наполнителей включают без ограничения микрокристаллическую целлюлозу и другие целлюлозы, лактозу, цитрат натрия, карбонат кальция, двухзамещенный фосфорнокислый кальций, глицин, крахмал, молочный сахар и высокомолекулярные полиэтиленгликоли.

Примеры разбавителей включают без ограничения воду, этанол, пропиленгликоль и глицерин и их комбинации.

Дополнительные компоненты можно применять одновременно со штаммом энтомопатогенного гриба и/или композицией на основе энтомопатогенного гриба, раскрытыми в данном документе (например, в случае, если они находятся в примеси совместно или даже в случае, если их доставляют различными путями) или последовательно (например, их можно доставлять различными путями).

Штамм энтомопатогенного гриба и/или композиция на основе энтомопатогенного гриба, раскрытая в данном документе, и/или ее разбавитель могут также содержать хелатирующие средства, такие как EDTA, лимонная кислота, винная кислота и т. д. Кроме того, штамм энтомопатогенного гриба и/или композиция на основе энтомопатогенного гриба, раскрытая в данном документе, и/или ее разбавитель могут содержать активные средства, выбранные из сложных эфиров жирных кислот, таких как моно- и диглицериды, неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты, фосфолипиды и т. д. Штамм энтомопатогенного гриба и/или композиция на основе энтомопатогенного гриба, раскрытая в данном документе, и/или ее разбавитель могут также содержать эмульгаторы, которые могут повышать стабильность штамма энтомопатогенного гриба и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба, особенно после разбавления.

Штамм энтомопатогенного гриба и/или композицию на основе энтомопатогенного гриба, раскрытую в данном документе, можно применять в любой подходящей форме, либо при применении отдельно, либо при присутствии в композиции. Штамм энтомопатогенного гриба и/или композицию на основе энтомопатогенного гриба, раскрытую в данном документе, можно составлять любым подходящим образом для обеспечения того, что композиция содержит активный штамм энтомопатогенного гриба.

Штамм энтомопатогенного гриба и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба могут находиться в форме сухого порошка, который может быть разбрызган на продукт или смешан с продуктом. Штамм энтомопатогенного гриба и/или композиции на основе

энтомопатогенного гриба вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытые в данном документе, в форме сухого порошка, могут включать добавку, такую как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь, желатин, крахмал, лактоза, альгиновая кислота, Primojel® или кукурузный крахмал (который можно применять в качестве разрыхлителя).

В еще одном другом варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба, раскрытые в данном документе, могут быть высушены распылением, ферментированы и ресуспендированы в H<sub>2</sub>O до значения процентного содержания, выбранного из следующего: 0,05-1, 1-3, 3-5, 5-7, 7-10, 10-15, 15-20 и более 20%. В другом варианте осуществления стадию осветления можно выполнять перед сушкой распылением.

В одном варианте осуществления композиции, раскрытые в данном документе, могут содержать суспензию пропагул, таких как споры, из штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытых в данном документе. В одном варианте осуществления суспензия пропагул, таких как споры, может находиться в диапазоне от  $1 \times 10^2$  до  $1 \times 10^{14}$  КОЕ/мл.

В одном варианте осуществления композиции, раскрытые в данном документе, могут содержать концентрированные высушенные пропагулы, такие как споры, из штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытых в данном документе. В одном варианте осуществления концентрированные высушенные споры могут находиться в диапазоне от  $1 \times 10^2$  до  $1 \times 10^{14}$  КОЕ/г.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба, раскрытые в данном документе, можно применять во влажной или частично или полностью высушенной форме или в форме взвеси, геля или другой формы.

В по меньшей мере некоторых вариантах осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба можно сублимировать или лиофилизировать. В по меньшей мере некоторых вариантах осуществления штаммы

энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба можно смешивать с носителем. Носитель включает без ограничения сыворотку, мальтодекстрин, сахарозу, декстрозу, известняк (карбонат кальция), рисовую шелуху, дрожжевую культуру, сухой крахмал, глину и натриевокремниевый алюминат. Однако необходимость в сублимации штаммов до их применения отсутствует. Штаммы можно также применять с консервантами или без них и в концентрированной, неконцентрированной или разбавленной форме. В одном варианте осуществления штаммы могут находиться в форме осадка или биологически чистого осадка.

Штамм энтомопатогенного гриба и/или композицию на основе энтомопатогенного гриба, описанную в данном документе, можно добавлять к одному или нескольким носителям. При использовании носитель (носители) и штаммы можно добавлять к ленточной или лопастной мешалке и смешивать в течение приблизительно 15 минут, однако время можно увеличивать или уменьшать. Компоненты смешивают таким образом, что получают однородную смесь культуры и носителя (носителей). Конечный продукт предпочтительно представляет собой сухой сыпучий порошок.

В одном варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба можно составлять в форме жидкости, сухого порошка или гранулы. Сухой порошок или гранулы можно получить с помощью средств, известных специалистам в данной области техники, таких как в глазировочной машине с псевдооживленным слоем и распылением в верхней части, в Wurster с распылением в нижней части или путем барабанной грануляции (например, грануляции с высокой скоростью сдвига), экструзия, дражирование или в мешалке с микроингредиентами.

В другом варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба можно получать в виде высушенного распылением или сублимированного порошка.

В еще одном другом варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба находятся в жидком составе. Такой жидкий

состав может содержать одно или несколько из следующего: буфер, соль, сорбит и/или глицерин.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба, раскрытые в данном документе, можно составлять с по меньшей мере одним физиологически приемлемым носителем, выбранным из по меньшей мере одного из мальтодекстрина, кальцинированной (иллитовой) глины, известняка (карбоната кальция), циклодекстрина, пшеницы или пшеничного компонента, сахарозы, крахмала,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , талька, PVA, сорбита, бензоата, сорбиата, глицерина, сахарозы, пропиленгликоля, 1,3-пропандиола, глюкозы, парабенов, хлорида натрия, цитрата, ацетата, фосфата, кальция, метабисульфита, формата или их смесей.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба, раскрытые в данном документе, можно составлять с помощью технологии инкапсулирования для улучшения грибковой пропагулы, такой как споры, стабильности и в этом отношении защиты грибковых пропагул от применяемых в отношении семян фунгицидов. В одном варианте осуществления технология инкапсулирования может предусматривать гранулированный полимер для рассчитанного на определенное время высвобождения грибковых пропагул, таких как споры, с течением времени. В одном варианте осуществления инкапсулированные штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиций на основе энтомопатогенных грибов можно применять при отдельном применении гранул в бороздах в отношении семян. В другом варианте осуществления инкапсулированные штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенных грибов можно одновременно применять с семенами.

Покрывающее средство, применимое для длительного высвобождения микрочастиц в варианте осуществления с использованием инкапсуляции, может представлять собой вещество, которое пригодно для покрытия микрогранулярной формы веществом для поддержания на нем. Любое покрывающее средство, которое способно образовывать покрытие, являющееся труднопроницаемым для находящегося в составе вещества, можно использовать в целом без

какого-либо определенного ограничения. Например, можно применять высшую насыщенную жирную кислоту, воск, термопластическую смолу, терморезистивную смолу и им подобные.

Примеры применимой высшей насыщенной жирной кислоты включают стеариновую кислоту, стеарат цинка, амид стеариновой кислоты и этилен-бис-стеарамида; примеры воска включают синтетические виды воска, такие как полиэтиленовый воск, углеродный воск, воск Hoechst и сложный эфир жирной кислоты; природные воски, такие как карнаубский воск, пчелиный воск и японский воск; и воски из нефтепродуктов, такие как парафиновый воск и вазелин. Примеры термопластической смолы включают полиолефины, такие как полиэтилен, полипропилен, полибутен и полистирол; винилполимеры, такие как поливинилацетат, поливинилхлорид, поливинилиденхлорид, полиакриловая кислота, полиметакриловая кислота, полиакрилат и полиметакрилат; полидиены, такие как бутадиеновый полимер, изопреновый полимер, хлоропреновый полимер, сополимер бутадиена и стирола, сополимер этилена, пропилена и диена, сополимер стирола и изопрена, сополимер ММА и бутадиена и сополимер акрилонитрила и бутадиена; полиолефиновые сополимеры, такие как сополимер этилена и пропилена, сополимер бутена и этилена, сополимер бутена и пропилена, сополимер этилена и винилацетата, сополимер этилена и акриловой кислоты, сополимер стирола и акриловой кислоты, сополимер этилена и метакриловой кислоты, сополимер этилена и сложного метакрилового эфира сополимер этилена и оксида углерода, сополимер этиленвинилацетата и оксида углерода, сополимер этиленвинилацетата и винилхлорида и сополимер этиленвинилацетата и акриловой кислоты; и винилхлоридные сополимеры, такие как сополимер винилхлорида и винилацетата и сополимер винилиденхлорида и винилхлорида. Примеры терморезистивной смолы включают полиуретановую смолу, эпоксидную смолу, алкидную смолу, ненасыщенную сложноэфирную смолу, фенольную смолу, меломино-мочевинную смолу, мочевинную смолу и силиконовую смолу. Из них термопластические смолы на основе сложного эфира акриловой кислоты, сополимер бутадиена и стирола, а также терморезистивная полиуретановая смола и эпоксидная смола

являются предпочтительными, а среди этих предпочтительных смол особенно предпочтительной является терморезактивная полиуретановая смола. Эти покрывающие средства можно использовать как по отдельности, так и в комбинации двух или более разновидностей средств.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба могут включать семя, часть семени, растение или часть растения.

Все растения, части растения, семена или почву можно обрабатывать в соответствии со штаммами энтомопатогенных грибов, композициями и способами, раскрытыми в данном документе. Композиции, раскрытые в данном документе, могут включать растение, часть растения, семя, часть семени или почву. Штаммы энтомопатогенных грибов, композиции на основе энтомопатогенных грибов и способы, раскрытые в данном документе, можно применять в отношении семени, растения или частей растения, плода или почвы, в которой растут растения.

Один вариант осуществления относится к способу снижения повреждения растения или части растения со стороны растительного патогена, вредителя или насекомого, предусматривающему (a) обработку перед посевом семени штаммом энтомопатогенного гриба или композицией на основе энтомопатогенного гриба, раскрытой в данном документе. В другом варианте осуществления способ дополнительно предусматривает (b) обработку части растения, полученной из семени, штаммом энтомопатогенного гриба или композицией на основе энтомопатогенного гриба, раскрытой в данном документе. Штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба, применяемая на стадии (a), может быть такой же или отличной от штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, применяемой на стадии (b).

Один вариант осуществления относится к способу снижения повреждения растения или части растения со стороны растительного патогена, вредителя или насекомого, предусматривающему (a) обработку почвы, окружающей семя или растение, штаммом энтомопатогенного гриба или композицией на основе

энтомопатогенного гриба. В другом варианте осуществления способ дополнительно предусматривает (b) обработку части растения штаммом энтомопатогенного гриба или композицией на основе энтомопатогенного гриба, раскрытой в данном документе. Штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба, применяемая на стадии (a), может быть такой же или отличной от штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, применяемой на стадии (b).

Один вариант осуществления относится к способу снижения повреждения растения или части растения со стороны растительного патогена, вредителя или насекомого, предусматривающему (a) обработку семени перед посадкой штаммом энтомопатогенного гриба или композицией на основе энтомопатогенного гриба, раскрытой в данном документе. В другом варианте осуществления способ дополнительно предусматривает (b) обработку почвы, окружающей семя или растение, штаммом энтомопатогенного гриба или композицией на основе энтомопатогенного гриба, раскрытой в данном документе. В еще одном варианте осуществления способ дополнительно предусматривает (c) обработку части растения от растения, полученного из семени, штаммом энтомопатогенного гриба или композицией на основе энтомопатогенного гриба, раскрытой в данном документе. Штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба, применяемая на стадии (a), может быть такой же или отличной от штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, применяемой на стадии (b). Штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба, применяемая на стадии (a), может быть такой же или отличной от штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, применяемой на стадии (c). Штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба, применяемая на стадии (b), может быть такой же или отличной от штамма энтомопатогенного гриба или композиции на основе энтомопатогенного гриба, применяемой на стадии (c).

В одном варианте осуществления виды дикорастущих растений и культивары растений, или таковые, полученные с помощью стандартной биологической селекции, такой как скрещивание или слияние протопластов, или их части, можно обрабатывать с помощью одного или нескольких штаммов энтомопатогенных грибов, композиций и способов, раскрытых в данном документе. В другом варианте осуществления трансгенные растения и культивары растений, полученные с помощью генной инженерии, и части их растений, обрабатывают с помощью одного или нескольких штаммов энтомопатогенных грибов, композиций на основе энтомопатогенных грибов и способов, раскрытых в данном документе.

В другом варианте осуществления растения и культивары растений (полученные с помощью способов биотехнологии, таких как генная инженерия), которые можно обрабатывать в соответствии со штаммами, с помощью композиций и способов, раскрытых в данном документе, представляют собой устойчивые к гербицидам растения, т. е. растения, созданные переносимыми к одному или нескольким определенным гербицидам. Такие растения можно получить либо с помощью генетической модификации, либо с помощью отбора растений, содержащих мутацию, придающую такую переносимость гербицидов. Устойчивые к гербицидам растения представляют собой, например, растения с переносимостью глифосата, т. е. растения, созданные переносимыми к гербициду глифосату или его солям. Растения можно создавать переносимыми к глифосату посредством различных средств. Например, переносимые к глифосату растения можно получить с помощью трансформации растения геном, кодирующим фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS).

Семена, растения или культивары растений (полученные с помощью способов биотехнологии, таких как генная инженерия), которые также можно обрабатывать в соответствии с вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, представляют собой устойчивые к насекомым генетически модифицированные растения (или трансгенные растения), т. е. растения, сделанные устойчивыми к нападению определенных целевых насекомых. Такие растения можно получить с помощью генетической трансформации, или с помощью отбора растений, содержащих мутацию, придающую

такую устойчивость к насекомым.

В другом варианте осуществления семена, растения или культивары растений (полученные с помощью методов биотехнологии, таких как генная инженерия), которые можно обработать в соответствии с настоящим изобретением, являются переносимыми к абиотическим стрессам. Такие растения можно получить с помощью генетической трансформации, или с помощью отбора растений, содержащих мутацию, придающую такую устойчивость к стрессам.

В другом варианте осуществления семена, растения или культивары растений (полученные с помощью способов биотехнологии растений, такие как генная инженерия), которые можно обрабатывать в соответствии с настоящим изобретением, традиционно размножают, с помощью мутагенеза, или генетически конструируют с получением комбинации или набора ценных признаков, в том числе без ограничения переносимости гербицидов, устойчивости к насекомым и переносимости абиотических стрессов. Варианты осуществления, раскрытые в данном документе, также применяются в отношении сортов растений, которые будут созданы или представлены на рынке в будущем и которые имеют эти генетически признаки или признаки, которые предстоит разработать в будущем.

Как используется в данном документе, применение штамма энтомопатогенного гриба или композиции в отношении семени, растения или части растения предусматривает приведение в контакт, распыление, покрытие, орошение и/или применение в отношении семени, растения или части растения непосредственно и/или опосредованно штамма энтомопатогенного гриба или композиции. В одном варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба можно применять непосредственно в виде спрея, ополаскивателя или порошка или их комбинации. Стадия приведения в контакт может происходить в то время, когда семя, растение или часть растения растет, в то время, когда растение или часть растения оплодотворяют, в то время, когда растение или часть растения собирают, после того, как растение или часть растения собирают, в то время, когда растение или часть растения

обрабатывают, в то время, когда растение или часть растения упаковывают, или в то время, когда растение или часть растения хранят на складе или на полке в магазине.

Как используется в данном документе, спрей относится к туману из жидких частиц, которые содержат штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления спрей можно применять в отношении семени, растения или части растения в то время, когда растение или часть растения растет. В другом аспекте спрей можно применять в отношении семени, растения или части растения в то время, когда семя, растение или часть растения оплодотворяют. В другом аспекте спрей можно применять в отношении семени, растения или части растения в то время, когда растение или часть растения собирают. В другом аспекте спрей можно применять в отношении семени, растения или части растения после того, как семя, растение или часть растения собирают. В другом аспекте спрей можно применять в отношении семени, растения или части растения в то время, когда семя, растение или часть растения обрабатывают. В другом аспекте спрей можно применять в отношении семени, растения или части растения в то время, когда семя, растение или часть растения упаковывают. В другом аспекте спрей можно применять в отношении семени, растения или части растения в то время, когда семя, растение или часть растения хранят.

В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба, раскрытую в данном документе, можно применять непосредственно в отношении семени, растения или части растения в виде ополаскивателя. Используемый в данном документе термин ополаскиватель представляет собой жидкость, содержащую штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба, раскрытую в данном документе. Такой ополаскиватель можно выливать на семя, растение или часть растения. Растение или часть растения можно также окунать или погружать в ополаскиватель, затем извлекать и обеспечивать высыхание.

В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба можно применять в отношении семени, растения или части растения, и ею можно покрывать 50% площади поверхности растительного материала. В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба можно применять в отношении растения или части растения, и ею можно покрывать процент поверхности растительного материала от 50% до приблизительно 95%, от 60% до приблизительно 95%, от 70% до приблизительно 95%, от 80% до приблизительно 95% и от 90% до приблизительно 95%. В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба, раскрытую в данном документе, можно применять в отношении среды, окружающей семя, растение или часть растения, и ею можно покрывать 50% площади среды семени, растения или части растения. В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба можно применять в отношении среды, окружающей семя, растение или часть растения, и ею можно покрывать процент поверхности среды семени, растения или части растения от 50% до приблизительно 95%, от 60% до приблизительно 95%, от 70% до приблизительно 95%, от 80% до приблизительно 95% и от 90% до приблизительно 95%.

В другом аспекте штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба могут покрывать от приблизительно 20% до приблизительно 30%, от приблизительно 30% до приблизительно 40%, от приблизительно 40% до приблизительно 50%, от приблизительно 50% до приблизительно 60%, от приблизительно 60% до приблизительно 70%, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, от приблизительно 80% до приблизительно 90%, от приблизительно 90% до приблизительно 95%, от приблизительно 95% до приблизительно 98%, от приблизительно 98% до приблизительно 99% или 100% площади поверхности семени, растения или части растения или среды, окружающей семя, растение или часть растения.

В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного

гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба, раскрытую в данном документе, можно применять непосредственно в отношении семени, растения или части растения или среды, окружающей семя, растение или часть растения, в виде порошка. Используемый в данном документе порошок представляет собой сухое или практически сухое твердое вещество в насыпной форме, состоящее из большого количества очень мелких частиц, которые плавно перемещаются при встряхивании или наклоне. Композиция на основе сухого или практически сухого порошка, раскрытая в данном документе, предпочтительно содержит низкий процент воды, как, например, в различных аспектах менее 5%, менее 2,5% или менее 1% по весу.

В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба, можно применять опосредованно в отношении семени, растения или части растения или среды, окружающей семя, растение или часть растения. Например, семя, растение или часть растения, в отношении которых уже применяли штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба, могут касаться второго семени, растения или части растения таким образом, что штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба соприкасаются в результате трения со вторым семенем, растением или частью растения. В дополнительном аспекте штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба можно применять с помощью аппликатора. В различных аспектах аппликатор может включать без ограничения шприц, губку, бумажное полотенце или ткань или любую их комбинацию.

Стадия приведения в контакт может происходить в то время, когда растительный материал растет, в то время, когда семя, растение или часть растения оплодотворяют, в то время, когда растение или часть растения собирают, после того, как семя, растение или часть растения собрали, в то время, когда растение или часть растения обрабатывают, в то время, когда растение или часть растения упаковывают, или в то время, когда растение или часть растения хранят на складе.

В другом варианте осуществления штамм энтомопатогенного гриба или композиция на основе энтомопатогенного гриба, раскрытая в данном документе, может представлять собой коллоидную дисперсию. Коллоидная дисперсия представляет собой тип химической смеси, где одно вещество равномерно диспергирует в другом. Частицы диспергированного вещества лишь суспендируются в смеси, в отличие от раствора, в котором они полностью растворяются. Это происходит поскольку частицы в коллоидной дисперсии являются более крупными, чем в растворе, достаточно маленькими для того, чтобы равномерно диспергироваться и поддерживать гомогенный внешний вид, но достаточно крупными для того, чтобы рассеивать свет и не растворяться. Коллоидные дисперсии являются промежуточными между гомогенными и гетерогенными смесями и иногда классифицируются как либо "гомогенные", либо "гетерогенные" на основании их внешнего вида.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов, композиции и способы, раскрытые в данном документе, пригодны для применения с семенем. В другом варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов, композиции и способы, раскрытые в данном документе, пригодны для применения с семенем одного или нескольких из любых растений, упомянутых ранее.

В еще одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов, композиции и способы, раскрытые в данном документе, можно применять для обработки трансгенных или генетически модифицированных семян. Гетерологичный ген в трансгенных семенах может происходить, например, из микроорганизмов видов *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Clavibacter*, *Glomus* или *Gliocladium*.

В одном варианте осуществления семя обрабатывают в состоянии, в котором оно является достаточно стабильным, поэтому обработка не вызывает никакого повреждения. Как правило, обработка семени может происходить в любой момент времени между сбором урожая и посевом. В одном варианте осуществления применяемое семя отделяют от растения и освобождают от початков, шелухи, стеблей, покровов, волосков или мякоти плодов. Таким

образом, можно применять, например, семя, которое было собрано, очищено и высушено. В качестве альтернативы, можно также применять семя, которое после высушивания было обработано, например, водой и затем повторно высушено.

В одном варианте осуществления семя обрабатывают с помощью штаммов энтомопатогенных грибов, композиций и способов, раскрытых в данном документе, таким образом, что прорастание семени не находится под неблагоприятным влиянием, или что образующееся в результате растения не повреждается.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и композиции, раскрытые в данном документе, можно применять непосредственно в отношении семени. Например, штаммы энтомопатогенных грибов, композиции и способы, раскрытые в данном документе, можно применять с дополнительными компонентами и без разбавления.

В другом варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и композиции на основе штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытые в данном документе, применяют в отношении семени в форме подходящего состава. Подходящие составы и способы обработки семени известны специалисту в данной области техники и описаны, например, в следующих 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.

Штаммы энтомопатогенных грибов и композиции на основе энтомопатогенного гриба, раскрытые в данном документе, можно превращать в общепринятые составы для протравливания семени, такие как растворы, эмульсии, суспензии, порошки, пены, взвеси или другие покрывающие материалы для семени, а также составы ULV. Эти составы получают известным путем в результате смешивания штаммов энтомопатогенных грибов, раскрытых в данном документе, с обычными добавками, такими как, например, обычные расширители, а также растворители или разбавители, красители, смачивающие средства, диспергирующие средства, эмульгаторы, пеногасители, консерванты, вторичные загустители, адгезивные средства, гиббереллины, а также вода.

В другом варианте осуществления подходящие красители,

которые могут присутствовать в составе для протравливания семени, включают все красители, являющиеся общепринятыми для таких целей. Можно использовать как пигменты, характеризующиеся умеренной растворимостью в воде, так и краски, растворимые в воде. Примеры, которые можно упомянуть, включают красители, известные под названиями родамин В, С.І. красный пигмент 112 и С.І. красный растворитель 1.

В другом варианте осуществления подходящие смачивающие средства, которые могут присутствовать в составе для протравливания семени, включают все вещества, которые стимулируют смачивание и являются общепринятыми в составе активных агрохимических веществ. Преимущественно можно использовать алкилнафталинсульфонаты, например диизопропил- или диизобутилнафталинсульфонаты.

В еще одном варианте осуществления подходящие диспергирующие средства и/или эмульгаторы, которые могут присутствовать в составе для протравливания семени, включают все неионные, анионные и катионные диспергирующие средства, которые являются общепринятыми в составе активных агрохимических веществ. В одном варианте осуществления можно применять неионогенные или анионные диспергирующие средства, или смеси неионогенных или анионных диспергирующих средств. В одном варианте осуществления неионогенные диспергирующие средства включают без ограничения блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида, простые алкилфенолполигликолевые эфиры и простые тристирилфенолполигликолевые эфиры и их фосфатированные и сульфатированные производные.

В еще одном варианте осуществления пеногасители, которые могут присутствовать в составе для протравливания семени, предназначенном для применения в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, включают все подавляющие образование пены соединения, которые являются общепринятыми в составе агрохимически активных соединений, в том числе без ограничения силиконовые пеногасители, стеарат магния, силиконовые эмульсии, длинноцепочечные спирты, жирные кислоты и их соли, а также фосфорорганические соединения и их смеси.

В еще одном варианте осуществления вторичные загустители, которые могут присутствовать в составе для протравливания семени, включают все соединения, которые можно применять для таких целей в агрохимических композициях, в том числе без ограничения производные целлюлозы, производные акриловой кислоты, полисахариды, такие как ксантановая камедь или вигум, модифицированные разновидности глины, филлосиликаты, такие как аттапульгит и бентонит, а также мелкодисперсные разновидности кремниевой кислоты.

Подходящие адгезивные средства, которые могут присутствовать в составе для протравливания семени, предназначенном для применения, могут включать все общепринятые связывающие вещества, которые можно применять в составах для протравливания семени. Поливинилпирролидон, поливинилацетат, поливиниловый спирт и тилозу можно упомянуть в качестве предпочтительных.

В еще одном другом варианте осуществления составы для протравливания семени можно применять непосредственно или после разбавления водой перед обработкой семени любого из очень широкого разнообразия типов. Составы для протравливания семени или их разбавленные препараты также можно применять для протравливания семени трансгенных растений. В этом контексте синергические эффекты могут также возникать при взаимодействии с веществами, образованными в результате экспрессии.

Подходящее смесительное оборудование для обработки семени составом для протравливания семени или составами, полученными из них с помощью добавления воды, включает все смесительное оборудование, которое можно обычно применять для протравливания. Конкретная процедура, принятая при протравливании, включает введение семени в миксер, добавление определенного необходимого количества состава для протравливания семени, либо в том виде, в котором он находится, либо после предварительного разбавления водой, и осуществление смешивания до тех пор, пока состав не будет распределен равномерно на семени. Необязательно после этого следует процесс высушивания.

В различных вариантах осуществления один или несколько

штаммов энтомопатогенных грибов, композиций на основе энтомопатогенных грибов или составов на основе энтомопатогенных грибов можно добавлять к растению, части растения и/или семени в количестве от приблизительно 10 до  $1 \times 10^{14}$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на семя, в том числе приблизительно  $1 \times 10^3$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^4$  КОЕ/семя,  $1 \times 10^5$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^6$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^7$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^8$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, или приблизительно  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, в том числе от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^8$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^7$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^5$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^6$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^4$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^8$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^7$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^5$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^6$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^{11}$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^7$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^6$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^8$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^8$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^6$

до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^{10}$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^{11}$  до  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/семя, от приблизительно  $1 \times 10^{11}$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя и от приблизительно  $1 \times 10^{12}$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/семя. Используемый в данном документе термин "колониеобразующая единица" или "КОЕ" представляет собой единицу, содержащую структуры энтомопатогенных грибов, способные к росту и образованию колонии в благоприятных условиях. Значение КОЕ выступает в роли оценки числа жизнеспособных структур или клеток в образце.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и композиции на основе энтомопатогенных грибов можно составлять в форме жидкого средства для обработки семени. Средство для обработки семени содержит по меньшей мере один штамм энтомопатогенного гриба или композицию на основе энтомопатогенного гриба. Семена могут быть практически равномерно покрыты одним или несколькими слоями энтомопатогенного гриба или композицией с помощью стандартных способов смешивания, распыления или их комбинации. Нанесение можно выполнять с помощью оборудования, которое точно, безопасно и эффективно наносит продукты для обработки семени на семена. В таком оборудовании применяются различные типы технологии

покрытия, такие как ротационные устройства для нанесения покрытия, барабанные устройства для нанесения покрытия, методики псевдооживленного слоя, фонтанирующие слои, ротационные спреи или их комбинация.

В одном варианте осуществления нанесение выполняют с помощью либо вращающегося "пульверизационного" диска, либо распылительной форсунки, которая равномерно распределяет средство для обработки семени на семя по мере своего продвижения по схеме распыления. В еще одном другом варианте осуществления семя затем смешивают или перемешивают в течение дополнительного периода времени для достижения дополнительного распределения обработки и высушивания. Семена можно праймировать или можно не праймировать перед покрытием композициями по настоящему изобретению для повышения однородности прорастания и появления. В альтернативном варианте осуществления композицию на основе сухого порошка можно отмерить на движущееся семя.

В еще одном варианте осуществления семя можно покрыть посредством непрерывного или периодического способа покрытия. При непрерывном способе покрытия оборудование с непрерывным потоком одновременно отмеряет как поток семени, так и продукты обработки семени. Скользящий затвор, конус и входное отверстие, высевающий диск или устройство для взвешивания (лента или отводное устройство) регулирует поток семени. Сразу после определения скорости потока семени через оборудование для обработки скорость потока средства для обработки семени калибруют по отношению к скорости потока семени для доставки необходимой дозы к семени, по мере продвижения через оборудование для обработки семени. Кроме того, компьютерная система может отслеживать вход семени в устройство для покрытия, за счет чего осуществляется поддержка постоянного потока соответствующего количества семени.

При периодическом способе покрытия оборудование для периодической обработки отвешивает предусмотренное количество семени и помещает семя в закрытую камеру или резервуар для обработки, где затем проводят соответствующую обработку семени. Семя и средство для обработки семени затем смешивают с

достижением практически однородного покрытия на каждом семени. Эту партию затем удаляют из камеры для обработки при подготовке к обработке следующей партии. С помощью компьютерных систем контроля этот периодический способ автоматизируют, обеспечивая непрерывный повтор процесса периодической обработки.

Ряд добавок можно добавлять к средству для обработки семени. Можно добавлять связывающие вещества и они включают таковые, состоящие предпочтительно из адгезивного полимера, который может являться натуральным или синтетическим без оказания фитотоксического эффекта на семена, подлежащие покрытию. Можно применять ряд красителей, в том числе органические хромофоры, классифицируемые как нитрозо, нитро, азо, в том числе моноазо, бисазо и полиазо, дифенилметан, триарилметан, ксантен, метан, акридин, тиазол, тиазин, индамин, индофенол, азин, оксазин, антрахинон и фталоцианин. Другие добавки, которые можно добавлять, включают следовые питательные вещества, такие как соли железа, магния, бора, меди, кобальта, молибдена и цинка. Полимер или другое средство контроля пыли можно применять для удерживания средства для обработки на поверхности семени.

Другие стандартные добавки для обработки семени включают без ограничения покрывающие средства, увлажняющие средства, буферные средства и полисахариды. По меньшей мере один приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель можно добавлять к составу для обработки семени, такой как вода, твердые вещества или сухие порошки. Сухие порошки могут быть получены из ряда материалов, таких как кора деревьев, карбонат кальция, гипс, вермикулит, тальк, гумус, активированный уголь и различные фосфорные соединения.

В одном варианте осуществления покрытие семени содержит по меньшей мере один наполнитель, который представляет собой органический или неорганический, природный или синтетический компонент, с которым штаммы энтомопатогенных грибов и композиции на их основе объединяют для облегчения его нанесения на семя. В одном варианте осуществления наполнитель представляет собой инертное твердое вещество, такое как глины, природные или

синтетические силикаты, кремнезем, смолы, воска, твердые удобрения (например, соли аммония), природные почвенные минералы, такие как каолины, глины, тальк, известняк, кварц, аттапульгит, монтмориллонит, бентонит или диатомовые земли, или синтетические минералы, такие как алюмосиликат или силикаты, в частности, силикаты алюминия и магния.

В одном варианте осуществления штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба, раскрытые в данном документе, можно составить с помощью технологии инкапсулирования для улучшения грибковой споры, стабильности и в этом отношении защиты грибковых спор от применяемых в отношении семян фунгицидов. В одном варианте осуществления технология инкапсулирования может предусматривать гранулированный полимер для рассчитанного на определенное время высвобождения грибковых спор с течением времени. В одном варианте осуществления технология инкапсулирования может предусматривать цеолитный материал. В одном варианте осуществления инкапсулированные штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиций на основе энтомопатогенных грибов можно применять при отдельном применении гранул в бороздах в отношении семян. В другом варианте осуществления инкапсулированные штаммы энтомопатогенных грибов и/или композиции на основе энтомопатогенных грибов можно одновременно применять с семенами.

Контроль устойчивости к насекомым (IRM) представляет собой термин, используемый для описания вариантов осуществления на практике, направленных на снижение возможности насекомых-вредителей приобретать устойчивость к тактике контроля насекомых. В связи с поддержанием происходящих из *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) пестицидных белков, других пестицидных белков, химического вещества, энтомопатогенного биологического средства или других биологических препаратов, IRM имеет большое значение из-за угрозы, которую устойчивость насекомых несет для дальнейшего применения пестицидных защитных средств, включенных в растения, и технологии инсектицидного признака в целом. Конкретные стратегии IRM, такие как стратегия убежища, уменьшает устойчивость насекомых к специфическим инсектицидным белкам,

продуцируемым в кукурузе, сое, хлопчатнике и других культурах. Однако в результате применения таких стратегий часть сельскохозяйственных культур остается восприимчивой к одному или нескольким вредителям, чтобы обеспечить возможность неустойчивым насекомым развиться и приобрести способность к спариванию с любым из устойчивых вредителей, появившихся среди защищенных культур. Соответственно, с точки зрения фермера/производителя, крайне важно иметь убежища как можно меньшего размера и при этом управлять устойчивостью насекомых, чтобы добиться как можно большего урожая, сохраняя при этом эффективность используемого способа контроля вредителя, независимо от того, предусматривает ли он *Bt*, другой пестицидный белок, химическое вещество, энтомопатогенное биологическое средство или другие биологические препараты, какой-либо другой способ или их комбинации.

Часто используемой стратегией IRM является засев убежища (части посевной площади в акрах семенами без *Bt*/пестицидного признака), поскольку общепринято, что это замедлит развитие устойчивости насекомых к пестицидным признакам путем поддержания чувствительности насекомых. Теоретическая основа стратегии убежища для замедления развития устойчивости основана на предположении того, что частота и рецессивность устойчивости насекомых обратно пропорциональны чувствительности вредителя; проявление устойчивости будет редким и рецессивным лишь тогда, когда вредители являются очень восприимчивыми к токсину, и наоборот, устойчивость будет более частой и менее рецессивной, когда вредители не являются высоко восприимчивыми. Кроме того, стратегия предполагает, что устойчивость к инсектицидному признаку является рецессивной и придается одним локусом с двумя аллелями, в результате чего образуется три генотипа: восприимчивые гомозиготы (SS), гетерозиготы (RS) и устойчивые гомозиготы (RR). Также стратегия предполагает низкую исходную частоту встречаемости аллеля устойчивости и высокую частоту случайного спаривания между устойчивыми и восприимчивыми взрослыми особями. В идеальных условиях только редкие особи RR смогут выжить на фоне пестицидного токсина, продуцируемого культурой. Как особи SS, так и особи RS будут восприимчивыми к

пестицидному токсину. Структурированное убежище представляет собой часть поля растениевода или совокупность полей без *Bt*/инсектицидного признака, обеспечивающие получение восприимчивых (SS) насекомых, которые могут случайно спариваться с редкими устойчивыми (RR) насекомыми, выживающими в условиях сельскохозяйственной культуры с инсектицидным признаком, которая может представлять собой культуру с признаком *Bt*, с получением восприимчивых гетерозигот RS, которые будут уничтожены в условиях культуры с *Bt*/инсектицидным признаком. Интегрированное убежище представляет собой определенную часть случайно посаженной части поля растениевода или совокупность полей без *Bt*/инсектицидного признака, обеспечивающие получение восприимчивых (SS) насекомых, которые могут случайно спариваться с редкими устойчивыми (RR) насекомыми, выживающими в условиях сельскохозяйственной культуры с инсектицидным признаком, с получением восприимчивых гетерозигот RS, которые будут уничтожены в условиях культуры с инсектицидным признаком. При каждой стратегии убежища будут удаляться устойчивые (R) аллели из популяций насекомых и задерживаться развитие устойчивости.

Другая стратегия снижения потребности в убежище заключается в пирамидировании признаков с различными механизмами действия против целевого насекомого-вредителя. Например, токсины *Bt*, которые характеризуются различными механизмами действия, пирамидированные в одном трансгенном растении, способны иметь пониженные требования к убежищу в связи со сниженным риском устойчивости. Различные механизмы действия в пирамидной комбинации также увеличивают устойчивость каждого признака, поскольку устойчивость к каждому признаку развивается медленнее.

В настоящее время размер, положение и контроль убежища часто считаются ключевыми для успешного осуществления стратегий убежищ с уменьшением устойчивости насекомых к *Bt*/пестицидному признаку, продуцируемым у кукурузы, хлопчатника, сои и других сельскохозяйственных культур. По причине снижения урожайности на возделываемых участках, отведенных для убежища, некоторые фермеры отказываются от требования создания убежищ, а другие не соблюдают требования относительно размера и/или расположения.

Эти проблемы приводят либо к отсутствию убежища, либо к менее эффективному убежищу, и соответствующему риску увеличения вероятности развития устойчивых вредителей.

Таким образом, остается потребность в способах управления устойчивостью вредителей на участке, засеянном культурными растениями, устойчивыми к вредителям. Было бы целесообразно обеспечить улучшенный способ защиты растений, в особенности кукурузы или других культурных растений, от повреждения, причиняемого поеданием вредителями. Было бы особенно целесообразно, если такой способ будет обеспечивать сокращение требуемого уровня внесения традиционных химических пестицидов, а также будет обеспечивать уменьшение количества отдельных полевых технологических операций, которые требуются для посева и культивирования культурных растений. Кроме того, было бы целесообразно иметь способ применения средства биологического контроля, которое повышает устойчивость инсектицидного признака или повышает эффективность многих стратегий контроля устойчивости.

Один вариант осуществления относится к способу снижения или предупреждения развития устойчивости к растительной инсектицидной/пестицидной композиции вредителя в популяции, предусматривающему обеспечение композиции для защиты растения, такой как пестицидный белок *Vt*, трансгенный пестицидный белок, другие пестицидные белки, химические пестициды или энтомопатогены с биологической пестицидной активностью для семени, растения, части растения или посаженного участка. Другой вариант осуществления относится к способу снижения или предупреждения устойчивости к растительному инсектицидному признаку, предусматривающему обеспечение композиции, содержащей растительный инсектицидный признак и штамм энтомопатогенного гриба, описанный в данном документе. Дополнительный вариант осуществления относится к способу снижения или предупреждения устойчивости к растительному инсектицидному признаку в отношении отряда жесткокрылых, предусматривающему обеспечение композиции, содержащей растительный инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых и штамм энтомопатогенного гриба и/или композицию на

основе энтомопатогенного гриба, описанную в данном документе. Другой вариант осуществления относится к способу снижения или предупреждения устойчивости к растительному инсектицидному признаку в отношении *Diabrotica virgifera virgifera*, предусматривающему обеспечение растительного инсектицидного признака в отношении *Diabrotica virgifera virgifera* и штамма энтомопатогенного гриба и/или композиции на основе энтомопатогенного гриба, описанной в данном документе. В определенных вариантах осуществления инсектицидный признак включает признак *Bt*, отличный от *Bt* признак или признак RNAi.

Дополнительный вариант осуществления относится к способу повышения устойчивости композиций для борьбы с вредителями растений, предусматривающему обеспечение композиции для защиты растений для семени, растения или посаженного участка, и обеспечение штаммов энтомопатогенных грибов, композиций и/или способов, описанных в данном документе, по отношению к семени, растению или посаженному участку, где штаммы энтомопатогенных грибов, композиции и/или способы, описанные в данном документе, характеризуются различным механизмом действия, чем композиция для защиты растений.

В еще одном дополнительном варианте осуществления необходимое убежище может быть уменьшено или устранено в результате присутствия штаммов энтомопатогенных грибов, композиций и/или способов, описанных в данном документе, применимых в отношении не относящихся к убежищу растений. В другом варианте осуществления убежище может включать штаммы энтомопатогенных грибов, композиции и/или способы, описанные в данном документе, в качестве спрея, приманки или в виде другого механизма действия.

В одном варианте осуществления композиция содержит грибковый энтомопатоген и отличный от *Bt* инсектицидный признак повышает устойчивость к патогену, вредителю или насекомому. В другом варианте осуществления грибковый энтомопатоген выбран из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1. В другом варианте осуществления отличный от *Bt* инсектицидный признак

представляет собой инсектицидный белок, полученный из растения, инсектицидный белок, полученный из бактерии/археи, не относящийся к *Bt* (такой как инсектицидный белок *Pseudomonas*), инсектицидный белок, полученный из животного, или элемент сайленсинга. В другом варианте осуществления композиция, содержащая грибковый энтомопатоген и отличный от *Bt* инсектицидный признак повышает устойчивость отличного от *Bt* инсектицидного признака. В другом варианте осуществления отличный от *Bt* инсектицидный признак представляет собой полипептид PIP-72 из публикации согласно РСТ с регистрационным номером РСТ/US14/55128. В другом варианте осуществления отличный от *Bt* инсектицидный признак представляет собой элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующий на RyanR, HP2 или PAT3 (публикация заявки на патент США 2014/0275208 и US2015/0257389). В другом варианте осуществления отличный от *Bt* инсектицидный признак представляет собой полинуклеотидный элемент сайленсинга, целенаправленно воздействующий на RyanR (публикация заявки на патент США 2014/0275208) и полипептид PIP-72 из публикации согласно РСТ с регистрационным номером РСТ/US14/55128.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, которая повышает устойчивость к патогену, вредителю или насекомому, содержит грибковый энтомопатоген, такой как штамм энтомопатогенного гриба, раскрытого в данном документе, и инсектицидный признак *Bt*, который повышает устойчивость к патогену, вредителю или насекомому. Инсектицидный признак *Bt* может характеризоваться активностью в отношении вредителей растений отряда жесткокрылых, таких как *Diabrotica virgifera virgifera*. Композиции, раскрытые в данном документе, могут придавать растению или части растения дополнительную или синергическую устойчивость к патогену, вредителю или насекомому в комбинации с инсектицидным признаком *Bt*. В одном варианте осуществления композиция содержит грибковый энтомопатоген и инсектицидный признак *Bt*, где инсектицидный признак *Bt* включает токсин Cry3B, раскрытый в патентах США с номерами 8101826, 6551962, 6586365, 6593273 и публикации

согласно РСТ WO 2000/011185, токсин mCry3B, раскрытый в патентах США с номерами 8269069 и 8513492, токсин mCry3A, раскрытый в патентах США с номерами 8269069, 7276583 и 8759620, или токсин Cry34/35, раскрытый в патентах США с номерами 7309785, 7524810, 7985893, 7939651 и 6548291, и трансгенные объекты, содержащие эти инсектицидные токсины *Bt* и другие активные в отношении жесткокрылых инсектицидные признаки *Bt*, например, объект MON863, раскрытый в патенте США с номером 7705216, объект MIR604, раскрытый в патенте США с номером 8884102, объект 5307, раскрытый в патенте США с номером 9133474, объект DAS-59122, раскрытый в патенте США с номером 7875429, объект DP-4114, раскрытый в патенте США с номером 8575434, объект MON 87411, раскрытый в опубликованной заявке на патент США с номером 2013/0340111 и объект MON88017, раскрытый в патенте США с номером 8686230, все из которых включены в данный документе посредством ссылки.

Штаммы энтомопатогенных грибов, композиции на основе энтомопатогенных грибов и способы будут дополнительно понятны посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры. Следующие примеры представлены только для иллюстративных целей. Примеры включены исключительно для облегчения более полного понимания описанных вариантов осуществления настоящего изобретения. Примеры не ограничивают объем описанных или заявленных в формуле изобретения вариантов осуществления настоящего изобретения.

#### **ПРИМЕР 1**

##### **Методика биологического анализа**

Лабораторные анализы проводили с помощью очищенных культур отдельно взятых спор энтомопатогенных грибов в целях идентификации штаммов, инфекционных в отношении *Diabrotica virgifera virgifera*. Личинки второй стадии *D. virgifera virgifera* погружали в  $1 \times 10^7$ /мл суспензию каждого штамма грибов на 1-2 минуты и переносили в чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой на 24 часа. Личинки второй стадии *D. virgifera virgifera* также погружали в 0,01% раствор Tween 80 (необработанный

контроль), а также в  $1 \times 10^7$ /мл суспензию изолята *Beauveria* spp., который происходил от инфицированных *D. virgifera virgifera* и, как было ранее показано в условиях лаборатории, был инфекционным (положительный контроль). Обработки положительного и необработанного контроля служили для подтверждения достоверности каждого биологического анализа. Биологический анализ считали достоверным, если отсутствовали инфицированные личинки в необработанном контроле и присутствовали инфицированные личинки в положительном контроле. Через 24 часа личинки в асептических условиях переносили в чашки Петри, содержащие влажную фильтровальную бумагу и три проростка кукурузы на стадии колеоптиля. Все штаммы грибов исследовали в трех повторностях с 10 личинками на повторность. Чашки Петри, содержащие личинки и проростки кукурузы, инкубировали в течение 14 дней при 25°C, после этого времени личинки исследовали на наличие грибковой инфекции. Грибковую инфекцию подтверждали по наличию конидий на поверхности погибших объектов (таблица 1).

Таблица 1.

Биологический анализ	Штамм	% инфицированных личинок
		CRW
1	3213-1	50
1	Отрицательный контроль	0
2	23013-3	26,67
2	15013-1	33,33
2	Отрицательный контроль	0

#### Результаты биологического анализа

Результаты лабораторного биологического анализа показали, что штаммы 15013-1, 23013-3 и 3213-1 были инфекционными в отношении личинок второй стадии *D. virgifera virgifera*. Биологические анализы выполняли при отличающейся дозе, при которой личинок подвергали воздействию концентрации спор, которая обеспечивала идентификацию высокоинфекционных штаммов, в то время как штаммы, которые не были высокоинфекционными в

отношении *D. virgifera virgifera*, не приводили к инфекции личинок или приводили к очень низким уровням инфекции личинок. Положительный контроль приводил к инфекции личинок в каждом из описываемых биологических анализов, а отрицательный контроль не приводил к инфекции личинок.

## **ПРИМЕР 2**

### **Методика биологического анализа введения в почву**

Биологические анализы целых растений в условиях теплицы проводили с наиболее эффективными штаммами энтомопатогенных грибов, идентифицированными в лабораторных биологических анализах. Штаммы грибов вводили непосредственно перед посадкой в смесь 50:50 коммерческой почвы для горшков и верхнего слоя почвы при норме, эквивалентной полевому применению, составляющему  $2 \times 10^{13}$  спор/акр. Обработка отрицательного контроля состояла из почвы, в которую не вводили споры грибов. Эксперимент представлял собой полный факторный план с двумя факторами (штамм и идиоплазма грибов). Используемые семена состояли из докоммерческого гибрида кукурузы DuPont Pioneer либо с инсектицидным признаком (DP-4114, PCT/US10/60818), либо растения дикого типа (без признака) того же генетического фона без инсектицидного признака с активностью в отношении *D. virgifera virgifera*. Пятнадцать отдельных семян гибридной кукурузы (каждого типа) высаживали в пластиковые горшки объемом 3,78 л и содержали в теплице (80°F, 15:9 L:D) и по мере необходимости поливали. Когда растения достигали стадии листьев V2, их заражали 100 не находящимися в диапаузе яйцами *D. virgifera virgifera*. Растения контролировали ежедневно и анализ завершали через 14 дней после появления первого жука. Число взрослых особей *D. virgifera virgifera*, которые появлялись из каждого горшка, определяли в GH аналогичным образом, как описано в Meihls et al. (2008) PNAS 105: 19177-19182. В этих биологических анализах появление взрослых особей не подсчитывали; анализ оценивали по первому появлению жука. По завершению анализа растения срезали над линией почвы и подсчитывали общее число взрослых особей. Затем корневой ком промывали и определяли

индекс повреждения узлов (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (таблица 2).

Таблица 2.

№	БИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	ШТАММ	ИНДЕКС CRWNIS WT*	ИНДЕКС CRWNIS DP-4114*	ПОЯВЛЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ WT*	ПОЯВЛЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ DP-4114*
ГН						
1		15013-1	0,90a	0,15a	8,93b	3,88b
		Отрицате				
1		льный	1,89b	0,62b	21,87a	8,68a
		контроль				
2		23013-3	0,30a	0,05a	1,32a	1,74a
		Отрицате				
2		льный	0,78b	0,20b	4,84b	8,09b
		контроль				
3		3213-1	0,85a	0,17a	Н/Д	Н/Д
		Отрицате				
3		льный	1,68b	0,41b	Н/Д	Н/Д
		контроль				

\* Парные сравнения выполняли, сравнивая каждый штамм гриба с отрицательным контролем с учетом каждого генотипа. Использовали критерий множественных сравнений Даннетта и скорректированные р-значения считали статистически значимыми при менее 0,05. Средние значения из того же биологического анализа ГН с различными буквами ("a" или "b") (CRWNIS или появление взрослых особей) в пределах генотипа гибрида кукурузы (WT или DP-4114) были достоверно различными ( $P < 0,05$ ).

#### Статистический анализ

Повреждение корней, измеряемое с помощью CRWNIS, анализировали отдельно для каждого проведенного анализа, с помощью процедуры MIXED в программном обеспечении SAS версии номер 9.4 (SAS Institute Inc., 100 SAS Campus Drive, Кэри, Северная Каролина 27513, США). С целью лучшего соответствия допущениям модели, перед анализом наблюдаемые значения CRWINS

преобразовывали с помощью преобразования квадратного корня.

Используемую модель можно обозначить:

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

где  $y$  означает ответ,  $b$  означает блок/повтор,  $t$  означает обработку штамма,  $g$  означает генотип и  $\epsilon$  означает дисперсию растение-растение с остаточной ошибкой. Обработку и генотип принимали за фиксированные эффекты. Все другие эффекты считали независимыми нормально распределенными случайными переменными со средними значениями, равными нулю.

Наилучшие линейные несмещенные оценки отмечали для каждой комбинации обработки и генотипа, в соответствии с обратным преобразованием (т. е.  $\hat{y}^2$ ). \* Парные сравнения выполняли, сравнивая каждую обработку грибом с контролем с учетом каждого генотипа. Использовали критерий множественных сравнений Даннетта и скорректированные  $p$ -значения считали статистически значимыми при менее 0,05. Данные касательно появления жука анализировали отдельно для каждого анализа с помощью процедуры GLIMMIX в программном обеспечении SAS версии номер 9.4 (SAS Institute Inc., 100 SAS Campus Drive, Кэри, Северная Каролина 27513, США). Обобщенная линейная смешанная модель соответствовала данным, учитывая распределение Пуассона для числа появлений и логарифмическую функцию связывания.

Используемый линейный прогностический параметр можно обозначить:

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

где  $\eta$  означает логарифм числа появившихся жуков,  $b$  означает блок/повтор,  $t$  означает обработку штамма,  $g$  означает генотип и  $p$  означает растение. Обработку и генотип принимали за фиксированные эффекты. Все другие эффекты считали независимыми нормально распределенными случайными переменными со средними значениями, равными нулю.

Оценки значений для каждой обработки в зависимости от комбинации генотипов описывали с помощью обратной связывающей шкалы ( $e^\eta$ ). \* Парные сравнения выполняли, сравнивая каждый штамм гриба с контролем с учетом каждого генотипа. Использовали

критерий множественных сравнений Даннетта и скорректированные р-значения считали статистически значимыми при менее 0,05. Средние значения из того же биологического анализа GH с различными буквами (CRWNIS или появление взрослых особей) в пределах генотипа гибрида кукурузы (WT или DP-4114) были достоверно различными ( $P < 0,05$ ).

#### **Результаты биологического анализа введения в почву**

Все штаммы энтомопатогенных грибов, оцениваемые в биологических анализах 1, 2 и 3 в условиях теплицы, значимо снижали степень повреждения корней в обоих генотипах оцениваемой гибридной кукурузы. Эффективность, обеспечиваемая каждым из энтомопатогенных грибов при введении при посадке, была аддитивной без значимого взаимодействия с точки зрения эффективности насекомых, при использовании с инсектицидным признаком или без него. В биологических анализах 1 и 2, где определяли число взрослых жуков, оба штамма при введении в почву при посадке значимо снижали число взрослых особей *D. virgifera virgifera*, которые появлялись из обоих генотипов гибридной кукурузы без наблюдаемого значимого взаимодействия. Применение этих штаммов грибов обеспечивало значимый уровень защиты корней и снижение появления взрослых особей в результате непосредственной смертности *D. virgifera virgifera*, указывая на то, что эти грибы являются важными новыми средствами для применения при разработке интегрированных программ по борьбе с вредителями в отношении этого насекомого. В одном аспекте штаммы можно применять для повышения устойчивости инсектицидного признака.

#### **ПРИМЕР 3**

Биологические анализы целых растений в условиях теплицы проводили с помощью штамма 15013-1 в качестве биологической обработки семени для контроля *D. virgifera virgifera*. Споры грибов применяли в отношении семени гибридной кукурузы в лаборатории непосредственно перед посадкой в смесь 50:50 коммерческой почвы для горшков и верхнего слоя почвы. Споры грибов суспендировали в 10% растворе гуммиарабика (для облегчения прилипания спор к семени), в который погружали

лишенные оболочки семена кукурузы на 1-2 минуты. Оцениваемые дозы для обработки семени составляли  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  и  $1 \times 10^6$  КОЕ/семя. Обработка отрицательного контроля состояла из семени, необработанного спорами грибов, и погруженного в 10% раствор гуммиарабика в отдельности. Эксперимент представлял собой полный факторный план с двумя факторами (обработка семян и идиоплазма). Используемые семена состояли из докоммерческого гибрида кукурузы DuPont Pioneer либо с инсектицидным признаком (DP-4114, PCT/US10/60818), либо растения дикого типа того же генетического фона без инсектицидного признака с активностью в отношении *D. virgifera virgifera*. Пятнадцать отдельных семян гибридной кукурузы (каждого типа) высаживали в пластиковые горшки объемом 3,78 л и содержали в теплице (80°F, 15:9 L:D) и по мере необходимости поливали. Когда растения достигали стадии листьев V2, их заражали 100 не находящимися в диапаузе яйцами *D. virgifera virgifera*. Растения контролировали ежедневно и анализ завершали через 14 дней после появления первого жука. Число взрослых особей *D. virgifera virgifera*, которые появлялись из каждого горшка, определяли в GH аналогичным образом, как описано в Meihls et al. (2008) PNAS 105: 19177-19182. В этих биологических анализах появление взрослых особей не подсчитывали; анализ оценивали по первому появлению жука. Растения срезали над линией почвы, затем корневой ком промывали и определяли индекс повреждения узлов (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (таблица 3). Ожидаемый индекс CRWNIS рассчитывали, как в примере 2.

Таблица 3.

ШТАММ	ИНДЕКС CRWNIS WT	ИНДЕКС CRWNIS DP-4114
15013-1 при ~ $1 \times 10^4$ /семя	0,53	0,41
15013-1 при ~ $1 \times 10^5$ /семя	0,57	0,39
15013-1 при ~ $1 \times 10^6$ /семя	0,49	0,35

Необработанный		
контроль	0,63	0,34

### **Результаты**

Применение средства для обработки семени на основе штамма 15013-1 в отношении лишнего оболочки семени в целом снижало степень повреждения корней, вызванного *D. virgifera virgifera* (таблица 3). Степень поедания *D. virgifera virgifera* в этом анализе в условиях теплицы было незначительным. Как результат, степень поедания насекомыми была наибольшей в случае генотипа кукурузы без PIP, который способствовал тому, чтобы влияние обработки семени грибами было наиболее видимым. Экспериментальное применение спор грибов в отношении семени кукурузы в этом примере с помощью 10% раствора гуммиарабика и полученных в результате характеристик, сравниваемых с наиболее эффективными характеристиками, наблюдаемыми в примере 6 (таблица 7), вероятно, находились под влиянием применения оборудования для коммерческой обработки семени и коммерческих полимеров, который приводили к более однородному и устойчивому применению спор грибов в отношении семени кукурузы.

### **ПРИМЕР 4**

Биологические анализы целых растений в условиях теплицы проводили с помощью штамма 15013-1 в качестве биологической обработки семени для контроля *D. virgifera virgifera* в отдельности и в комбинации с коммерческими применяемыми в отношении семени химическими веществами. Семя гибридной кукурузы вначале обрабатывали стандартными коммерчески доступными применяемыми в отношении семени инсектицидами и фунгицидами и давали высохнуть. Затем споры грибов вносили непосредственно перед посадкой в смесь 50:50 коммерческой почвы для горшков и верхнего слоя почвы. Споры грибов суспендировали в 10% растворе гуммиарабика (для облегчения прилипания спор к семени), в который погружали семена кукурузы на 1-2 минуты. Оцениваемые дозы для обработки семени составляли  $1 \times 10^7$  и  $1 \times 10^8$  КОЕ/семя. Обработка отрицательного контроля состояла из семени, обработанного 10% раствором гуммиарабика в отдельности, или

применяемых в отношении семени химических веществ и 10% раствора гуммиарабика. Эксперимент представлял собой полный факторный план с двумя факторами (обработка семян и идиоплазма). Используемые семена состояли из докоммерческого гибрида кукурузы DuPont Pioneer либо с инсектицидным признаком (DP-4114, PCT/US10/60818), либо растения дикого типа того же генетического фона без инсектицидного признака с активностью в отношении *D. virgifera virgifera*. Пятнадцать отдельных семян гибридной кукурузы (каждого типа) высаживали в пластиковые горшки объемом 3,78 л и содержали в теплице (80°F, 15:9 L:D) и по мере необходимости поливали. Когда растения достигали стадии листьев V2, их заражали 100 не находящимися в диапаузе яйцами *D. virgifera virgifera*. Растения контролировали ежедневно и анализ завершали через 14 дней после появления первого жука. Число взрослых особей *D. virgifera virgifera*, которые появлялись из каждого горшка, определяли в GH аналогичным образом, как описано в Meihls et al. (2008) PNAS 105: 19177-19182. В этих биологических анализах появление взрослых особей не подсчитывали; анализ оценивали по первому появлению жука. Растения срезали над линией почвы и затем корневой ком промывали и определяли индекс повреждения узлов (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (таблица 4). Ожидаемый индекс CRWNIS и появление взрослых особей рассчитывали, как в примере 2.

Таблица 4.

ШТАММ	ИНДЕКС CRWNIS WT	ИНДЕКС CRWNIS DP-4114	ПОЯВЛЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ WT	ПОЯВЛЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ DP- 4114
15013-1 при ~1×10 <sup>7</sup> /семя с гуммиарабиком	0,53	0,25	1,19	0,42
15013-1 при ~1×10 <sup>8</sup> /семя с гуммиарабиком	0,61	0,24	1,31	0,43

15013-1 при ~1×10 <sup>7</sup> /семя с гуммиарабином и применяемыми в отношении семени химическими веществами	0,65	0,19	1,06	0,13
15013-1 при ~1×10 <sup>8</sup> /семя с гуммиарабином и применяемыми в отношении семени химическими веществами	0,52	0,17	1,07	0,65
Контроль с гуммиарабином	0,91	0,30	1,12	0,21
Контроль с гуммиарабином и применяемыми в отношении семени химическими веществами	0,55	0,17	0,66	0,18

#### **Результаты обработки семени**

Применение средства для обработки семени на основе штамма 15013-1 снижало степень повреждения корней *D. virgifera virgifera* в случае обоих генотипов кукурузы при применении в отдельности или в комбинации с химическими средствами для обработки семени. Степень поедания *D. virgifera virgifera* в обоих из экспериментов по обработке семени в условиях теплицы была незначительной. Как результат, степень поедания насекомыми была наибольшей в случае генотипа кукурузы без инсектицидного признака, который способствовало тому, чтобы влияние каждой обработки семени было наиболее видимым (таблица 4). Штамм 15013-1, применяемый в отдельности или в комбинации с химической обработкой семени, снижал степень поедания личинками *D.*

*virgifera virgifera* (таблица 4). Влияние биологической обработки семени на появление взрослых особей было более слабым (таблица 4). Экспериментальное применение спор грибов в отношении семени кукурузы в этом примере с помощью 10% раствора гуммиарабика и полученных в результате характеристик, сравниваемых с наиболее эффективными характеристиками, наблюдаемыми в примере 6 (таблица 7), вероятно, находились под влиянием применения оборудования для коммерческой обработки семени и коммерческих полимеров, который приводили к более однородному и устойчивому применению спор грибов в отношении семени кукурузы.

#### **ПРИМЕР 5**

##### **Методика биологического анализа введения в почву**

Биологические анализы целых растений в условиях теплицы проводили с наиболее эффективными штаммами энтомопатогенных грибов, идентифицированными в лабораторных биологических анализах. Штаммы грибов вводили непосредственно перед посадкой в смесь 50:50 коммерческой почвы для горшков и верхнего слоя почвы при норме, эквивалентной полевому применению, составляющему  $2 \times 10^{13}$  КОЕ/акр. Обработка отрицательного контроля состояла из почвы, в которую не вводили споры грибов. Эксперимент представлял собой полный факторный план с двумя факторами (штамм и генотип грибов). Используемые семена состояли из докоммерческого гибрида кукурузы DuPont Pioneer либо с инсектицидным признаком DP-4114 (DP-4114, US 8575434), DP-4114 x MIR604 (DP-4114, US 8575434), MIR604 (US 8884102), либо растений дикого типа того же генетического фона без инсектицидного признака с активностью в отношении *D. virgifera virgifera*. Пятнадцать отдельных семян гибридной кукурузы (каждого типа) высаживали в пластиковые горшки объемом 3,78 л и содержали в теплице (80°F, 15:9 L:D) и по мере необходимости поливали. Когда растения достигали стадии листьев V2, их заражали 100 находящимися в диапаузе яйцами *D. virgifera virgifera*. Растения контролировали ежедневно и анализ завершали через 14 дней после появления первого жука. Число взрослых особей *D. virgifera virgifera*, которые появлялись из каждого горшка, определяли в GH

аналогичным образом, как описано в Meihls et al. (2008) *PNAS* 105: 19177-19182. В этих биологических анализах появление взрослых особей не подсчитывали; анализ оценивали по первому появлению жука. По завершению анализа растения срезали над линией почвы и подсчитывали общее число взрослых особей (таблица 5). Затем корневой ком промывали и определяли индекс повреждения узлов (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (таблица 6). Ожидаемый индекс CRWNIS и появление взрослых особей рассчитывали, как в примере 2.

Таблица 5.

ШТАММ	ПОЯВЛЕНИЕ	ПОЯВЛЕНИЕ	ПОЯВЛЕНИЕ	ПОЯВЛЕНИЕ
	ВЗРОСЛЫХ	ВЗРОСЛЫХ	ВЗРОСЛЫХ	ВЗРОСЛЫХ
	ОСОБЕЙ WT*	ОСОБЕЙ DP-	ОСОБЕЙ DP-	ОСОБЕЙ
		4114*	4114xMIR604*	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
Отрицательный контроль	7,18b	9,76b	8,64b	10,75b

\* Парные сравнения выполняли, сравнивая каждый штамм гриба с отрицательным контролем с учетом каждого генотипа. Использовали критерий множественных сравнений Даннетта и скорректированные р-значения считали статистически значимыми при менее 0,05. Средние значения из того же биологического анализа ГН с различными буквами ("a" или "b") (CRWNIS или появление взрослых особей) в пределах генотипа гибрида кукурузы (WT или DP-4114) были достоверно различными ( $P < 0,05$ ).

Таблица 6.

ШТАММ	ИНДЕКС	ИНДЕКС	ИНДЕКС	ИНДЕКС
	CRWNIS	CRWNIS DP-	CRWNIS DP-	CRWNIS
	WT*	4114*	4114xMIR604*	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
Отрицательный контроль	1,47b	0,56b	0,18b	0,73b

\* Парные сравнения выполняли, сравнивая каждый штамм

гриба с отрицательным контролем с учетом каждого генотипа. Использовали критерий множественных сравнений Даннетта и скорректированные р-значения считали статистически значимыми при менее 0,05. Средние значения из того же биологического анализа GH с различными буквами ("a" или "b") (CRWNIS или появление взрослых особей) в пределах генотипа гибрида кукурузы (WT, DP-4114, или DP4114\*MIR604, или MIR604) были достоверно различными ( $P < 0,05$ ).

### **Результаты биологического анализа**

Все штаммы энтомопатогенных грибов, оцениваемые в анализе в условиях теплицы, значительно снижали степень повреждения корней во всех генотипах оцениваемой гибридной кукурузы, за исключением 15013-1 при применении в отношении DP-4114xMIR604. Однако 15013-1 снижал повреждение корней вследствие поедания на более 50% по сравнению с пирамидированным признаком продукта DP-4114xMIR604 в отдельности. Эффективность, обеспечиваемая каждым из энтомопатогенных грибов при введении при посадке, была аддитивной без значимого взаимодействия с точки зрения эффективности насекомых, при использовании с инсектицидным признаком или без него. Штаммы грибов BcAll значимо снижали число взрослых жуков *D. virgifera virgifera*, которые появлялись при введении в почву при посадке всех оцениваемых генотипов гибридной кукурузы, за исключением 3213-1 при применении в отношении DP-4114 в отдельности. Однако 3213-1 снижал степень появления взрослых особей на более 20% по сравнению с DP-4114 в отдельности. Снижение появления взрослых жуков, обеспечиваемое каждым из энтомопатогенных грибов при введении при посадке, была аддитивной без значимого взаимодействия при использовании с инсектицидным признаком или без него. Применение этих штаммов грибов обеспечивало значимый уровень защиты корней и снижение появления взрослых особей в результате непосредственной смертности *D. virgifera virgifera*, указывая на то, что эти грибы являются важными новыми средствами для применения при разработке интегрированных программ по борьбе с вредителями в отношении этого насекомого. В одном аспекте штаммы можно применять для повышения устойчивости инсектицидного признака.

**ПРИМЕР 6****Методика биологического анализа коммерческой обработки семени**

Биологические анализы целых растений в условиях теплицы проводили со штаммами энтомопатогенных грибов, идентифицированными в примере 1. Штаммы грибов применяли в качестве средств биологической обработки семени при целевой концентрации  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  КОЕ/семя вместе со стандартными коммерческими применяемыми в отношении семени инсектицидами (тиаметоксам и хлорантранилипрол), фунгицидами (азоксистробин, флудиоксонил, тиабендазол, металаксил и тебуконазол) и полимерами. Конидиоспоры применяли в виде водного жидкого состава или последовательно в виде сухих конидиоспор с полимером для обработки семени на предварительно химически обработанное семя. Как составы спор грибов, так и все применяемые в отношении семени химические вещества применяли с помощью коммерческого устройства для протравливания. Семя высаживали в смесь 50:50 коммерческой почвы для горшков и верхнего слоя почвы. Обработка отрицательного контроля состояла из семени без спор грибов, но обработанных теми же стандартными и коммерчески доступными применяемыми в отношении семян инсектицидами, фунгицидами, красителями, биологическими препаратами и полимерами. Эксперимент представлял собой полный факторный план с двумя факторами (штамм и генотип грибов). Используемые семена состояли из докоммерческого гибрида кукурузы DuPont Pioneer либо с инсектицидным признаком DP-4114 (DP-4114, PCT/US10/60818), либо растений дикого типа того же генетического фона без инсектицидного признака с активностью в отношении *D. virgifera virgifera*. Пятнадцать отдельных семян гибридной кукурузы (каждого типа) высаживали в пластиковые горшки объемом 3,78 л и содержали в теплице (80°F, 15:9 L:D) и по мере необходимости поливали. Когда растения достигали стадии листьев V2, их заражали 100 не находящимися в диапаузе яйцами *D. virgifera virgifera*. Растения контролировали ежедневно и анализ завершали через 14 дней после появления первого жука. Число взрослых

особей *D. virgifera virgifera*, которые появлялись из каждого горшка, определяли в GH аналогичным образом, как описано в Meihls et al. (2008) *PNAS* 105: 19177-19182. В этих биологических анализах появление взрослых особей не подсчитывали; анализ оценивали по первому появлению жука. По завершению анализа растения срезали над линией почвы и подсчитывали общее число взрослых особей (таблица 7). Затем корневой ком промывали и определяли индекс повреждения узлов (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (таблица 7).

Таблица 7.

ШТАММ	СОСТАВ	ПОЯВЛЕНИЕ	ПОЯВЛЕНИЕ	ИНДЕКС	ИНДЕКС
		ВЗРОСЛЫХ	ВЗРОСЛЫХ	CRWNIS	CRWNIS
		ОСОБЕЙ WT*	ОСОБЕЙ DP-4114*	WT*	DP-4114*
15013-1	Жидкий	8,32	6,65	0,56a	0,12a
3213-1	Жидкий	6,99	6,99	0,60a	0,13a
23013-3	Жидкий	10,26	7,72	0,44a	0,16a
15013-1	Последова тельный	7,84	7,18	0,57a	0,19a
3213-1	Последова тельный	8,06	8,12	0,56a	0,16a
23013-3	Последова тельный	9,22	7,13	0,49a	0,25a
Отрицатель ный	Н/Д	10,36	7,89	0,82b	0,41b
контроль					

\* Парные сравнения выполняли, сравнивая каждый штамм гриба с отрицательным контролем с учетом каждого генотипа. Использовали критерий множественных сравнений Даннетта и скорректированные р-значения считали статистически значимыми при менее 0,05. Средние значения из того же биологического анализа GH с различными буквами ("a" или "b") (CRWNIS или появление взрослых особей) в пределах генотипа гибрида кукурузы (WT или DP-4114) были достоверно различными ( $P < 0,05$ ).

#### Результаты биологического анализа

Все штаммы энтомопатогенных грибов, в обоих типах составов,

оцениваемые в биологическом анализе в условиях теплицы, снижали степень повреждения корней как в WT, так и в гибридной кукурузе с признаком DP-4114, при доставке в виде обработки семени вместе со стандартными применяемыми в отношении семени химическими веществами. Это было неожиданным, поскольку рост и прорастание *Metarhizium* spp. значимо замедлялись в результате действия всех применяемых в отношении семени кукурузы фунгицидов с активностью в отношении мицелиальных грибов, как в примере 8. Эффективность, обеспечиваемая каждым из энтомопатогенных грибов при применении в виде обработки семени, была аддитивной без значимого взаимодействия с точки зрения эффективности насекомых, при использовании с инсектицидным признаком DP-4114 и без него. Применение этих штаммов грибов обеспечивало значимые уровни аддитивной защиты корней и в среднем снижало число взрослых особей, которые появлялись из каждого горшка. Эти данные указывают на то, что грибы являются важными новыми средствами для применения при разработке интегрированных программ по борьбе с вредителями в отношении *Diabrotica virgifera virgifera*, и их можно эффективно доставлять в виде обработки семени во многих типах составов, даже в присутствии фунгицида, либо предварительно смешанными в виде жидкости с фунгицидом, либо примененными в отношении семени, уже обработанного фунгицидом.

#### **ПРИМЕР 7**

##### **Методика биологического анализа введения в почву**

Биологические анализы целых растений в условиях теплицы проводили с эффективными штаммами энтомопатогенных грибов, идентифицированными в лабораторных биологических анализах. Штаммы грибов вводили непосредственно перед посадкой в смесь 50:50 коммерческой почвы для горшков и верхнего слоя почвы при норме, эквивалентной полевому применению, составляющему  $2 \times 10^{13}$  КОЕ/акр. Обработка отрицательного контроля состояла из почвы, в которую не вводили споры грибов. Эксперимент представлял собой полный факторный план с двумя факторами (штамм и генотип грибов). Используемые семена состояли из гибридов кукурузы, либо с инсектицидным признаком, RyanR (DvSSJ1, 2014/0275208 и

US2015/0257389), IPD072 (PCT/US14/55128), либо растений того же генетического фона без инсектицидного признака с активностью в отношении *D. virgifera virgifera*. Пятнадцать отдельных семян гибридной кукурузы (каждого типа) высаживали в пластиковые горшки объемом 3,78 л и содержали в теплице (80°F, 15:9 L:D) и по мере необходимости поливали. Когда растения достигали стадии листьев V2, их заражали 100 не находящимися в диапаузе яйцами *D. virgifera virgifera*. Растения контролировали ежедневно и анализ завершали через 14 дней после появления первого жука. Число взрослых особей *D. virgifera virgifera*, которые появлялись из каждого горшка, определяли в GH аналогичным образом, как описано в Meihls et al. (2008) *PNAS* 105: 19177-19182. По завершению анализа растения срезали над линией почвы и подсчитывали общее число взрослых особей (таблица 8). Затем корневой ком промывали и определяли индекс повреждения узлов (CRWNIS) (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.) (таблица 8). Ожидаемый индекс CRWNIS и появление взрослых особей рассчитывали, как в примере 2.

Таблица 8

ШТАММ	ИНДЕКС CRWNIS	ИНДЕКС CRWNIS	ИНДЕКС CRWNIS
	WT*	DvSSJ1*	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
Отрицательный контроль	1,10b	0,12b	0,08b
ШТАММ	ПОЯВЛЕНИЕ	ПОЯВЛЕНИЕ	ПОЯВЛЕНИЕ
	ВЗРОСЛЫХ	ВЗРОСЛЫХ	ВЗРОСЛЫХ
	ОСОБЕЙ WT*	ОСОБЕЙ DvSSJ1*	ОСОБЕЙ 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
Отрицательный контроль	18,13b	11,26b	10,27b

\* Парные сравнения выполняли, сравнивая каждый штамм

гриба с отрицательным контролем с учетом каждого генотипа. Использовали критерий множественных сравнений Даннетта и скорректированные р-значения считали статистически значимыми при менее 0,05. Средние значения из того же биологического анализа GH с различными буквами ("a" или "b") (CRWNIS или появление взрослых особей) в пределах генотипа гибрида кукурузы (WT, DvSSJ1 или IPD072) были достоверно различными ( $P < 0,05$ ).

#### **Результаты биологического анализа**

Все штаммы энтомопатогенных грибов, оцениваемые в анализе в условиях теплицы, значительно снижали степень повреждения корней во всех генотипах оцениваемой гибридной кукурузы, за исключением штаммов 3213-1 и 23013-3 при применении в отношении DvSSJ1. Эффективность, обеспечиваемая каждым из энтомопатогенных грибов при введении при посадке, была аддитивной без значимого взаимодействия с точки зрения эффективности насекомых, при использовании с инсектицидным признаком или без него. Штаммы грибов VcAll значимо снижали число взрослых жуков *D. virgifera virgifera*, которые появлялись при введении в почву при посадке всех оцениваемых генотипов гибридной кукурузы, за исключением штаммов 3213-1 и 23013-3 при применении в отношении IPD072. Однако 3213-1 снижал степень появления взрослых особей на 10% по сравнению с IPD072 в отдельности. Снижение появления взрослых жуков, обеспечиваемое каждым из энтомопатогенных грибов при введении при посадке, была аддитивной без значимого взаимодействия при использовании с инсектицидным признаком или без него. Применение штаммов грибов обеспечивало значимый уровень защиты корней и снижение появления взрослых особей в результате непосредственной смертности *D. virgifera virgifera* с инсектицидными признаками в виде белка и RNAi, не происходящими из *Bacillus thuringiensis*. Результаты показывают, что штаммы можно применять для повышения устойчивости отличных от *Bacillus thuringiensis* инсектицидных признаков.

#### **ПРИМЕР 8**

##### **Определение восприимчивости к фунгицидам у *Metarhizium* spp.**

Конидии *Metarhizium anisopliae* (15013-1) и *Metarhizium robertsii* (23013-3) получали в результате выращивания гриба в

планшетах с картофельным агаром с декстрозой в течение 1-2 недель при 23°C при непрерывном освещении флуоресцентным светом. Конидии собирали с планшета в воду, содержащую Tween-20 (0,01%) и подсчитывали с помощью гемацитометра. Восприимчивость к фунгицидам определяли с помощью смешивания 5000 конидий в 0,5 мл УМА (2 г дрожжевого экстракта, 4 г солодового экстракта на литр) жидких сред, содержащих различные концентрации коммерчески доступных фунгицидов, активных в отношении мицелиальных грибов, в 24-луночной планшете. Планшеты инкубировали в течение ~24 часов при 26°C и затем оценивали рост по визуальному наблюдению с помощью стереомикроскопа.

#### Таблица 9.

15013-1 (конидии в контроле, "без соединения" (NC) показали одиночные длинные проростковые трубочки, >20X диаметр проростковой трубочки. В результате роста грибов полностью заполнялась лунка.)

#### Концентрация фунгицидов

	3 мкМ	10 мкМ	30 мкМ
<b>Азоксистробин</b>	++	+	-
<b>Флудиоксонил</b>	+	+	+
<b>Тиабендазол</b>	++++	++++	++++

"++++" означает рост на приблизительно 50% или более по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"+++ " означает рост на приблизительно 30% или подавление на приблизительно 70% по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"++" означает рост на приблизительно 20% или подавление на приблизительно 80% по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"+" означает рост на приблизительно 10% или подавление на приблизительно 90% по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"-" означает отсутствие роста или полное подавление по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

#### Таблица 10.

23013-3 (конидии в контроле, "без соединения" (НС) конидии показали длинные проростковые трубочки, >20X диаметр проростковой трубочки. В результате роста грибов почти полностью заполнялась лунка.)

#### Концентрация фунгицидов

	3 мкМ	10 мкМ	30 мкМ
<b>Азоксистробин</b>	+	-	-
<b>Флудиоксонил</b>	+	+	+
<b>Тиабендазол</b>	+++	++++	++++

"++++" означает рост на приблизительно 50% или более по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"+++ " означает рост на приблизительно 30% или подавление на приблизительно 70% по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"++" означает рост на приблизительно 20% или подавление на приблизительно 80% по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"+" означает рост на приблизительно 10% или подавление на приблизительно 90% по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

"-" означает отсутствие роста или полное подавление по сравнению с контролем без какого-либо фунгицида.

#### Результаты

*M. anisopliae* и *M. robertsii* были восприимчивыми к активным ингредиентам в коммерчески доступном средстве для обработки семени с известной активностью в отношении мицелиальных грибов (таблица 9 и таблица 10).

#### ПРИМЕР 9

##### Отбор штаммов *Metarhizium*, устойчивых к фунгицидам

Выделение штаммов грибов, устойчивых к фунгицидам, имеет преимущество в том, что устойчивость к фунгицидам наиболее часто возникает в результате одной точечной мутации в гене, который кодирует этой белок, на который нацелен фунгицид. Эта точечная мутация приводит к аминокислотному изменению в белке, которое снижает связывание фунгицида с целевым белком и придает штамму, несущему эту мутацию, высокий уровень устойчивости к фунгициду.

Изоляты грибов, устойчивых к фунгицидам, отбирали следующим образом. Конидии *Metarhizium* spp. получали в результате выращивания гриба в планшетах с картофельным агаром с декстрозой в течение 1-2 недель при 23°C при непрерывном освещении флуоресцентным светом. Конидии собирали, подсчитывали и разбавляли до 10000000/мл в воде. Затем конидии подвергали воздействию мутагена в течение различных промежутков времени. Например, конидии могли подвергать воздействию УФ-света в течение 0,5-3 минут или этилметансульфоната (2-3% в течение 30-60 минут). После воздействия мутагена конидии оставляли для восстановления и экспрессии устойчивой формы белка с помощью погружения их в расплавленную агарозу YMA с низкой температурой плавления. Планшеты инкубировали в течение приблизительно 24 часов при 26°C. После периода восстановления конидии подвергали воздействию селективного соединения (например, азоксистробина, флудиоксонила или тиабендазола) с помощью наложения на конидии второго слоя агарозы YMA, содержащей селективный фунгицид. Фунгицид применяли в концентрации в приблизительно 10 раз выше, чем минимальная концентрация, необходимая для подавления роста грибов. Планшеты, содержащие конидии, выращиваемые в присутствии фунгицида, затем инкубировали в течение 3-10 дней и контролировали периодически на наличие роста грибов. При обнаружении растущих колоний их асептическим образом удаляли из планшетов для отбора и переносили на новые среды для роста. После роста на средах без фунгицида изоляты исследовали на наличие устойчивости к фунгицидам в результате воздействия на них различных концентраций фунгицидов и их восприимчивости по сравнению с восприимчивостью штамма дикого типа. Предполагают, что выбранный штамм будет характеризоваться более высокой эффективностью в подавлении растительного патогена, вредителя или насекомого в присутствии средства обработки семени, содержащего фунгицид, или применения других фунгицидов в отношении растения или части растения.

#### **ПРИМЕР 10**

Двенадцать исследуемых участков размещали в областях

коммерческого выращивания маиса Северной Америки, где возникают заражения *Diabrotica virgifera virgifera* (WCRW) и *Diabrotica barberi* (NCRW). Места посадок включали Брукингс, Северная Дакота; Гудленд, Индиана; Фаулер, Индиана; (2) Джонстон, Айова; Сеймур, Иллинойс; Манкейто, Миннесота; Йорк, Небраска; Графтон, Небраска и Рошель, Иллинойс.

Опытные хозяйства включали семена, обработанные, как в примере 6, и их высаживали на однорядной делянке маиса 10 футов в длину с промежутком между рядами 30 дюймов. Организовывали четыре повтора на обработку в мелко-деляночной схеме с генотипом кукурузы в качестве основной делянки и обработкой семян в качестве подделянки. Каждое экспериментальное хозяйство заражали примерно 750 яйцами западного кукурузного жука на ранней вегетативной стадии и 2 растения/экспериментальное хозяйство выкапывали и присваивали CRWNIS. Использовали гибриды кукурузы без признака. Штаммы грибов применяли в отношении семян вместе со стандартными коммерческими применяемыми в отношении семян инсектицидами (тиаметоксам и хлорантранилипрол), фунгицидами (азоксистробин, флудиоксонил, тиабендазол, металаксил и тебуконазол) и полимерами. Норма каждого инсектицида (250 мг активного ингредиента/семя) представляла собой обозначенную норму для контроля определенных вторичных насекомых-вредителей маиса. Однако при используемых нормах ни одна из стандартных инсектицидных обработок семян не обеспечивала активность в отношении кукурузного жука. Положительным контролем обработки семян для CRW был PonchoVotivo 1250®. По завершению полевого эксперимента растения срезали над линией почвы, промывали корневой ком и определяли CRWNIS (Oleson et al. 2005, *Journal of Economic Entomology* 98: 1-8.).

#### **Статистический анализ**

Компьютерную программу ASReml версии 3.0, доступную по TTRS (Transgenic Trait Research System), использовали для подбора линейных смешанных моделей и исследования разниц, представляющих интерес. С целью лучшего соответствия допущениям модели, перед

анализом наблюдаемые значения CRWINS преобразовывали с помощью преобразования квадратного корня. Наилучшие линейные несмещенные оценки отмечали для обработок семени после обратного преобразования. Парные сравнения выполняли среди обработок семени, при этом разница считалась статистически значимой, если р-значение тестирования различия составляло менее 0,05.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

При оценке активных средств в отношении их эффективности против WCRW и NCRW наиболее информативными локациями были таковые с высоким давлением насекомых ( $>1,5$  узлов поедания CRW). Когда две локации из полевых исследований 2015 года (Джонстон, Айова и Йорк, Небраска) объединяли для анализа, жидкий состав штамма 3213-1, применяемый в качестве средства для обработки семени в отношении генотипа без признака обеспечивал статистически значимую защиту корней по сравнению с отрицательным контролем при уровне достоверности 0,05 (фигура 1). Уровень контроля со стороны жидкого состава 3213-1 в генотипе без признака при высоком давлении кукурузного жука был статистически подобным эффективности, обеспечиваемой с помощью применяемого в настоящее время коммерческого стандартного средства обработки семени (Poncho Votivo 1250®) для контроля кукурузного жука (фигура 1). Относительная общая функциональная активность всех штаммов грибов в обоих составах (жидком и сухом последующем) улучшала защиту корней гибридов без признака примерно на 0,25 узла по сравнению с отрицательным контролем.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, отражают уровень специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации, патенты и патентные заявки включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки во всей своей полноте.

Хотя в целях ясности понимания вышеприведенное изобретение было довольно подробно описано посредством иллюстрации и примера, на практике можно осуществлять определенные изменения и

модификации в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Композиция, содержащая приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель, растение или часть растения и грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1.

2. Композиция по п. 1, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка, нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

3. Композиция по п. 1, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида.

4. Композиция по п. 3, где агрохимически активное соединение представляет собой фунгицид.

5. Композиция по п. 4, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиоконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

6. Композиция по п. 1, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, триглюкозаминлипоглицинового соли, изофлавона и модулятора рианодинового рецептора.

7. Композиция по п. 1, где растение или часть растения являются генетически модифицированными или трансгенными.

8. Композиция по п. 7, где генетически модифицированная часть растения представляет собой семя.

9. Композиция по п. 7, где генетически модифицированная часть растения представляет собой лист.

10. Композиция по п. 1, где грибковый энтомопатоген сохраняет инсектицидную активность в присутствии фунгицида или является устойчивым к фунгициду.

11. Композиция по п. 1, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

12. Композиция по п. 1, где грибковый энтомопатоген

представляет собой конидию.

13. Композиция по п. 1, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

14. Композиция, содержащая генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения, содержащие некоторый признак, и грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1.

15. Композиция по п. 14, где признак обеспечивает контроль вредителя растений отряда жесткокрылых.

16. Композиция по п. 15, где вредитель растения отряда жесткокрылых представляет собой вредителя растений *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barbieri* или *Diabrotica speciosa*.

17. Композиция по п. 14, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка, нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

18. Композиция по п. 14, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида.

19. Композиция по п. 18, где агрохимически активное соединение представляет собой фунгицид.

20. Композиция по п. 19, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиоконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

21. Композиция по п. 14, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, триглюкозаминлипоглициновой соли, изофлавона и модулятора рианодинового рецептора.

22. Композиция по п. 14, где генетически модифицированное растение или трансгенное растение или часть растения дополнительно содержат дополнительный признак, выбранный из группы, состоящей из инсектицидного признака и признака

переносимости гербицидов.

23. Композиция по п. 14, где генетически модифицированная часть растения представляет собой семя.

24. Композиция по п. 14, где генетически модифицированная часть растения представляет собой лист.

25. Композиция по п. 14, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

26. Композиция по п. 14, где грибковый энтомопатоген представляет собой конидию.

27. Композиция по п. 14, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

28. Композиция по п. 14, где признак представляет собой инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых.

29. Композиция по п. 28, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой объект, выбранный из группы, состоящей из объекта MON863, объекта MIR604, объекта 5307, объекта DAS-59122, объекта DP-4114, объекта MON 87411 и объекта MON88017.

30. Композиция по п. 28, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой отличный от *Vt* инсектицидный признак, выбранный из группы, состоящей из инсектицидного белка и элемента сайленсинга.

31. Композиция по п. 30, где инсектицидный белок выбран из группы, состоящей из инсектицидного белка, полученного из растения, инсектицидного белка, полученного из бактерии/археи, отличного от *Vt*, инсектицидного белка, полученного из животного, полипептида AfIP-1A и/или AfIP-1B, полипептида PHI-4, полипептида PIP-47, полипептида PIP-72, полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65, полипептида PtIP-83 и полипептида PtIP-96.

32. Композиция по п. 30, где элемент сайленсинга нацелен на ген, выбранный из группы, состоящей из PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATразы, коатомерной субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  COPI и RPS10.

33. Композиция, содержащая фунгицид и грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* и *Metarhizium robertsii*.

34. Композиция по п. 33, где композиция дополнительно содержит состав для обработки семени или состав для внекорневого применения.

35. Композиция по п. 33, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка, нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

36. Композиция по п. 33, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, бактерицида и нематоцида.

37. Композиция по п. 36, где агрохимически активное соединение представляет собой инсектицид.

38. Композиция по п. 33, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиоконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

39. Композиция по п. 33, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, триглюкозаминлипоглицинового соли, изофлавона и модулятора рианодинового рецептора.

40. Композиция по п. 33, дополнительно содержащая генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения.

41. Композиция по п. 40, где генетически модифицированная часть растения представляет собой семя.

42. Композиция по п. 40, где генетически модифицированная часть растения представляет собой лист.

43. Композиция по п. 33, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

44. Композиция по п. 43, где грибковый энтомопатоген представляет собой конидию.

45. Композиция по п. 43, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

46. Композиция по п. 40, где генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения содержат

инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых.

47. Композиция по п. 46, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой объект, выбранный из группы, состоящей из объекта MON863, объекта MIR604, объекта 5307, объекта DAS-59122, объекта DP-4114, объекта MON 87411 и объекта MON88017.

48. Композиция по п. 46, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой отличный от *Bt* инсектицидный признак, выбранный из группы, состоящей из инсектицидного белка и элемента сайленсинга.

49. Композиция по п. 48, где инсектицидный белок выбран из группы, состоящей из инсектицидного белка, полученного из растения, инсектицидного белка, полученного из бактерии/археи, отличного от *Bt*, инсектицидного белка, полученного из животного, полипептида AfIP-1A и/или AfIP-1B, полипептида PHI-4, полипептида PIP-47, полипептида PIP-72, полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65, полипептида PtIP-83 и полипептида PtIP-96.

50. Композиция по п. 48, где элемент сайленсинга нацелен на ген, выбранный из группы, состоящей из PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATразы, коатомерной субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  COP1 и RPS10.

51. Композиция, содержащая грибковый энтомопатоген и генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения, содержащие отличный от *Bt* инсектицидный признак, где отличный от *Bt* инсектицидный признак представляет собой инсектицидный белок или элемент сайленсинга.

52. Композиция по п. 51, где грибковый энтомопатоген выбран из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* и *Metarhizium robertsii*.

53. Композиция по п. 51, где грибковый энтомопатоген выбран из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1.

54. Композиция по п. 51, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка,

нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

55. Композиция по п. 51, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида.

56. Композиция по п. 55, где агрохимически активное соединение представляет собой фунгицид.

57. Композиция по п. 56, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиокконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

58. Композиция по п. 51, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, триглюкозаминлипоглицинового соли, изофлавона и модулятора рианодинового рецептора.

59. Композиция по п. 51, где генетически модифицированная часть растения представляет собой семя.

60. Композиция по п. 51, где генетически модифицированная часть растения представляет собой лист.

61. Композиция по п. 51, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

62. Композиция по п. 51, где грибковый энтомопатоген представляет собой конидию.

63. Композиция по п. 51, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

64. Композиция по п. 51, где инсектицидный белок выбран из группы, состоящей из инсектицидного белка, полученного из растения, инсектицидного белка, полученного из бактерии/археи, отличного от *Vt*, инсектицидного белка, полученного из животного, полипептида AfIP-1A и/или AfIP-1B, полипептида PHI-4, полипептида PIP-47, полипептида PIP-72, полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65, полипептида PtIP-83 и полипептида PtIP-96.

65. Композиция по п. 51, где элемент сайленсинга нацелен на ген, выбранный из группы, состоящей из PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATPазы, коатомерной субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  COPI и RPS10.

66. Способ повышения устойчивости растения к растительному

патогену, вредителю или насекомому, предусматривающий инокуляцию растения, части растения или среды, окружающей растение или часть растения, композицией, содержащей грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1.

67. Способ по п. 66, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка, нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

68. Способ по п. 66, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида.

69. Способ по п. 68, где агрохимически активное соединение представляет собой фунгицид.

70. Способ по п. 69, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиокконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

71. Способ по п. 66, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, триглюкозаминлипоглицинового соли, изофлавонона и модулятора рианодинового рецептора.

72. Способ по п. 66, где растение, часть растения или среда, окружающая растение или часть растения, дополнительно представляют собой генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения или среду, окружающую генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения.

73. Способ по п. 72, где генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения содержат инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых.

74. Способ по п. 73, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой признак *Bt*, элемент сайленсинга или отличный от *Bt* инсектицидный белок.

75. Способ по п. 66, где генетически модифицированная часть

растения представляет собой семя.

76. Способ по п. 66, где генетически модифицированная часть растения представляет собой лист.

77. Способ по п. 66, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

78. Способ по п. 66, где грибковый энтомопатоген представляет собой конидию.

79. Способ по п. 66, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

80. Способ по п. 74, где отличный от *Vt* инсектицидный белок выбран из группы, состоящей из инсектицидного белка, полученного из растения, инсектицидного белка, полученного из бактерии/археи, отличного от *Vt*, инсектицидного белка, полученного из животного, полипептида AfIP-1A и/или AfIP-1B, полипептида PNI-4, полипептида PIP-47, полипептида PIP-72, полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65, полипептида PtIP-83 и полипептида PtIP-96.

81. Способ по п. 74, где элемент сайленсинга нацелен на ген, выбранный из группы, состоящей из PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATразы, коатомерной субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  COP1 и RPS10.

82. Способ по п. 74, где признак *Vt* представляет собой объект, выбранный из группы, состоящей из объекта MON863, объекта MIR604, объекта 5307, объекта DAS-59122, объекта DP-4114, объекта MON 87411 и объекта MON88017.

83. Способ повышения устойчивости инсектицидного признака в отношении отряда жесткокрылых генетически модифицированных или трансгенных растения или части растения к растительному патогену, вредителю или насекомому, предусматривающий инокуляцию генетически модифицированных или трансгенных растения или части растения композицией, содержащей грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1, где генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения содержат инсектицидный признак отряда жесткокрылых.

84. Способ по п. 83, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка, нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

85. Способ по п. 83, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида.

86. Способ по п. 85, где агрохимически активное соединение представляет собой фунгицид.

87. Способ по п. 86, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиокконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

88. Способ по п. 83, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахариды, триглюкозаминлипоглицинового соли, изофлавоны и модулятора рианодинового рецептора.

89. Способ по п. 83, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой признак *Vt*, элемент сайленсинга или отличный от *Vt* инсектицидный белок.

90. Способ по п. 83, где генетически модифицированная часть растения представляет собой семя.

91. Способ по п. 83, где генетически модифицированная часть растения представляет собой лист.

92. Способ по п. 83, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

93. Способ по п. 83, где грибковый энтомопатоген представляет собой конидию.

94. Способ по п. 83, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

95. Способ по п. 89, где отличный от *Vt* инсектицидный белок выбран из группы, состоящей из инсектицидного белка, полученного из растения, инсектицидного белка, полученного из бактерии/археи, отличного от *Vt*, инсектицидного белка, полученного из животного, полипептида AfIP-1A и/или AfIP-1B,

полипептида PNI-4, полипептида PIP-47, полипептида PIP-72, полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65, полипептида PtIP-83 и полипептида PtIP-96.

96. Способ по п. 89, где элемент сайленсинга нацелен на ген, выбранный из группы, состоящей из PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATРазы, коатомерной субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  COPI и RPS10.

97. Способ по п. 89, где признак *Vt* представляет собой объект, выбранный из группы, состоящей из объекта MON863, объекта MIR604, объекта 5307, объекта DAS-59122, объекта DP-4114, объекта MON 87411 и объекта MON88017.

98. Способ повышения устойчивости растения к растительному патогену, вредителю или насекомому, предусматривающий инокуляцию растения, части растения или среды, окружающей растение или часть растения, композицией, содержащей фунгицид и грибковый энтомопатоген, выбранный из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* и *Metarhizium robertsii*.

99. Способ по п. 98, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка, нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

100. Способ по п. 98, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, бактерицида и нематоцида.

101. Способ по п. 100, где агрохимически активное соединение представляет собой инсектицид.

102. Способ по п. 101, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиоконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

103. Способ по п. 98, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахарида, триглюкозаминлипоглициновой соли, изофлавона и модулятора рианодинового рецептора.

104. Способ по п. 98, где растение, часть растения или

среда, окружающая растение или часть растения, дополнительно представляет собой генетически модифицированные или трансгенные растение, часть растения или среду, окружающую генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения.

105. Способ по п. 104, где генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения содержат инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых.

106. Способ по п. 105, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой признак *Bt*, элемент сайленсинга или отличный от *Bt* инсектицидный белок.

107. Способ по п. 98, где грибковый энтомопатоген выбран из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1.

108. Способ по п. 98, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

109. Способ по п. 98, где грибковый энтомопатоген представляет собой конидию.

110. Способ по п. 98, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

111. Способ по п. 106, где отличный от *Bt* инсектицидный белок выбран из группы, состоящей из инсектицидного белка, полученного из растения, инсектицидного белка, полученного из бактерии/археи, отличного от *Bt*, инсектицидного белка, полученного из животного, полипептида AfIP-1A и/или AfIP-1B, полипептида PNI-4, полипептида PIP-47, полипептида PIP-72, полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65, полипептида PtIP-83 и полипептида PtIP-96.

112. Способ по п. 106, где элемент сайленсинга нацелен на ген, выбранный из группы, состоящей из PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATразы, коатомерной субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  COPI и RPS10.

113. Способ по п. 106, где признак *Bt* представляет собой объект, выбранный из группы, состоящей из объекта MON863, объекта MIR604, объекта 5307, объекта DAS-59122, объекта DP-4114, объекта MON 87411 и объекта MON88017.

114. Способ повышения устойчивости отличного от *Bt*

инсектицидного признака генетически модифицированных или трансгенных растения или части растения к растительному патогену, вредителю или насекомому, предусматривающий инокуляцию генетически модифицированных или трансгенных растения или части растения композицией, содержащей грибковый энтомопатоген, где генетически модифицированные или трансгенные растение или часть растения содержат инсектицидный признак отряда жесткокрылых.

115. Способ по п. 114, где композиция дополнительно содержит средство биологического контроля, выбранное из группы, состоящей из бактерии, гриба, дрожжей, простейшего, вируса, энтомопатогенной нематоды, растительного экстракта, белка, нуклеиновой кислоты, вторичного метаболита и инокулянта.

116. Способ по п. 114, где композиция дополнительно содержит агрохимически активное соединение, выбранное из группы, состоящей из инсектицида, фунгицида, бактерицида и нематоцида.

117. Способ по п. 116, где агрохимически активное соединение представляет собой фунгицид.

118. Способ по п. 116, где фунгицид содержит фунгицидную композицию, выбранную из группы, состоящей из азоксистробина, тиабендазола, флудиоксонила, металаксила, тебуконазола, протиокконазола, ипконазола, пенфлуфена и седаксана.

119. Способ по п. 114, где композиция дополнительно содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из антидота, липохитоолигосахариды, триглюкозаминлипоглициновой соли, изофлавоны и модулятора рианодинового рецептора.

120. Способ по п. 114, где инсектицидный признак в отношении отряда жесткокрылых представляет собой элемент сайленсинга или отличный от *Bt* инсектицидный белок.

121. Способ по п. 114, где грибковый энтомопатоген выбран из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* и *Metarhizium robertsii*.

122. Способ по п. 114, где грибковый энтомопатоген выбран из группы, состоящей из *Metarhizium anisopliae* 15013-1, *Metarhizium robertsii* 23013-3 и *Metarhizium anisopliae* 3213-1.

123. Способ по п. 114, где генетически модифицированная часть растения представляет собой семя.

124. Способ по п. 114, где генетически модифицированная часть растения представляет собой лист.

125. Способ по п. 114, где грибковый энтомопатоген представляет собой спору.

126. Способ по п. 114, где грибковый энтомопатоген представляет собой конидию.

127. Способ по п. 114, где грибковый энтомопатоген представляет собой микросклероций.

128. Способ по п. 120, где отличный от *Bt* инсектицидный белок выбран из группы, состоящей из инсектицидного белка, полученного из растения, инсектицидного белка, полученного из бактерии/археи, отличного от *Bt*, инсектицидного белка, полученного из животного, полипептида AfIP-1A и/или AfIP-1B, полипептида PNI-4, полипептида PIP-47, полипептида PIP-72, полипептида PtIP-50 и полипептида PtIP-65, полипептида PtIP-83 и полипептида PtIP-96.

129. Способ по п. 120, где элемент сайленсинга нацелен на ген, выбранный из группы, состоящей из PAT3, RyanR, Sec23, Snf7, vATразы, коатомерной субъединицы  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$  COPI и RPS10.

По доверенности

