

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041967**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.20

(51) Int. Cl. *A01N 63/00* (2006.01)
A01C 1/06 (2006.01)

(21) Номер заявки
201991236

(22) Дата подачи заявки
2009.12.18

(54) **МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ БОРЬБЫ С НЕМАТОДАМИ С ПОМОЩЬЮ СПОР
PASTEURIA В ПОКРЫТИЯХ ДЛЯ СЕМЯН**

(31) **61/139,304**

(56) EP-A1-0214427
US-A1-20070074451
EP-A1-1961746

(32) **2008.12.19**

(33) **US**

(43) **2020.02.29**

(62) **201690811; 2009.12.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ
(CH)**

(72) Изобретатель:
**Хьюлетт Томас Э., Уотерс Джон П.,
Бермор Чарльз С. (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Данное изобретение предлагает новые и улучшенные способы борьбы с фитопатогенными нематодами путем нанесения на семена растений покрытия, содержащего эффективное количество спор *Pasteuria* и высевание указанных семян.

041967

B1

041967

B1

Ссылка на предыдущую заявку

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки № 61/139,304, представленной в Патентное ведомство США 19 декабря 2008 г., включенной путем ссылки на ее содержание, включая все фигуры, таблицы или рисунки.

Уровень техники

Потери урожая из-за паразитов - нематод превышают по оценкам 100 миллиардов долларов США. Предотвращение этих убытков представляет собой значительную проблему. Принимая во внимание дефицит фумиганта - метилбромида, в настоящее время имеется необходимость в разработках и регистрации новых синтетических соединений для контроля над нематодами. Таким образом, необходимы другие подходы.

С фитопатогенными нематодами бороться особенно сложно, потому что они покрыты толстой непроницаемой оболочкой или внешним покрытием и имеют очень мало сенсорных нейронов. Поскольку многие соединения, предназначенные для борьбы с вредителями, действуют как нейротоксины, малое количество нейронов, направленных наружу фитопатогенными нематодами, уменьшают эффективную зону поражения для нематоцидных соединений и это вызывает потребность в разработке нематоцидных соединений с особенно высокими нейротоксичными свойствами.

Более того, поскольку фитопатогенные нематоды находят в земле или корнях растений, влиять на фитопатогенные нематоды контролируемыми соединениями тяжело и это угрожает загрязнением грунтовых вод этими токсичными соединениями. Показано, что применение нематоцидов на основе нейротоксинов загрязняет как землю, так и грунтовые воды. Поэтому многие из этих соединений изъяты с рынка по причинам, связанным со здравоохранением.

Фумигация земли перед высеванием является распространенным методом борьбы с нематодами. Один из наиболее распространенных фумигантов - метилбромид, внесенный в список для изъятия из использования из-за его способности разрушать озон. Кроме того, практика фумигации земли убивает организмы в земле без разбора и это приводит к риску уничтожения полезных микробов, а также организмов, которые вызывают болезни. Таким образом, есть насущная необходимость в эффективном нематоциде с полезными для окружающей среды свойствами.

Pasteuria была впервые описана в 1888 году Мечниковым (Metchnikoff) (*Annales de l'Institut Pasteur* 2:165-170) как паразит водных блох. Со временем Кобб (Cobb) описал заражение *Pasteuria* нематоды *Dorylaimus bulbiferous* (2nd ed. Hawaiian Sugar Planters Assoc, Expt. Sta. Div. Path. Physiol. Bull. 5:163-195, 1906).

Жизненный цикл бактерий включает стадию, когда эндоспоры прилипают к оболочке нематод в земле. *P. penetrans* затем размножаются в теле нематоды и проходят несколько морфологических фаз, включая мицелиальные структуры и талии, а кульминацией является развитие новых эндоспор. Эндоспоры высвобождаются, когда тело нематоды распадается.

Рост бактерий внутри нематоды уменьшает или исключает продуцирование яиц нематодой, что существенно ограничивает скорость репродукции нематод. Экономический убыток для урожая по обыкновению наносится первым потомством нематод и упреждается благодаря *Pasteuria* из-за снижения концентрации потомства нематод в зоне корневой системы растения.

Хотя применение *Pasteuria* для борьбы с нематодами было предложено раньше, ряд факторов, включая субоптимальные пути доставки ограничивали применение этой стратегии для борьбы с нематодами. Обычные способы борьбы с нематодами с применением штаммов *Pasteuria* включают нанесение бактерий на растение и землю в свободной форме (например, Stirling G. R. 1984. "Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*", *Phytopathology*, 74:55-60) или в твердых или жидких композициях (например, патент США № 5,248,500). Однако, несмотря на высокоселективную эффективность бактерий на фитопатогенные нематоды, они нуждаются в пребывании в контакте с нематодами для нематоцидного эффекта. При нанесении непосредственно на почву необходимо большое количество бактерий и их необходимо хорошо перемешивать с землей, что значительно увеличивает стоимость применения бактерий.

Хотя известны разные способы биологического контроля с применением бактерий *Pasteuria*, есть потребность в разработке улучшенного способа применения этих бактерий для эффективной борьбы с нематодами. Таким способом, данное изобретение предлагает новые способы борьбы с фитопатогенными нематодами, которые атакуют растения.

Краткое изложение сущности изобретения

Данное изобретение предлагает новые и улучшенные материалы и способы борьбы с фитопатогенными нематодами и/или другими нематодами, которые живут в земле, путем доставки в землю композиции, которая содержит эффективное количество спор *Pasteuria*, прикрепленных к семенам.

После высадки семян согласно данному изобретению споры *Pasteuria* переходят в землю, которая окружает семя. Установлено, что при реализации способа данного изобретения, споры прикрепляются, заражают, вырастают, повторно образуют споры, что снижает плодовитость и/или уничтожает фитопатогенные нематоды и/или другие нематоды, которые живут около семян и, в конце концов, около любого растения, которое развилось из семени.

Способ данного изобретения может быть применен для борьбы или уменьшения убытков, которые наносятся заражением нематодами, в предпочтительном варианте воплощения, может увеличить проращивание семян, содействовать росту растений и здоровью растений.

В одном аспекте данное изобретение предлагает способ борьбы с нематодами путем доставки в место заражения нематодами эффективного количества спор *Pasteuria*, прикрепленных к семенам растения.

Споры *Pasteuria*, согласно данному изобретению, можно наносить на семена в виде спор не в форме композиции, или как сформованную жидкую или твердую композицию, суспензию частиц или эмульсию. В одном варианте воплощения споры *Pasteuria* формируют в жидкую композицию. В другом варианте воплощения споры *Pasteuria* формируют в твердую композицию. Пригодные твердые носители включают, но не ограничиваясь этим, твердые полимерные матрицы, частицы, гранулы и порошки. В одном варианте воплощения твердый носитель может состоять из гранул.

В предпочтительном варианте воплощения композицию *Pasteuria* связывают с семенами путем покрытия, напыления или соединения другим путем, контактирования или перемешивания семян с композицией, которая включает *Pasteuria*. В одном варианте воплощения композицию, которая включает *Pasteuria*, наносят путем покрытия по крайней мере части площади поверхности семени композицией, которая включает *Pasteuria*.

В одном варианте воплощения семя сперва подвергают обработке клейким веществом, которое может прилипнуть к спорам *Pasteuria*, и/или композицией, которая содержит споры. Клейкое вещество может быть, например, клеем и/или одним или более полимерами или сополимерами. Примеры клейких веществ включают, но не ограничиваясь этим, клеи (такие как клей ELMERS™); поливинилацетаты; силиконовые материалы; и природные неорганические материалы, такие как силикагель и глина.

В другом аспекте данное изобретение предлагает семя, по крайней мере часть поверхности которого покрыта композицией, которая включает *Pasteuria*, где композиция *Pasteuria* содержит эффективное количество спор *Pasteuria* для борьбы с нематодами.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 показывает состояние здоровья растений, выращенных из семян, покрытых *Pasteuria* для борьбы с нематодами.

Фиг. 2 показывает прикрепление спор *Pasteuria* к нематодам в земле.

Фиг. 3 показывает высоту растений, выращенных из семян, покрытых *Pasteuria* для борьбы с нематодами.

Подробное описание изобретения

Данное изобретение предлагает материалы и способы эффективной борьбы с фитопатогенными нематодами и/или другими нематодами, которые живут в земле, путем применения семян растений, покрытых спорами *Pasteuria*.

Преимущественно *Pasteuria* продуцирует эндоспоры, которые имеют уникальную и полезную способность прикрепляться, заражать, вращаться, повторно образовывать споры, чем снижается плодовитость и/или уничтожаются фитопатогенные нематоды и другие нематоды, которые живут в земле.

В одном аспекте данное изобретение предлагает способы борьбы с нематодами путем доставки в место заражения нематодами эффективного количества композиции *Pasteuria*, как покрытия для семян растений.

Pasteuria, доставленная в виде покрытия для семян, согласно данному изобретению, может снижать способность нематод заражать растения. В результате в лучших вариантах воплощения способ обработки согласно изобретению способен контролировать или уменьшать потери от заражения нематодами, чем повышается проращивание семян, рост растений и/или здоровье растений.

Споры *Pasteuria* согласно данному изобретению можно выращивать *in vivo* в живых хозяевах (например, Verdeho, S., and R. Mankau, 1986, *Journal of Nematology*, 18:635), или *in vitro* без применения живых тканей-хозяев (например, Патент США № 5,094,954). В конкретном варианте воплощения споры *Pasteuria*, согласно данному изобретению, можно продуцировать, используя методики ферментации, описанные, например, в патентах США № 7,067,299 и № 6,919,197.

Для применения в борьбе с нематодами пригодны разные виды спор *Pasteuria* (*Pasteuria* spp.). В одном варианте воплощения активный ингредиент включает эффективное количество спор *Pasteuria penetrans* для борьбы с нематодами корневых узелков. В других вариантах воплощения активный ингредиент включает эффективное количество спор *Pasteuria*, выбранных из *Pasteuria ramosa*, *Pasteuria thornea*, *Pasteuria usage*, *Pasteuria nishizawae*, любую их комбинацию, а также новые нематоцидные виды, которые будут идентифицированы.

Нематоцидно активное количество спор *Pasteuria* будет варьироваться в зависимости от факторов, которые включают, но не ограничиваясь этим, виды растений, площадь поверхности семени, тип носителя, присутствие или отсутствие других активных ингредиентов, способ получения композиции, способ доставки, виды *Pasteuria*, целевые виды нематод и серьезность заражения или повреждения нематодами растения(й).

"Нематоцидно эффективное количество", как использовано здесь, касается количества спор *Pasteuria*, способных уничтожать, контролировать или заражать нематоды; задерживать рост или репродукцию

нематод; уменьшать популяцию нематод; и/или уменьшать повреждение растений, вызванных нематодами. Как правило, эффективное количество спор варьируется от приблизительно 1×10^5 до 1×10^{12} (или более) спор/семя. Предпочтительно, когда концентрация спор составляет от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^9 спор/семя.

"Активный ингредиент", как использовано здесь, касается вещества, которое является полезным для уничтожения, контролирования или заражения нематод или других вредителей; и/или задерживания роста или репродукции нематод или других вредителей; уменьшения популяций нематод или других вредителей; и/или уменьшения ущерба, нанесенного растениям нематодами или другим вредителем(ями).

"Сельскохозяйственный полезный ингредиент", как использовано здесь, касается вещества, которое является полезным или продуктивным в разных сельскохозяйственных применениях, например, полезным для борьбы с болезнями, вредителями (включая, например, насекомыми, паразитами, вирусами, грибами, бактериями) и/или сорняками; полезным в содействии качеству и количеству роста растения, здоровью растения, прорастанию семян, репродукции растения и/или росту плодов. Сельскохозяйственные полезные ингредиенты включают, но не ограничиваясь этим, пестициды, гербициды, фунгициды, удобрения и агенты биологического контроля.

"Инертный или неактивный ингредиент", как его здесь использовано, касается вещества, которое помогает в действии или повышает эффективность сельскохозяйственного состава или композиции. Инертные или неактивные ингредиенты включают, но не ограничиваясь этим, носитель, клейкое вещество, диспергатор, поверхностно-активное вещество, жидкий разбавитель, связующее вещество, наполнитель, разбавитель, увлажнитель, прилипатель, эмульгатор, питательное вещество, пенетрант, пенообразователь, растворитель, распределитель и буфер.

В некоторых вариантах воплощения композицию *Pasteuria* наносят на семена путем покрытия, нанесения, контактирования или перемешивания семян с композицией *Pasteuria*. В одном варианте воплощения композицию *Pasteuria* наносят на семя путем покрытия по крайней мере части площади поверхности семени композицией *Pasteuria*.

В конкретном варианте воплощения композицию *Pasteuria* наносят на семя путем: а) пропитывания твердого носителя композицией *Pasteuria* для получения смеси *Pasteuria*-носитель; и б) контактирования семени со смесью *Pasteuria*-носитель.

В другом аспекте изобретение предлагает семена, обработанные данной композицией *Pasteuria*. В другом варианте воплощения предлагаются семена, по крайней мере часть площади поверхности которых покрыта композицией *Pasteuria*. В конкретном варианте воплощения семена, покрытые *Pasteuria*, имеют концентрацию спор от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^9 спор на семя. Семена могут иметь и большее количество спор из расчета на семя, например, 1×10^{10} , 1×10^{11} или 1×10^{12} спор на семя.

Составы композиции *Pasteuria Pasteuria* согласно изобретению можно доставлять на семена в виде спор не в составе композиции, или в составе жидкой или твердой композиции, суспензии частиц или эмульсии.

В одном варианте воплощения споры *Pasteuria* формируют в жидкую композицию. Эндоспоры суспендируют в среде с буфером для поддержания желательной величины pH. Предпочтительно, когда величина pH составляет менее приблизительно 6,0, предпочтительно pH составляет менее приблизительно 5,5, а более предпочтительно, когда величина pH находится в пределах от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0. Буферные системы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваясь этим, гидрофталат калия, уксусную кислоту, янтарную кислоту и лимонную кислоту. Агенты, которые могут быть использованы для подкисления культуральной среды, включают, но не ограничиваясь этим соляную кислоту, серную кислоту, уксусную кислоту и другие органические кислоты.

В другом варианте воплощения композиция *Pasteuria* может необязательно содержать одну или более аминокислот, солей, углеводов, витаминов и других дополнительных питательных веществ. В конкретном варианте воплощения суспензия *Pasteuria* может содержать один или более следующих компонентов: глюкозу, NaCl, экстракт дрожжей, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, глицерин, валин, L-лейцин, L-глутамин, L-аланин, L-валин, L-тирозин, L-триптофан, молочную кислоту, пропионовую кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту, лимонную кислоту, тартрат КН, витаминный раствор, минеральный раствор, ксилит, ликозу и лецитин. В другом варианте воплощения суспензия может содержать один или более следующих компонентов: молочную кислоту, пропионовую кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту, лимонную кислоту, винную кислоту и экстракт дрожжей.

В другом варианте воплощения споры *Pasteuria* формируют в форме твердой композиции. Твердую композицию можно приготовить путем перемешивания спор *Pasteuria* или жидкой суспензии *Pasteuria* с твердым носителем. В следующем варианте воплощения твердую композицию получают путем пропитывания твердого носителя суспензией спор и последующего высушивания твердой композиции.

Пригодные твердые носители включают, но не ограничиваясь этим, твердые полимерные матрицы, частицы, гранулы и порошки. В одном варианте воплощения твердый носитель состоит из гранул. В другом варианте воплощения данную композицию формируют как эмульсию; суспензию частиц в водной среде (например, воде); смачиваемые порошки; смачиваемые гранулы (сухие текучие гранулы); или сухие

гранулы. В конкретном варианте воплощения твердый носитель представляет собой гранулы диатомовой земли от AXIS® и/или гранулы глины сорта "greens grade" от PROFILE®.

Композицию *Pasteuria* согласно изобретению можно формовать как, например, жидкую суспензию, твердую композицию или жидкую суспензию. Концентрация активного ингредиента может варьироваться от приблизительно 0,5% до приблизительно 99 мас. % (мас./мас.), от приблизительно 5% до приблизительно 80%, от приблизительно 10% до приблизительно 75%, от приблизительно 15% до приблизительно 70%, от приблизительно 20% до приблизительно 65%, от приблизительно 25% до приблизительно 60%, от приблизительно 30% до приблизительно 55%, от приблизительно 35% до приблизительно 50%.

В другом варианте воплощения данную композицию формуют как смесь *Pasteuria*-гранулы. Количество спор *Pasteuria* относительно гранул может варьироваться от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 7×10^8 спор/г гранул, от приблизительно 5×10^6 до приблизительно 5×10^8 спор/г гранул, от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^8 спор/г гранул или от приблизительно 3×10^7 до приблизительно 5×10^7 спор/г гранул.

В конкретном варианте воплощения композицию гранул получают путем перемешивания приблизительно 3-5 мл суспензии 2×10^7 спор/мл *Pasteuria* с приблизительно 2 г гранул. В еще другом конкретном варианте воплощения композицию гранул получают путем перемешивания приблизительно 5 мл суспензии спор с приблизительно 2 г гранул AXIS®. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию гранул получают путем перемешивания приблизительно 3 мл суспензии спор с приблизительно 2 г гранул PROFILE®.

Частицы твердой композиции могут быть любого размера, способного к закреплению спор *Pasteuria* на семени растения.

В еще одном варианте воплощения композиция *Pasteuria* дополнительно включает один или более обычных неактивных или инертных ингредиентов, включая, например, клейкие вещества, диспергаторы, поверхностно-активные вещества, жидкие разбавители, связующие вещества, наполнители, растворители, увлажнители, прилипатели, эмульгаторы, питательные вещества и буферы.

Обычные неактивные или инертные ингредиенты включают, но, не ограничиваясь этим: обычные агенты для прилипания; диспергирующие агенты, такие как метилцеллюлоза (METHOCEL™ A15LV или METHOCEL™ A15C, которая, например, служит как комбинированный диспергирующий агент/агент для прилипания для применения в обработке семян); поливиниловый спирт (например, ELVANOL™ 51-05); лецитин (например, YELKINOL™ P), полимерные диспергирующие агенты (например, поливинилпирролидон/винилацетат PVPIVA S-630); загустители (например, загустители на основе глины, такие как Van Gel B для улучшения вязкости и снижения осаждения частиц суспензии); стабилизаторы эмульсии; поверхностно-активные вещества; соединения против замораживания (например, мочевины), красители, пигменты, и т.п. Дополнительные инертные ингредиенты, которые можно использовать в данном изобретении можно найти в McCutcheon's, vol. 1, "Emulsifiers and Detergents," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996. Дополнительные инертные ингредиенты, которые можно использовать в данном изобретении, можно найти в McCutcheon's, vol. 2, "Functional Materials," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996.

В одном варианте воплощения используют клейкое вещество для ускорения прикрепления спор к семенам. Клейкое вещество закрепляет композицию, которая содержит споры *Pasteuria*, на поверхности семени, что предупреждает, или, по крайней мере уменьшает нежелательное стекание спор. Предпочтительно, когда клейкое вещество является нетоксичным и адгезивным, распадается биологическим путем. Пригодные клейкие вещества включают, но, не ограничиваясь, клеи; поливинилацетаты; сополимеры поливинилацетата; поливиниловые спирты; сополимеры поливинилового спирта; целлюлозы, такие как метилцеллюлозы, гидроксиметилцеллюлозы и гидроксиметилпропилцеллюлозы; декстрины; альгинаты; сахара; мелассы; поливинилпирролидоны; полисахариды; протеины; жиры; масла; гуммиарабики; желатины; сиропы и крахмалы. Дополнительные приемлемые клейкие вещества описаны, например, в патенте США № 7,213,367. В конкретном варианте воплощения клейкое вещество представляет собой поливинилацетат.

В другом варианте воплощения данная композиция дополнительно содержит один или более полимеров, способных смешиваться или прикреплять активный ингредиент к твердому носителю. Пригодные полимеры могут быть природными или синтетическими и предпочтительно, когда они не имеют или имеют небольшой фитотоксичный эффект на семя, которое покрывают. Полимер можно выбрать, например, из поливинилацетатов; сополимеров поливинилацетата; сополимеров этиленвинилацетата (EVA); поливиниловых спиртов; сополимеров поливинилового спирта; целлюлоз, включая этилцеллюлозы, метилцеллюлозы, гидроксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы и карбоксиметилцеллюлозы; поливинилпирролидонов; полисахаридов, включая крахмал, модифицированный крахмал, декстрины, мальтодекстрины, альгинат и хитозаны; жиров; масел; протеинов, включая желатин и зеины; гуммиарабика; шеллаков; винилиденхлорида и сополимеров винилиденхлорида; лигносульфонатов кальция; акриловых сополимеров; поливинилакрилатов; полиэтиленоксида; полимеров и сополимеров акриламида; полигидроксиэтилакрилата, мономеров метилакриламида; и полихлоропрена.

В другом варианте воплощения данная композиция может дополнительно включать наполнитель для защиты семян во время стрессовых условий. Кроме того данная композиция может дополнительно включать пластификатор для улучшения текучести жидкой или полужидкой композиции, упругости смеси или полимерной композиции, и/или прилипания композиции к семени. Кроме того, в композицию можно по желанию добавлять агент для высушивания, такой как карбонат кальция, каолиновую или бентонитовую глину, перлит, диатомовую землю или любой другой адсорбент, как описано, например в Патенте США № 5,876,739. Специалист в данной области, владея преимуществами данного описания, может легко выбрать желательные компоненты для применения в композиции.

В еще одном варианте воплощения данная композиция *Pasteuria* содержит второй сельскохозяйственный полезный ингредиент. Второй сельскохозяйственный полезный ингредиент может быть, например, выбран из пестицидов и фунгицидов, таких как каптан, тирам, металаксил, флюдиоксонил, оксадиксил и изомеров этих материалов, и т.п.; гербицидов, включая такие соединения, как карбаматы, тиокарбаматы, ацетамиды, тиазины, динитроанилины, эфиры глицерина, пиридазины, урацилы, фенокси, мочевины и бензойные кислоты; гербицидных антидотов, таких как бензоксазин, производные бензгидрида, N,N-диалилдихлор-ацетамид, различные соединения дигалоацила, оксазолидинила и тиазолидинила, этанон, соединения нафталевого ангидрида и производные оксима.

Второй сельскохозяйственный полезный ингредиент может дополнительно включать удобрения и/или ингредиенты, которые содействуют прорастанию семян и/или росту растений и/или здоровью растений. Кроме того, он может включать различные агенты биологического контроля, такие как другие природные или рекомбинантные бактерии и грибки из рода *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Trichodenna*, *Glomus*, *Gliocladium* и микоризные грибки. Эти химические или биологические агенты могут быть полезными для борьбы с нематодами и/или другими вредителями.

Принимая во внимание вышеприведенные данные, специалист в данной области включит разные ингредиенты, такие как инертные или неактивные ингредиенты, пестициды или удобрения в композицию и/или способ обработки согласно изобретению. Кроме того, специалист в данной области обычно не будет включать те ингредиенты, которые нанесли бы значительный вред выживанию, росту и/или репродукции спор *Pasteuria*, снизили бы способность спор *Pasteuria* к прикреплению, заражению, вращанию и/или уничтожению нематод, и/или бы ингибировали прорастание семян, рост растений, рост плодов и/или репродукцию растений.

Виды растений

Материалы и способы данного изобретения можно использовать для уменьшения потерь таких видов растений, которые включают, но, не ограничиваясь этим, зеленая стручковая фасоль, дерновые злаки, томаты, хлопчатник, кукурузу, соевые бобы, овощи, пшеницу, ячмень, рис и канолу.

Виды нематод

Материалы и способы согласно данному изобретению являются полезными для уничтожения, борьбы и/или заражения нематодами, задержки роста или репродукции нематод; уменьшения популяции нематод; и/или уменьшения или препятствования нанесению вреда растениям от фитопатогенных нематод, нематод, которые паразитируют на растениях или других нематод, которые живут в земле, включая, но, не ограничиваясь этим, *Meloidogyne arenaria*, *Pratylenchus brachyurus*, *Rotylenchulus reniformis* и *Belonolaimus longicaudatus*, *Heterodera glycines* и *Hoplolaimus galeatus*.

Способы закрепления и доставки

Данное изобретение также предлагает способы закрепления композиции *Pasteuria* на семенах растений и доставки семян в место заражения нематодами.

Предпочтительно, когда способ закрепления не наносит значительный вред выживанию, росту и/или репродукции спор *Pasteuria*, не снижает способность спор *Pasteuria* прикрепляться, заражать, вращать и/или уничтожать нематоды. Предпочтительно, когда способы упрочения и доставки вызывают незначительную фитотоксичность, такую, которая влияет на прорастание семян, васкуляризацию растений, рост растений, репродукцию растений и/или рост плодов.

В некоторых вариантах воплощения композицию *Pasteuria* закрепляют путем покрытия, распыления, контактирования или перемешивания семян с композицией *Pasteuria*. В одном варианте воплощения композицию *Pasteuria* закрепляют путем покрытия по крайней мере части площади поверхности семени композицией *Pasteuria*.

Данную композицию можно закреплять на семенах, используя любые из разнообразных методик, таких как, например, технологии псевдооживленного слоя, методы с использованием вальцовой мельницы и методики фонтанирующего слоя. Кроме того, данную композицию можно закреплять на семенах, используя устройство, такое как ротостатичная машина для обработки семян или барабанная машина для покрытия семян. Перед покрытием семена могут быть подвергнуты сортировке по размеру. После покрытия семена обычно высушивают, а затем подают в сортировочную машину по размеру, как известно в данной области.

В одном варианте воплощения композицию *Pasteuria* согласно изобретению вначале смешивают с разными сельскохозяйственными полезными ингредиентами, такими как пестициды, гербициды, фунгициды, удобрения и/или агенты биологического контроля; и затем смесь доставляют на семена. В другом

варианте воплощения композицию *Pasteuria* согласно изобретению доставляют на семена последовательно с разными сельскохозяйственными полезными ингредиентами. В другом варианте воплощения композицию *Pasteuria* доставляют на семена одновременно с разными сельскохозяйственными полезными ингредиентами, но на разные участки площади поверхности семени.

Как использовано здесь, покрытие семян включает любой способ, который предусматривает добавление материалов к семенам, включает, но, не ограничиваясь этим, покрытие пленкой, осаждение одного слоя или слоев материалов на всю или часть площади поверхности семени, нанесение материалов на семя одновременно или последовательно для покрытия всей или части площади поверхности семени.

В конкретном варианте воплощения данной композицией можно покрывать семена, используя разные способы, включая, но не ограничиваясь этим, покрытие пленкой, перемешивание семян с данной композицией в контейнере (например, в бутылке или мешке), механическое нанесение, встряхивание, распыление и погружение. Для покрытия могут быть использованы различные активные или инертные материалы, такие как, например, обычные пленкообразующие материалы, включая, но, не ограничиваясь этим, пленочные покрытия на водной основе, такие как SEPIRET (Seppic, Inc., Fairfield, N.J.) и Oracoat (Berwind Pharm. Services, Westpoint, Pa).

Разные способы получения покрытых семян включают также те, которые описаны, например, в патентах США 5,918,413; 5,891,246; 5,554,445; 5,389,399; 5,107,787; 5,080,925; 4,759,945; 4,465,017; 5,939,356; 5,882,713; 5,876,739; 5,849,320; 5,834,447; 5,791,084; 5,661,103; 5,622,003; 5,580,544; 5,328,942; 5,300,127; 4,735,015; 4,634,587; 4,383,391; 4,372,080; 4,339,456; 4,272,417; и 4,245,432.

В другом конкретном варианте воплощения композицию *Pasteuria* доставляют на семена путем первичной обработки твердой матрицей. Если проиллюстрировать это вкратце, споры *Pasteuria*, равномерно распределенные в полимерной матрице, вводят в контакт с семенами на протяжении достаточного периода времени, пока вся поверхность семян не будет покрыта спорами *Pasteuria*. Обработанные семена можно отделить от твердой матрицы для дальнейшего хранения или применения; или альтернативно обработанные семена можно сохранять или высевать вместе с твердой матрицей.

Материалы, пригодные для применения в виде твердой матрицы, включают полиакриламид, крахмал, глину, кремнезем, глинозем, землю, песок, полимочевину, полиакрилат или любой другой материал, способный абсорбировать и высвободить данную композицию на семена контролируемым способом. Предпочтительно, когда твердая матрица способна высвободить данную композицию контролируемым способом. Желательная скорость высвобождения может варьироваться в зависимости от вида растений, вида *Pasteuria*, вида нематод и других факторов. Предпочтительно, когда данная композиция может высвободиться с обработанных семян с небольшой скоростью, такой как путем диффузии или перемещения через матрицу в окружающую среду или землю.

Семена, покрытые композицией *Pasteuria*, можно покрыть дополнительной тонкой пленкой внешнего покрытия для защиты покрытия, которое содержит *Pasteuria*. Примеры методик нанесения внешнего покрытия включают, но не ограничиваясь этим технологию псевдооживленного слоя и технологию барабанного пленкообразования.

В дополнительном варианте воплощения способы доставки включают дополнительную стадию тепловой обработки. Стадия тепловой обработки усиливает нематоцидный эффект композиции *Pasteuria*. В одном варианте воплощения суспензию спор *Pasteuria* нагревают перед смешиванием с твердым носителем, таким как гранулы. В другом варианте воплощения смесь *Pasteuria*-гранулы нагревают.

Кроме того, данный способ может дополнительно включать стадию нанесения на семена клейкого вещества перед или одновременно с обработкой *Pasteuria*. В другом варианте воплощения семена сперва покрывают слоем клейкого вещества, а затем обрабатывают композицией *Pasteuria*. Пригодные клейкие вещества включают, но не ограничиваясь этим, поливинилацетат, сополимеры поливинилацетата, поливиниловый спирт, сополимер поливинилового спирта, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксиметилпропилцеллюлозу, декстрин, альгинат, мелассу, поливинилпирролидон, полисахариды, протеин, жир, масло, полисахарид, гуммиарабик, желатин, сиропы и любую их комбинацию.

В конкретном варианте воплощения данный способ включает:

- a) смешивание суспензии спор *Pasteuria* с порошкообразным носителем; и высушивание смеси на протяжении достаточного времени, пока не сформируются частицы спор/гранул;
- b) покрытие семян клейким веществом; и
- c) контактирование семян с частицами спор/гранул, пока семена не будут покрыты нематоцидно эффективным количеством спор *Pasteuria*.

В еще одном варианте воплощения семена, обработанные данной композицией *Pasteuria*, могут быть подвергнуты дополнительным стадиям обработки, таким как высушивание. Предпочтительно, высушивание проводят так, чтобы оно не наносило вред спорам *Pasteuria*. Таким образом, семена, обработанные данной композицией, могут храниться на протяжении продолжительного периода времени при комнатной температуре. Длительное время хранения обработанных семян также позволяет разные вариации в графиках высаживания. Предпочтительно, когда степень выживания спор *Pasteuria* значительно превышает степень выживания вегетативной формы бактерий при транспортировке, засевании или при размещении в землю вместе с семенами.

Хотя обработку семян можно проводить в любом физиологическом состоянии семян, предпочтительно, когда семя находится в достаточно крепком состоянии, чтобы процесс обработки нанес незначительный, или вовсе не нанес вред семени. Обычно, когда собирают урожай растений с поля; семя изымают из растения; и отделяют от любого растительного материала, который не относится к семенам. Предпочтительно, когда семя является биологически стабильным до такой степени, что обработка не нанесет ущерб семени. В одном варианте воплощения, например, обработку можно применять к семенам кукурузы, которые были собраны, очищены и высушены до содержания влаги ниже 15 мас. %.

В альтернативном варианте воплощения семя может быть семенем, которое было высушено и затем подвергнуто предварительной обработке водой и/или другими материалами и затем снова высушено до или во время обработки композицией *Pasteuria*. Обработку можно применять к семенам в любое время от сбора урожая до высевания. Как использовано здесь, термин "не высаженное семя" относится к любому семени в любой период от сбора урожая до высевания.

Дальше приводятся примеры, которые иллюстрируют методики практического применения изобретения. Эти примеры нельзя рассматривать как ограничивающие. Все процентные соотношения даются по весу и все пропорции смеси растворителей даются по объему, если не указано иное.

Пример 1. Получение покрытия *Pasteuria* на семенах.

Данный пример иллюстрирует способы покрытия семян спорами *Pasteuria penetrans*. Споры *Pasteuria* суспендируют в 10 ммоль/л фосфатного буфера и устанавливают концентрацию приблизительно 2×10^7 спор/мл. Смесь *Pasteuria*-Гранулы получают путем смешивания 5 мл суспензии спор с 2 г гранул диатомовой земли AXIS® в чашке Петри; или, альтернативно, путем смешивания 3 мл суспензии спор с 2 г PROFILE® гранул глины сорта "greens grade" в чашке Петри.

Смесь высушивают под лампой. Затем семена зеленой стручковой фасоли обрабатывают поливинилацетатом и высушивают на протяжении 5 мин в плоском сосуде. Семена тщательно покрывают смесью *Pasteuria*-гранулы.

Семена, обработанные *Pasteuria*, пригодны для немедленного применения или для продолжительного хранения.

Пример 2. Эффективность покрытия *Pasteuria* на семенах для борьбы с нематодами.

Для определения эффекта семян, покрытых *Pasteuria*, на нематоды проводят тест в горшках в теплице.

2,2 г каждой из добавок "Axis turf" и "Profile turf" поместили в отдельные чашки Петри. Споры *Pasteuria penetrans* в концентрации $1,8 \times 10^7$ сп./мл вводили пипеткой в каждую чашку до насыщения материалов. Добавка "Axis" стала насыщенной при 5 мл, а добавка "Profile" стала насыщенной при 4 мл. Чашки поместили под галогеновую лампу для высушивания. Семена зеленой стручковой фасоли (Ferry-Morse Blue Lake 274) взвесили и определили средний вес 413,3 мг. Семена покрыли прилипателем на основе поливинилацетата путем выливания клея Elmer's Clear School Glue в лабораторный стакан и погружения индивидуальных семян вручную с помощью щипчиков в клей. Семена высушивали на протяжении 5 мин в чашке Петри, а затем выкатывали в гранулах "Axis" и "Profile", обработанных спорами, пока семена не покрылись гранулами. Контрольные семена покрывали необработанными гранулами "Axis" и "Profile".

Покрытые семена подвергли действию, которое описано ниже, собранных в поле нематод корневых узелков на протяжении 21 дня. Для контроля необработанные семена зеленой стручковой фасоли подвергали действию нематод в тех же условиях.

Горшки из материала Styrofoam заполнили 1 кг земли. Каждый горшок заражали ювенильными нематодами корневых узелков в количестве 1500-2000 (*Meloidogyne arenaria*) путем введения суспензии нематод с помощью пипетки в землю на глубину 2 дюйма от поверхности земли. Образованную лунку закрыли, а затем высаживали семя зеленой стручковой фасоли, одно на горшок, на глубину 0,5 дюйма ниже поверхности. Высадили 5 тестируемых (со спорами) и 5 контрольных семян. Горшки поливали 50 мл водопроводной воды ежедневно и выдерживали в теплице, пока температурные показатели не показали, что нематоды достигли 500 градус-дней.

Затем отбирали образцы земли для подсчета нематод, а растения и корневые системы извлекали из земли. Здоровье и живучесть растений рассчитывали по шкале 1-10, 1 - наименее здоровое, а 10 - наиболее здоровое растение. Прикрепление в процентах определяли путем регистрации количества ювенильных нематод в образце земли с 1 или больше прикрепленными спорами *Pasteuria* и рассчитывая проценты. Яйца нематод подсчитали путем собирания массы яиц из корневой системы и подсчета яиц под микроскопом.

Результаты, приведенные на фиг. 1-3, показывают, что покрытие с *Pasteuria* содействует прорастанию семян, высоте растений и росту растений по сравнению с контрольными растениями.

Все ссылки, включая патенты, заявки на выдачу патентов, предварительные заявки и публикации, приведенные или цитированные в описании, включены путем ссылки на их содержание, включая все фигуры и таблицы, когда они не противоречат четко изложенным целям этого описания.

Артикли "a", "an" и "the" и подобные символы в тексте на английском языке, как они использованы

в тексте описания изобретения, охватывают как единственное число, так и множественное, если не указано другое, или однозначно не опровергается контекстом.

Изложение границ значений используется как сокращенный способ изложения и касается каждой отдельной величины, которая находится в этих границах, если не указано другое и каждая отдельная величина введена в описание так, если бы она была приведена конкретно.

Применение любого и всех примеров, или язык примеров (например, "такой как") предназначено для предпочтительной иллюстрации изобретения и не предназначено для ограничения объема изобретения, если не указано другое. Ни один из терминов в описании не может рассматриваться как описывающий любой из признаков как существенный в практике изобретения, если это не указано четко.

Описание в целом или любой из аспектов или вариантов воплощения изобретения, где использованы такие термины как "содержит", "имеет", "включает" или "включающий" со ссылкой на признак или признаки, предназначенные для подтверждения подобного аспекта или варианта воплощения изобретения, который "состоит из", "в основном состоит из", или "в основном содержит" этот конкретный признак или признаки, если не указано другое, или четко опровергается контекстом (например, композицию, которая описана как такая, которая содержит определенный признак, следует понимать как композицию, которая состоит из этого признака, если не указано другое, или четко не опровергается контекстом).

Следует понимать, что все описанные примеры и варианты воплощения предназначены лишь для иллюстративных целей, и специалистом в данной области будут предложены разные модификации или изменения в ракурсе, которые находятся в объеме и пределах данной заявки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с почвенными нематодами, включающий покрытие семени композицией *Pasteuria*, содержащей нематоцидные споры *Pasteuria* в качестве единственного нематоцида; и высевание полученного покрытого семени; в котором композиция *Pasteuria* на покрытом семени используется в концентрации от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^9 спор на семя.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что композиция *Pasteuria* дополнительно содержит жидкий или твердый носитель.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что твердый носитель выбирают из группы, которая включает сухие порошки, смачиваемые порошки, смачиваемые гранулы, сухие гранулы, полимерные матрицы и суспензии.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что твердый носитель представляет собой гранулы.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что твердый носитель представляет собой полимерную матрицу, выбранную из группы, которая включает полиакриламид, крахмал, глину, кремнезем, глинозем, почву, песок, полимочевину, полиакрилат и любые их комбинации.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что на семена наносят клейкое вещество, и в котором клейкое вещество выбирают из группы, которая включает поливинилацетат, сополимеры поливинилацетата, поливиниловый спирт, сополимер поливинилового спирта, метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксиметилпропилцеллюлозу, декстрин, альгинат, мелассу, поливинилпирролидон, полисахариды, белки, жиры, масла, полисахарид, гуммиарабик, желатин, сиропы и любые их комбинации.

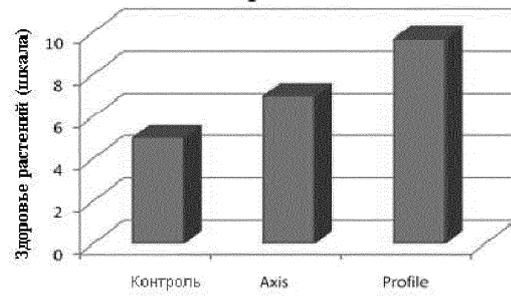
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что споры *Pasteuria* выбирают из группы, которая включает *Pasteuria penetrans*, *Pasteuria ramosa*, *Pasteuria thornei*, *Pasteuria nishizawae* и любые их комбинации.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что почвенные нематоды выбирают из группы, которая включает *Meloidogyne arenaria*, *Pratylenchus brachyurus*, *Rotylenchulus reniformis*, *Belonolaimus longicaudatus* и любые их комбинации.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что семена выбирают из группы, которая включает семена для зеленой стручковой фасоли, томатов, хлопчатника, кукурузы, соевых бобов, пшеницы, ячменя, риса, какао и любых их комбинаций.

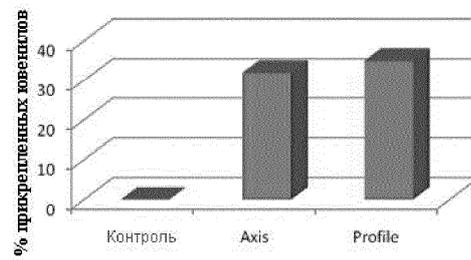
10. Семя, по крайней мере часть поверхности которого покрыта композицией *Pasteuria*, отличающееся тем, что композиция *Pasteuria* содержит от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^9 спор на семя в качестве единственного нематоцида.

**Покрывтие на семени зеленой стручковой
фасоли**



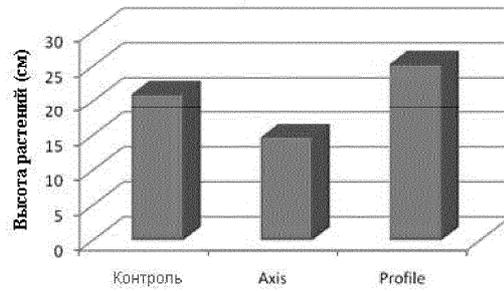
Фиг. 1

**Покрывтие на семени зеленой стручковой
фасоли**



Фиг. 2

**Покрывтие на семени зеленой стручковой
фасоли**



Фиг. 3

