



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113184** (13) **C2**  
(51) МПК (2016.01)  
**A01N 43/16** (2006.01)  
A01P 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2014 03345</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Сміт Р. Стюарт (US), Хабіб Ахсан (US), Косанке Джон (US)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>10.09.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>НОВОЗАЙМС БІОАГ А/С, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark (DK)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>26.12.2016</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Михайлюк Ганна Валентинівна, реєстр. №184</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/532,234, 61/568,435</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2008085958, А, 17.07.2008 WO 2009049747, А, 23.04.2009 WO 2005087005, А, 22.09.2005</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>08.09.2011, 08.12.2011</b>		
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US, US</b>		
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>26.05.2014, Бюл.№ 10</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>26.12.2016, Бюл.№ 24</b>		
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2012/054443, 10.09.2012</b>		

**(54) СПОСОБИ ОБРОБКИ НАСІННЯ**

**(57) Реферат:**

Спосіб стимулювання росту рослин, що передбачає обробку насіння ефективною кількістю сигнальної молекули для рослин щонайменше за один місяць до посіву.

**UA 113184 C2**



## ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

[0001] Симбіоз між грамнегативними ґрунтовими бактеріями, Rhizobiaceae і Bradyrhizobiaceae, та бобовими рослинами, такими як соя, є переконливо підтвердженим документальними доказами. Біохімічна основа цих взаємозв'язків включає обмін молекулярними сигналами, де сигнальні сполуки, що передаються від рослини до бактерій, включають флавоноїди, ізофлавоноїди та флаванони, а сигнальні сполуки, що передаються від бактерій до рослини та включають кінцеві продукти експресії генів под брадиризобій та ризобій, відомі як ліпохітоолігосахариди (LCO). Симбіоз між цими бактеріями та бобовими рослинами дозволяє бобовим рослинам фіксувати атмосферний азот і, внаслідок цього, рости на ґрунті, який має низькі рівні азоту, що може бути асимільований, таким чином, усувається потреба в азотних добривах. Оскільки азотні добрива можуть зумовлювати значне збільшення вартості сільськогосподарських культур і пов'язані з рядом ефектів забруднення, у сільськогосподарській промисловості тривають спроби використання цих біологічних взаємозв'язків та розробки нових засобів та способів для поліпшення врожайності рослин без збільшення використання добрив на основі азоту.

[0002] У патенті США № 6979664 описується спосіб стимулювання проростання насіння або появи паростків рослинної культури, що включає етапи забезпечення композиції, яка містить ефективну кількість щонайменше одного ліпохітоолігосахариду та носій, придатний з погляду сільського господарства, і застосування композиції в безпосередній близькості від насіння або паростка в ефективній кількості для стимулювання проростання насіння або появи паростків порівняно з необробленою насінною або паростком.

[0003] Подальший розвиток цієї ідеї описується у WO 2005/062899, спрямованому на комбінації щонайменше одного індуктора для рослин, а саме LCO, у комбінації з фунгіцидом, інсектицидом або їх комбінацією для поліпшення характеристики рослин, такої як густина стояння, ріст, потужність та/або врожайність рослин. Ці композиції та способи, як описано, є застосовними як до бобових рослин, так і до рослин, що не належать до бобових, та їх можна застосовувати для обробки насіння (безпосередньо перед посівом), паростка, кореня або рослини.

[0004] Аналогічно, у WO 2008/085958 описуються композиції для стимулювання росту рослин і підвищення врожайності культур як бобових рослин, так і рослин, що не належать до бобових, і при цьому композиції містять LCO у комбінації з іншим активним засобом, таким як хітин або хітозан, флавоноїдна сполука або гербіцид, та їх можна застосовувати щодо насіння та/або рослин одночасно або послідовно. Як і у випадку публікації '899, у публікації '958 описується обробка насіння безпосередньо перед посівом.

[0005] У низці інших публікацій описується сприятливий вплив LCO у способах обробки насіння, наприклад, Kidaj et al., "Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions", Microbiol Res 25426 (2011); та Maj et al., "Pretreatment of Clover Seeds with Nod Factors Improves Growth and Nodulation of Trifolium pratense", J. Chem Ecol (2009) 35:479-487.

[0006] Останнім часом у Halford, "Smoke Signals", Chem. Eng. News (12 квітня 2010 р.), на сторінках 37-38, повідомлялося, що карикіни або бутеноліди, які містяться в димі, діють як стимулятори росту та сприяють проростанню насіння після лісової пожежі, і можуть активувати насіння, наприклад, кукурудзи, різновидів томату, латуку й різновидів цибулі, яке зберігали. Ці молекули є об'єктом патенту США № 7576213.

## КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

[0007] Даний винахід забезпечує способи стимулювання росту рослин і підвищення продуктивності сільськогосподарської культури, в яких сприятливий ефект сигнальної молекули для рослин (засобу, що стимулює ріст рослин) можна одержати без необхідності застосування сигнальної молекули для рослин (засобу, що стимулює ріст рослин) щодо насіння одночасно з посівом. Даний винахід частково ґрунтується на тому відкритті, що обробка насіння сигнальною молекулою для рослин, такою як LCO, з наступним тривалим зберіганням до посіву зумовлює простимульований ріст рослин, у тому числі більші врожайність рослин, та/або площу листової поверхні, та/або кількість, довжину та масу коренів, порівняно з рослинами, отриманими з насіння, не обробленого ані в той, ані в інший спосіб. Даний винахід також передбачає способи стимулювання росту рослин та підвищення продуктивності сільськогосподарської культури, у яких можна одержати додаткові поліпшення порівняно з рослинними культурами, отриманими з насіння, обробленого безпосередньо перед посівом або в межах тижня до посіву або менше.

[0008] Перший аспект даного винаходу спрямований на спосіб стимулювання росту рослин, що включає обробку насіння ефективною кількістю сигнальної молекули для рослин щонайменше за один місяць (тридцять днів) до посіву. У варіантах здійснення насіння можна

обробляти згідно з даним способом за 2 місяці до посіву, щонайменше за 3 місяці до посіву, щонайменше за 4 місяці до посіву, щонайменше за 5 місяців до посіву, щонайменше за 6 місяців до посіву, щонайменше за 9 місяців до посіву, щонайменше за 1 рік до посіву, щонайменше за 2 роки до посіву й у деяких варіантах здійснення щонайменше за 3 роки до посіву.

[0009] Обробку застосовують для одержання рослини (сільськогосподарської культури), яка характеризується щонайменше одним зі збільшеної врожайності, що вимірюється в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з рослинами, отриманими з необробленого насіння. У конкретних варіантах здійснення обробку можна застосовувати для одержання рослини (сільськогосподарської культури), яка характеризується щонайменше одним зі збільшеної врожайності, що вимірюється в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з рослиною (сільськогосподарською культурою), отриманою з насінини, обробленої сигнальною молекулою безпосередньо перед посівом або в межах тижня до посіву або менше.

[0010] У деяких варіантах здійснення даного винаходу сигнальна молекула для рослин являє собою ліпохітоолігосахарид (LCO). У деяких варіантах здійснення LCO є рекомбінантним. В інших варіантах здійснення LCO є синтетичним. В інших варіантах здійснення LCO отриманий з мікроорганізму, наприклад, видів *Rhizobium*, вибраних з *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., наприклад, *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium* sp. і *Azorhizobium* sp., або з арбускулярного мікоризного гриба.

[0011] В інших варіантах здійснення сигнальна молекула для рослин являє собою хітинову сполуку, наприклад, хітоолігомер (CO). У деяких варіантах здійснення CO є рекомбінантним. В інших варіантах здійснення CO є синтетичним. В інших варіантах здійснення CO отриманий з мікроорганізму, як і LCO.

[0012] В інших варіантах здійснення сигнальна молекула для рослин являє собою флавоноїд. В інших варіантах здійснення сигнальна молекула для рослин являє собою жасмонову кислоту, лінолеву кислоту, ліноленову кислоту або їх похідну. В інших варіантах здійснення сигнальна молекула для рослин являє собою карикін.

[0013] Комбінації двох або більше різних сигнальних молекул для рослин (або їх типів) можна застосовувати для обробки насіння.

[0014] В інших варіантах здійснення обробка додатково включає приведення насіння в контакт із щонайменше одним іншим агрономічно корисним засобом, наприклад, діазотрофом (ризобіальним інокулянт), мікоризними грибами, засобом, що солубілізує фосфати, гербіцидом, інсектицидом або фунгіцидом. У деяких варіантах здійснення обробка передбачає розпилення композиції, що містить сигнальну молекулу для рослин, на насіння, і в деяких інших варіантах здійснення обробка передбачає розбризкування композиції на насіння.

[0015] Спосіб за даним винаходом є застосовним до бобових рослин так само, як і до рослин, що не належать до бобових. У деяких варіантах здійснення насіння бобової рослини являє собою насінину сої. У деяких інших варіантах здійснення насіння, яку обробляють, являє собою насінину рослини, що не належить до бобових, наприклад, насінину польової культури, наприклад, кукурудзи, або насінину овочевої культури.

[0016] Насіння можна обробляти відповідно до даного способу будь-де у моменти часу від одного місяця (тридцять днів) до 1 року, 2 років і в деяких варіантах здійснення навіть 3 років до посіву залежно від конкретних властивостей насіння (життєздатність після зберігання) або промислових стандартів. Наприклад, насіння сої, як правило, висівають у наступний сезон, тоді як насіння кукурудзи можна зберігати протягом триваліших періодів часу, у тому числі понад 3 років до посіву.

[0017] Даний винахід також стосується насіння, обробленого сигнальною молекулою для рослин/засобом, що стимулює ріст рослин, наприклад, LCO або CO, яке зберігали протягом щонайменше від тридцяти днів до 1 року, 2 років і в деяких варіантах здійснення навіть 3 років до посіву.

[0018] Ще один аспект даного винаходу спрямований на посіану насінину, яку було оброблено сигнальною молекулою для рослин/засобом, що стимулює ріст рослин, наприклад, LCO або CO, яку зберігали протягом щонайменше від тридцяти днів до 1 року, 2 років і в деяких варіантах здійснення навіть 3 років до посіву.

[0019] Пов'язаний аспект даного винаходу спрямований на упаковку, яка містить оброблене насіння згідно з даним винаходом із метою посіву після обробки.

[0020] Як продемонстровано в робочих прикладах, які включають порівняльні експерименти,

проведені як у тепличних умовах, так і в польових умовах, сприятливі впливи сигнальних молекул/засобів, що стимулюють ріст рослин можна одержати навіть у тому випадку, якщо сигнальні молекули застосовують щодо насіння задовго до часу посіву та після періоду тривалого зберігання.

[0021] Як додатково продемонстровано в робочих прикладах, які включають порівняльні експерименти, проведені як у тепличних умовах, так і в польових умовах, у варіантах здійснення даного винаходу, які передбачали обробку насіння сої LCO з *Bradyrhizobium japonicum*, проявлялися збільшені врожайність рослин, площа листової поверхні та збільшені довжина коренів і об'єм коренів порівняно як із необробленим насінням, так і з насінням, обробленим LCO безпосередньо перед посівом або в межах тижня до посіву.

#### КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0022] На фіг. 1 і 2 показані хімічні структури ліпохітоолігосахаридних сполук (LCO), придатних для здійснення даного винаходу.

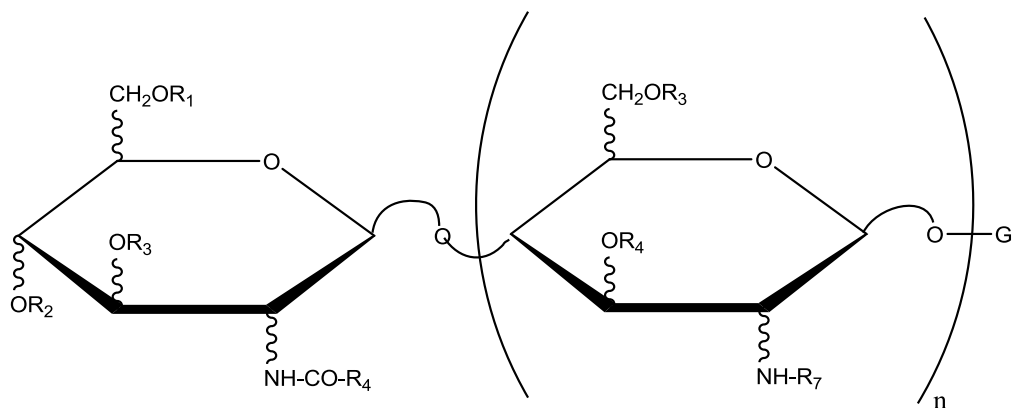
[0023] Фіг. 3 являє собою стовпчасту діаграму, на якій показана середня площа поверхні листків першого трилисника для 19-денних рослин сої, що проросли з насіння, обробленого згідно з варіантом здійснення даного винаходу (наприклад, за 55 днів до посіву), порівняно з представниками контрольної групи (тобто необробленим насінням і насінням, обробленим сигнальною молекулою за 7 днів до посіву).

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС

[0024] Для цілей даного винаходу вираз "сигнальна молекула для рослин", який можна використовувати взаємозамінно із "засобом, що стимулює ріст рослин", в цілому стосується будь-якого засобу, як того, який зустрічається в природі у рослин або мікробів, так і синтетичного (який може бути таким, що не зустрічається в природі), який безпосередньо або опосередковано активує біохімічний шлях рослин, що зумовлює збільшений ріст рослин, вимірюваний щонайменше в показниках щонайменше одного зі збільшеної врожайності, що вимірюється в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні. Типові приклади сигнальних молекул для рослин, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають ліпохітоолігосахаридні сполуки (LCO), хітоолігосахариди (CO), хітинові сполуки, флавоноїди, жасмонову кислоту, лінолеву кислоту, та ліноленову кислоту, та їх похідні, та карікіни.

[0025] Сигнальна молекула для рослин може являти собою виділений та/або очищений компонент. Вираз "виділений" означає, що сигнальна молекула витягнена з її природного стану та відокремлена від інших молекул, пов'язаних з нею в природних умовах. Вираз "очищений" означає, що концентрація сигнальної молекули є збільшеною (за допомогою способу очищення) порівняно з іншими компонентами, наприклад, небажаними або другосортними компонентами.

[0026] LCO, також відомі у даній галузі техніки як симбіотичні Nod-сигнали або Nod-фактори, складаються з олігосахаридного кістяка із залишків N-ацетил-D-глюкозаміну ("GlcNAc"), зв'язаних  $\beta$ -1,4-зв'язком, з N-зв'язаним ланцюгом жирного ацилу, конденсованим на невідновлювальному кінці. LCO відрізняються за числом залишків GlcNAc у кістяку, за довжиною та ступенем насиченості ланцюга жирного ацилу та за заміщенням відновлювальних та невідновлювальних цукрових залишків. Приклад LCO представлений нижче як формула I,



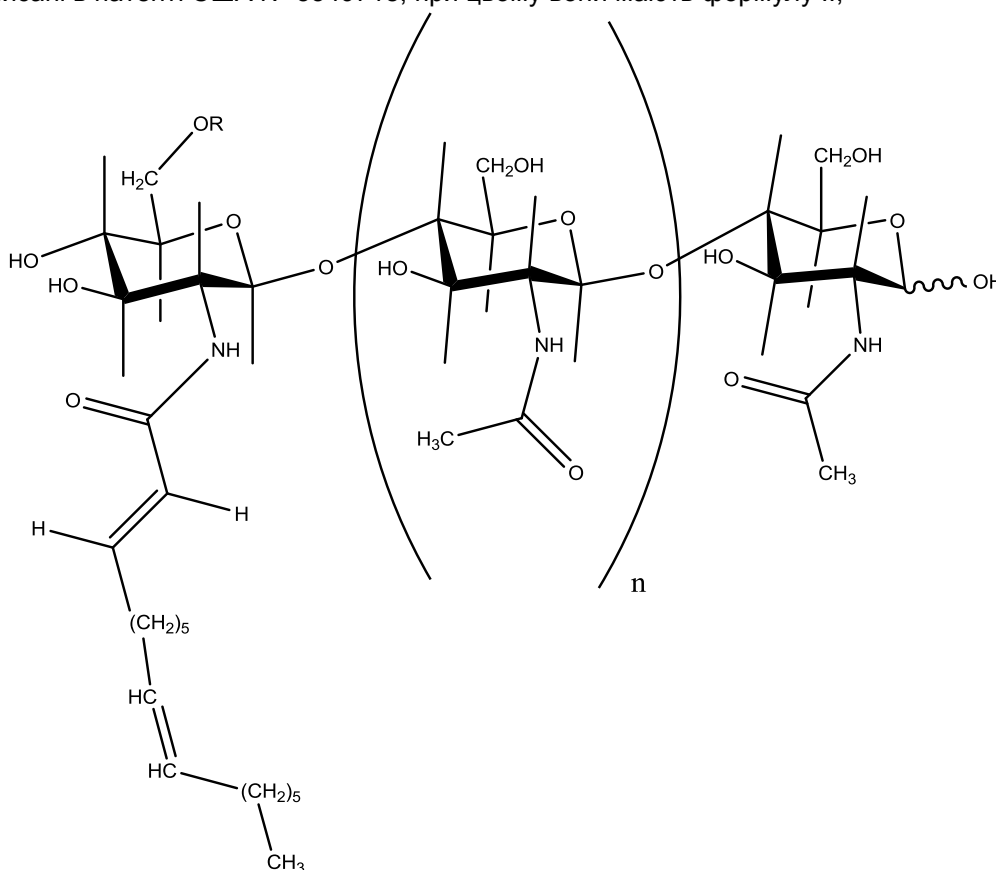
де

G являє собою гексозамін, який може бути заміщений, наприклад, ацетильною групою за азотом, сульфатною групою, ацетильною групою та/або ефірною групою за киснем,

$R_1, R_2, R_3, R_5, R_6$  і  $R_7$ , які можуть бути ідентичними або різними, являють собою  $H$ ,  $CH_3CO-$ ,  $CxHyCO-$ , де  $x$  являє собою ціле число від 0 до 17, а  $y$  являє собою ціле число від 1 до 35, або будь-яку іншу ацильну групу, таку як, наприклад, карбаміл,

$R_4$  являє собою аліфатичний ланцюг з одним, двома або трьома ненасиченими зв'язками та чотирма ненасиченими зв'язками, який містить щонайменше 12 атомів вуглецю, а  $n$  являє собою ціле число від 1 до 4.

[0027] LCO (наприклад, виділений та/або очищений) можна одержати з бактерій, таких як ризобії, наприклад, *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp. та *Azorhizobium* sp. Структура LCO є характерною для кожного такого виду бактерій, і кожний штам може продукувати декілька LCO з різними структурами. Наприклад, конкретні LCO з *S. meliloti* також були описані в патенті США № 5549718, при цьому вони мають формулу II,



де  $R$  являє собою  $H$  або  $CH_3CO-$ , а  $n$  дорівнює 2 або 3.

[0028] Ще конкретніше зазначені LCO включають NodRM, NodRM-1, NodRM-3. Під час ацетилювання ( $R=CH_3CO-$ ) вони перетворюються на AcNodRM-1 і AcNodRM-3, відповідно (патент США № 5545718).

[0029] LCO з *Bradyrhizobium japonicum* описані в патентах США №№ 5175149 і 5321011. Загалом, вони являють собою пентасахаридні фітогормони, що містять метилфукозу. Описана низка цих LCO, отриманих з *B. japonicum*: BjNod-V (C18:1); BjNod-V (Ac, C18:1); BjNod-V (C16:1) і BjNod-V (Ac, C16:0), при цьому "V" позначає наявність п'яти N-ацетилглюкозамінів; "Ac"-ацетилювання; число після "C" позначає число атомів вуглецю у бічному ланцюзі жирної кислоти; і число після "-" - число подвійних зв'язків.

[0030] LCO, що застосовуються у варіантах здійснення даного винаходу, можна одержувати зі штамів бактерій, які продукують LCO, таких як штам *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* (у тому числі *B. japonicum*), *Mesorhizobium*, *Rhizobium* (у тому числі *R. leguminosarum*), *Sinorhizobium* (у тому числі *S. meliloti*), і штамів бактерій, сконструйованих за допомогою генної інженерії так, що вони продукують LCO.

[0031] LCO є головними визначними чинниками для специфічності щодо хазяїна у симбіозі з бобовими рослинами (Diaz, et al., Mol. Plant-Microbe Interactions 13:268-276 (2000)). Таким чином, у межах родини бобових у певних родів і видів ризобій виникають симбіотичні взаємозв'язки, пов'язані з фіксацією азоту, з певним хазяїном, що належить до бобових рослин. Ці комбінації рослина-хазяїн/бактерії описані в Hungria, et al., Soil Biol. Biochem. 29:819-830

(1997), при цьому приклади цих симбіотичних партнерських взаємин бактерія/бобова рослина включають *S. meliloti*/люцерна та буркун білий; *R. leguminosarum* біовар *viciae*/різновиди гороху та різновиди сочевиці; *R. leguminosarum* біовар *phaseoli*/різновиди квасолі; *Bradyrhizobium japonicum*/різновиди сої та *R. leguminosarum* біовар *trifolii*/червона конюшина. *Hungria* також перераховує ефективні флавоноїдні індуктори генів *Nod* з видів ризобій і структури специфічних LCO, які продукують різні види ризобій. Проте, специфічність LCO необхідна тільки для забезпечення утворення бульбочок у бобових рослин. У здійсненні даного винаходу застосування даного LCO не обмежується обробкою насіння його симбіотичного партнера, що належить до бобових рослин, для досягнення збільшеної врожайності рослин, що вимірюється в бушелях/акр, збільшеної кількості коренів, збільшеної довжини коренів, збільшеної маси коренів, збільшеного об'єму коренів і збільшеної листової поверхні порівняно з рослинами, отриманими з необробленого насіння, або порівняно з рослинами, отриманими з насіння, обробленого сигнальною молекулою безпосередньо перед посівом або в межах тижня до посіву або менше. Таким чином, наприклад, LCO, отриманий з *B. japonicum*, можна застосовувати для обробки насіння бобової рослини, що відрізняється від сої, та насіння рослини, що не належить до бобових, наприклад, кукурудзи. Як інший приклад, LCO для гороху, одержуваний з *R. leguminosarum*, проілюстрований на фіг. 1 (позначений LCO-V (C18:1), SP104), можна застосовувати для обробки насіння бобової рослини, що відрізняється від гороху, а також рослин, що не належать до бобових.

[0032] Даний винахід також охоплює застосування LCO, отриманих (наприклад, виділених та/або очищених) з арбускулярних мікоризних грибів, таких як гриби з групи *Glomeromycota*, наприклад, *Glomus intraradicis*. Структури типових LCO, отриманих з цих грибів, описані в WO 2010/049751 і WO 2010/049751 (LCO, описані в цих документах, також мають назву "Мус-факторів").

[0033] Даний винахід додатково охоплює застосування синтетичних сполук LCO, наприклад, тих, які описані у WO 2005/063784, і рекомбінантних LCO, отриманих за допомогою генної інженерії. Базова структура LCO, які зустрічаються в природі, може містити модифікації або заміщення, що виявляються в LCO, які зустрічаються в природі, наприклад, тих, які описані в Spaink, Crit. Rev. Plant Sci. 54:257-288 (2000); і D'Haese, et al., Glycobiology 12:79R-105R (2002). Молекули олігосахаридів, що належать до попередників (CO, які описані нижче, також є придатними як сигнальні молекули для рослин за даним винаходом), для конструювання LCO також можуть бути синтезовані організмами, сконструйованими за допомогою генної інженерії, наприклад, як в Samain, et al., Carb. Res. 302:35-42, 1997).

[0034] LCO можна використовувати у різних формах чистоти та можна застосовувати окремо або у формі культури бактерій або грибів, що продукують LCO. Наприклад, OPTIMIZE® (комерційно доступний від Novozymes BioAg Limited) містить культуру *B. japonicum*, яка продукує LCO (LCO-V (C18:1, MeFuc), MOR116), проілюстрований на фіг. 2. Способи для забезпечення фактично чистих LCO включають тільки витягнення мікробних клітин із суміші LCO та мікроба або продовження виділення та очищення молекул LCO за допомогою розділення фаз LCO-розчинник із наступною ВЕРХ-хроматографією, як описано, наприклад, у патенті США № 5549718. Очищення можна поліпшити за допомогою повторної ВЕРХ, і очищені молекули LCO можна ліофілізувати для довготермінового зберігання.

[0035] Хітини та хітозани, які є основними компонентами клітинних стінок грибів і екзоскелетів комах і ракоподібних, також складаються із залишків GlcNAc. Хітинові сполуки включають хітин (IUPAC: N-[5-[[3-ацетиламіно-4,5-дигідрокси-6-(гідроксиметил)оксан-2-іл]метоксиметил]-2-[[5-ацетиламіно-4,6-дигідрокси-2-(гідроксиметил)оксан-3-іл]метоксиметил]-4-гідрокси-6-(гідроксиметил)оксан-3-іл]етанамід) і хітозан (IUPAC: 5-аміно-6-[5-аміно-6-[5-аміно-4,6-дигідрокси-2-(гідроксиметил)оксан-3-іл]окси-4-гідрокси-2-(гідроксиметил)оксан-3-іл]окси-2-(гідроксиметил)оксан-3,4-діол). Ці сполуки можна одержувати комерційно, наприклад, від Sigma-Aldrich, або одержувати з комах, панцирів ракоподібних або клітинних стінок грибів. Способи одержання хітину та хітозану відомі в даній галузі техніки і були описані, наприклад, у патенті США № 4536207 (одержання з панцирів ракоподібних), Pochanavanich, et al., Lett. Appl. Microbiol. 35:17-21 (2002) (одержання з клітинних стінок грибів) і патенті США № 5965545 (одержання з панцирів крабів і гідроліз комерційного хітозану). Можна одержувати деацетилювані хітини та хітозани, ступінь деацетилювання яких варіює від менше 35 % до більше 90 %, і при цьому охоплюється широкий спектр молекулярних мас, наприклад, олігомери хітозану з низькою молекулярною масою менше 15 кДа та олігомери хітину 0,5-2 кДа; хітозан "практичного ступеня чистоти" з молекулярною масою приблизно 150 кДа та хітозан з високою молекулярною масою до 700 кДа. Композиції на основі хітину та хітозану, складені для обробки

насіння, також є комерційно доступними. Комерційні продукти включають, наприклад, ELEXA® (Plant Defense Boosters, Inc.) і BEYOND™ (Agrihouse, Inc.).

[0036] Додаткові хітинові сполуки, які є придатними для застосування за даним винаходом, включають СО (наприклад, виділені та/або очищені). СО відомі в даній галузі техніки як структури на основі N-ацетилглюкозамінів, зв'язаних β-1-4-зв'язками, визначені як олігомери хітину, а також як N-ацетилхітоолігосахариди. СО мають унікальні та різні фрагменти бічного ланцюга, які відрізняють їх від молекул хітину [(C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, № згідно з CAS 1398-61-4], і молекул хітозану [(C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>, № згідно з CAS 9012-76-4]. Типова література, у якій описані структура та одержання СО, являє собою наступне: Van der Holst, et al., *Current Opinion in Structural Biology*, 11:608-616 (2001); Robina, et al., *Tetrahedron* 58:521-530 (2002); Hanel, et al., *Planta* 232:787-806 (2010); Rouge, et al., Chapter 27, "The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates" в *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Science; Wan, et al., *Plant Cell* 21:1053-69 (2009); PCT/F100/00803 (9/21/2000) і Demont-Caulet, et al., *Plant Physiol.* 120(1):83-92 (1999). Два СО, придатні для застосування за даним винаходом, можна легко одержати з LCO, показаних на фіг. 1 і 2 (без ланцюгів жирної кислоти), які є СО-попередниками LCO, показаних на фіг. 1 і 2. Способи одержання рекомбінантних СО відомі в даній галузі техніки. Див., наприклад, Samain, et al. (вище); Cottaz, et al., *Meth. Eng.* 7(4):311-7 (2005); та Samain, et al., *J. Biotechnol.* 72:33-47 (1999).

[0037] Флавоноїди являють собою фенольні сполуки, що мають загальну структуру з двох ароматичних кілець, з'єднаних тривуглецевим містком. Флавоноїди продукуються рослинами та мають багато функцій, наприклад, як корисні сигнальні молекули і як засоби захисту від комах, тварин, грибів і бактерій. Класи флавоноїдів включають халкони, антоціанідини, кумарини, флаволи, флаванони, флаванони та ізофлаволи. Див. Jain, et al., *J. Plant Biochem. & Biotechnol.* 11:1-10 (2002); Shaw, et al., *Environmental Microbiol.* 11:1867-80 (2006).

[0038] Типові флавоноїди, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають геністеїн, даїдзеїн, формонетин, нарингенін, гесперетин, лютеолін та апігенін. Флавоноїдні сполуки є комерційно доступними, наприклад, від Natland International Corp., Research Triangle Park, Північна Кароліна; MP Biomedicals, Ірвайн, Каліфорнія; LC Laboratories, Вобурн, Массачусетс. Флавоноїдні сполуки можна виділяти з рослин або насіння, наприклад, як описано в патентах США №№ 5702752; 5990291 і 6146668. Флавоноїдні сполуки також можуть продукувати організми, сконструйовані за допомогою генної інженерії, такі як дріжджі, як описано в Ralston, et al., *Plant Physiology* 137:1375-88 (2005).

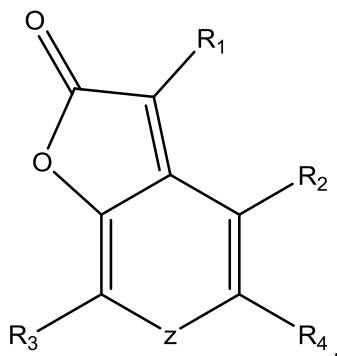
[0039] В інших варіантах здійснення насіння обробляють жасмоновою кислотою (JA, [1R-[1α,2β(Z)]]-3-оксо-2-(пентеніл)циклопентаноютовою кислотою) та її похідними, лінолевою кислотою ((Z,Z)-9,12-октадекадієною кислотою) та її похідними та ліноленовою кислотою ((Z,Z,Z)-9,12,15-октадекатрієною кислотою) та її похідними. Жасмонова кислота та її метиловий складний ефір, метилжасмонат (MeJA), разом відомі як жасмонати, являють собою октадеканічні сполуки, які зустрічаються в природі у рослин. Жасмонову кислоту продукують коріння паростків пшениці та грибні мікроорганізми, наприклад, *Botryodiplodia theobromae* і *Gibberella fujikuroi*, дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*) та патогенні і непатогенні штами *Escherichia coli*. Лінолева кислота та ліноленова кислота утворюються в ході біосинтезу жасмонової кислоти. Як повідомляється, жасмонати, лінолева кислота та ліноленова кислота (та їх похідні) є індукторами експресії гена *nod* або утворення LCO ризобактеріями. Див., наприклад, Mabood, Fazli, *Jasmonates induce the expression of nod genes in Bradyrhizobium japonicum*, May 17, 2001 і Mabood, Fazli, "Linoleic and linolenic acid induce the expression of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*", USDA 3, May 17, 2001.

[0040] Придатні похідні лінолевої кислоти, ліноленової кислоти та жасмонової кислоти, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають складні ефіри, аміді, глікозиди та солі. Типові складні ефіри являють собою сполуки, у яких карбоксильна група лінолевої кислоти, ліноленової кислоти або жасмонової кислоти була замінена на групу -COR, де R являє собою групу -OR<sup>1</sup>, у якій R<sup>1</sup> являє собою алкільну групу, як, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкільну групу, наприклад, метильну, етильну або пропильну групу; алкенільну групу, як, наприклад, нерозгалужену або розгалужену алкенільну групу; C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкінільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкінільну групу; арильну групу, що має, наприклад, 6-10 атомів вуглецю; або гетероарильну групу, що має, наприклад, 4-9 атомів вуглецю, де гетероатоми в гетероарильній групі можуть являти собою, наприклад, N, O, P або S. Типові аміді являють собою сполуки, у яких карбоксильна група лінолевої кислоти, ліноленової кислоти або жасмонової кислоти була замінена на групу -COR, де R являє собою групу NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, у якій R<sup>2</sup> і R<sup>3</sup> незалежно являють собою водень; алкільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкільну групу, наприклад, метильну, етильну



або пропільну групу; алкенільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену  $C_2$ - $C_8$ алкенільну групу; алкінільну групу, наприклад, нерозгалужену або розгалужену  $C_2$ - $C_8$ алкінільну групу; арильну групу, що має, наприклад, 6-10 атомів вуглецю; або гетероарильну групу, що має, наприклад, 4-9 атомів вуглецю, де гетероатоми у гетероарильній групі можуть являти собою, наприклад, N, O, P або S. Складні ефіри можна одержувати за допомогою відомих способів, наприклад, каталізованого кислотою нуклеофільного приєднання, де здійснюють реакцію карбонової кислоти зі спиртом за присутності каталітичної кількості мінеральної кислоти. Аміди також можна одержувати за допомогою відомих способів, наприклад, шляхом реакції карбонової кислоти з відповідним аміном за присутності сполучної речовини, такої як дициклогексилкарбодіїмід (DCC), у нейтральних умовах. Придатні солі лінолевої кислоти, ліноленової кислоти та жасмонової кислоти включають, наприклад, солі приєднання основи. Основи, які можна застосовувати як реактиви для одержання метаболічно прийнятних основних солей цих сполук, включають ті, які отримані з катіонами, наприклад, катіонами лужних металів (наприклад, калію і натрію) і катіонами лужноземельних металів (наприклад, кальцію і магнію). Ці солі можна легко одержувати за допомогою змішування розчину лінолевої кислоти, ліноленової кислоти або жасмонової кислоти з розчином основи. Цю сіль можна осаджувати з розчину й збирати за допомогою фільтрації або можна витягувати за допомогою інших засобів, наприклад, за допомогою випарювання розчинника.

[0041] В інших варіантах здійснення насіння обробляють вінілогічним 4H-піроном, наприклад, 2H-фуоро[2,3-с]піран-2-онами, у тому числі їх похідними й аналогами, приклади яких представлені наступною структурою:



де Z являє собою O, S або  $NR_5$ ; кожний з  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  і  $R_4$  незалежно являє собою H, алкіл, алкеніл, алкініл, феніл, бензил, гідроксі, гідроксіалкіл, алкокси, фенілокси, бензилокси, CN,  $COR_6$ ,  $COOR_7$ , галоген,  $NR_6R_7$  або  $NO_2$ ; і кожний з  $R_5$ ,  $R_6$  і  $R_7$  незалежно являє собою H, алкіл або алкеніл, або їх біологічно прийнятною сіллю. Приклади біологічно прийнятних солей цих сполук можуть включати солі приєднання кислоти, утворені біологічно прийнятними кислотами, приклади яких включають гідрохлорид, гідробромід, сульфат або бісульфат, фосфат або гідрофосфат, ацетат, бензоат, сукцинат, фумарат, малеат, лактат, цитрат, тартрат, глюконат; метансульфонат, бензенсульфонат і п-толуенсульфонову кислоту. Додаткові біологічно прийнятні солі металів можуть включати солі лужних металів, отримані з основами, приклади яких включають натрієві та калієві солі. Приклади сполук, які охоплюються структурою та можуть бути придатними для застосування за даним винаходом, включають наступні: 3-метил-2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1=CH_3$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4=H$ ), 2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4=H$ ), 7-метил-2H-фуоро[2,3-с]піран-он (де  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4=H$ ,  $R_3=CH_3$ ), 5-метил-2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=CH_3$ ), 3,7-диметил-2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1$ ,  $R_3=CH_3$ ,  $R_2$ ,  $R_4=H$ ), 3,5-диметил-2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1$ ,  $R_4=CH_3$ ,  $R_2$ ,  $R_3=H$ ), 3,5,7-триметил-2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4=CH_3$ ,  $R_2=H$ ), 5-метоксиметил-3-метил-2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1=CH_3$ ,  $R_2$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=CH_2OCH_3$ ), 4-бром-3,7-диметил-2H-фуоро[2,3-с]піран-2-он (де  $R_1$ ,  $R_3=CH_3$ ,  $R_2=Br$ ,  $R_4=H$ ), 3-метилфуоро[2,3-с]піридин-2(3H)-он (де  $Z=NH$ ,  $R_1=CH_3$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4=H$ ), 3,6-диметилфуоро[2,3-с]піридин-2(6H)-он (де  $Z=N-CH_3$ ,  $R_1=CH_3$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4=H$ ). Див. патент США № 7576213. Ці молекули також відомі як карикіни. Див. Halford, вище.

[0042] Насіння можна обробляти сигнальною молекулою для рослин у декілька способів, але переважно шляхом розпилення або розбризкування. Обробку за допомогою розпилення та розбризкування можна проводити шляхом складання ефективної кількості сигнальної молекули для рослин у прийнятному з погляду сільського господарства носії, звичайно водному за своєю природою, і розпилення або розбризкування композиції на насіння за допомогою системи для безперервної обробки (відрегульованої для застосування обробки із заздалегідь заданою нормою пропорційно до постійного розходу насіння), наприклад, обладнання для обробки барабанного типу. У цих способах переважно використовують порівняно невеликі об'єми носія

для того, щоб забезпечити порівняно швидке висушування обробленого насіння. У такий спосіб можна ефективно обробляти більші обсяги насіння. Також можна використовувати системи для роботи з партіями, у яких попередньо визначений розмір партії насіння і композицій на основі сигнальної молекули доставляють у мішалку. Системи та установки для здійснення цих способів є комерційно доступними від численних постачальників, наприклад, Bayer CropScience (Gustafson).

[0043] В іншому варіанті здійснення обробка передбачає нанесення покриття на насіння. Один такий спосіб включає покривання внутрішньої стінки сферичного контейнера композицією, додавання насіння, потім обертання контейнера для приведення насіння у контакт зі стінкою та композицією, при цьому спосіб відомий у даній галузі техніки як "нанесення покриття за допомогою контейнера". На насіння можна наносити покриття за допомогою комбінацій способів нанесення покриття. Просочування звичайно передбачає застосування водного розчину, що містить засіб, який стимулює ріст рослин. Наприклад, насіння можна просочувати протягом періоду від приблизно 1 хвилини до приблизно 24 годин (наприклад, протягом щонайменше 1 хв., 5 хв., 10 хв., 20 хв., 40 хв., 80 хв., 3 год., 6 год., 12 год., 24 год.). Деякі типи насіння (наприклад, насіння сої) виявляють чутливість до вологості. Таким чином, просочування такого насіння протягом тривалого періоду часу може бути небажаним, у цьому випадку просочування звичайно здійснюють протягом від приблизно 1 хвилини до приблизно 20 хвилин.

[0044] Не бажаючи обмежуватися будь-якою конкретною теорією дій, заявники припускають, що навіть у тих випадках, коли обробка може не викликати те, що сигнальна молекула для рослин залишається в контакт з поверхнею насіння після обробки та під час будь-якого періоду зберігання, сигнальна молекула може забезпечувати досягнення передбачуваних ефектів за допомогою явища, відомого як пам'ять насіння або сприйняття насіння. Див. Macchiavelli and Brelles-Marino, J. Exp. Bot. 55(408):2635-40 (2004). Заявники також припускають, що після обробки сигнальна молекула, наприклад LCO, дифундує в напрямку до молодого зародкового кореня, що розвивається, і активує гени, пов'язані із симбіозом і розвитком, що зумовлює зміну будови коріння рослини. Проте, композиції, які містять сигнальну молекулу для рослин, можуть додатково містити клейкий або покривний засіб для того, щоб сприяти прилипанню сигнальної молекули до насіння. З естетичною метою композиції можуть додатково містити покривний полімер та/або барвник.

[0045] Ефективна кількість сигнальної молекули для рослин, використовуваної для обробки насіння, яку виражено в одиницях концентрації, як правило, перебуває в діапазоні від приблизно  $10^{-5}$  до приблизно  $10^{-14}$  М, і в деяких варіантах здійснення від приблизно  $10^{-5}$  до приблизно  $10^{-11}$  М, і в деяких інших варіантах здійснення від приблизно  $10^{-7}$  до приблизно  $10^{-8}$  М. Ефективна кількість, виражена в одиницях маси, як правило, перебуває в діапазоні від приблизно 1 до приблизно 400 мкг/хандредвейт (свт) насіння, і в деяких варіантах здійснення від приблизно 2 до приблизно 70 мкг/свт, і в деяких інших варіантах здійснення від приблизно 2,5 до приблизно 3,0 мкг/свт насіння. Ефективну кількість сигнальної молекули для рослин, однак, можна одержати за допомогою відповідного аналізу залежності ефекту від дози, переважно у дослідженні в теплиці та/або польових умовах.

[0046] Обробка також може включати приведення насіння в контакт із корисним з погляду сільського господарства/агрономічно корисним засобом до приведення в контакт із сигнальною молекулою для рослин, одночасно з ним або після нього. Використовуваний у даному документі та у даній галузі техніки вираз "корисний з погляду сільського господарства або агрономічно корисний" стосується засобів, які у випадку застосування щодо насіння зумовлюють стимулювання (яке може бути статистично значущим) характеристик рослин, таких як густина стояння, ріст, потужність або врожайність рослин, порівняно з необробленим насінням. Типові приклади цих засобів, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають, але без обмеження, діазотрофи, мікоризні гриби, гербіциди, фунгіциди, інсектициди та засоби, що солюбілізують фосфати.

[0047] Придатні гербіциди включають бентазон, ацифлуорфен, хлоримурон, лактофен, кломазон, флуазифоп, глюфосинат, гліфосат, сетоксидим, імазетапір, імазамокс, фомесаф, флуміклорак, імазаквін і клетодим. Комерційні продукти, що містять кожну із цих сполук, є легкодоступними. Концентрація гербіциду в композиції, як правило, буде відповідати зазначеній нормі використання для певного гербіциду.

[0048] "Фунгіцид", як використовується в даному документі та у даній галузі техніки, являє собою засіб, який знищує гриби або пригнічує їх ріст. Як використовується в даному документі, фунгіцид "характеризується активністю щодо" певних видів грибів, якщо обробка фунгіцидом зумовлює знищення або пригнічення росту популяції грибів (наприклад, у ґрунті) порівняно з необробленою популяцією. Ефективні фунгіциди згідно з даним винаходом, відповідно, будуть

характеризуватися активністю щодо широкого спектра патогенів, у тому числі, але без обмеження, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phomopsis* або *Sclerotinia* і *Phakopsora* та їх комбінації.

[0049] Комерційні фунгіциди можуть бути придатними для застосування у даному винаході.

- 5 Придатні комерційно доступні фунгіциди включають PROTÉGÉ, RIVAL або ALLEGIANCE FL або LS (Gustafson, Плейно, Техас), WARDEN RTA (Agrilance, Сент-Пол, Міннесота), APRON XL, APRON MAXX RTA або RFC, MAXIM 4FS або XL (Syngenta, Вілмінгтон, Делавер), CAPTAN (Arvesta, Гвелф, Онтаріо) і PROTREAT (Nitragin Argentina, Буенос-Айрес, Аргентина). Активні інгредієнти в цих та інших комерційних фунгіцидах включають, але без обмеження,
- 10 флудіоксоніл, мефеноксам, азоксистробін і металаксил. Комерційні фунгіциди найдоцільніше застосовують згідно з інструкціями виробника в рекомендованих концентраціях.

- [0050] Як використовується в даному документі, інсектицид "характеризується активністю щодо" певних видів комах, якщо обробка інсектицидом зумовлює знищення або пригнічення популяції комах порівняно з необробленою популяцією. Ефективні інсектициди згідно з даним
- 15 винаходом, відповідно, будуть характеризуватися активністю щодо широкого спектра комах, у тому числі, але без обмеження, дротяників, совок, червоподібних личинок, кукурудзяного жука, личинок мухи паросткової, земляних блішок, клопів-наземників, попелиць, листоїдів і щитників.

- [0051] Комерційні інсектициди можуть бути придатними для застосування за даним винаходом. Придатні комерційно доступні інсектициди включають CRUISER (Syngenta, Вілмінгтон, Делавер), GAUCHO і PONCHO (Gustafson, Плейно, Техас). Активні інгредієнти в цих та інших комерційних інсектицидах включають тіаметоксам, клотіанідин та імідаклопрід. Комерційні інсектициди найдоцільніше застосовують згідно з інструкціями виробника в
- 20 рекомендованих концентраціях.

- [0052] Як використовується в даному документі, засоби, що солюбілізують фосфати, включають, але без обмеження, мікроорганізми, що солюбілізують фосфати. Як використовується в даному документі, "мікроорганізм, що солюбілізує фосфати" являє собою мікроорганізм, який здатний збільшувати кількість фосфору, доступного для рослини. Мікроорганізми, що солюбілізують фосфати, включають штами грибів і бактерій. У варіанті
- 25 здійснення мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, являє собою споротвірний мікроорганізм.

- [0053] Необмежувальні приклади мікроорганізмів, що солюбілізують фосфати, включають види з роду, вибраного з групи, яка включає *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*,
- 30 *Swaminathanian*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter* і *Xanthomonas*.

- [0054] Необмежувальні приклади мікроорганізмів, що солюбілізують фосфати, вибрані з групи, яка включає *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*,
- 40 *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissi*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium* sp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., *Swaminathanian salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis* і *Xanthomonas campestris*.
- 45

- [0055] Переважно, мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, являє собою штам гриба *Penicillium*. Штами гриба *Penicillium*, які можуть бути придатними для здійснення даного винаходу, включають *P. bilaiae* (раніше відомий як *P. bilaii*), *P. albidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. frequentas*, *P. fuscum*, *P. gaestrivorus*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum*, *P. janthinellum*, *P. lilacinum*, *P. minioluteum*, *P. montanense*, *P. nigricans*, *P. oxalicum*, *P. pinetorum*, *P. pinophilum*, *P. purpureogenum*, *P. radicans*, *P. radicum*, *P.*
- 50 *raistrickii*, *P. rugulosum*, *P. simplicissimum*, *P. solitum*, *P. variable*, *P. velutinum*, *P. viridicatum*, *P. glaucum*, *P. fussiporus* і *P. expansum*.

[0056] Переважніше, мікроорганізм, що солюбілізує фосфати, виду з роду *Penicillium* являє собою *P. bilaiae*, *P. gaestrivorus* та/або їх комбінацію. Найпереважніше, штами *P. bilaiae* вибрані з групи, що включає ATCC 20851, NRRL 50169, ATCC 22348, ATCC 18309, NRRL 50162 (Wakelin,

et al., 2004. Biol Fertil Soils 40:36 43), і штам *P. gaestrivorus* являє собою NRRL 50170 (див. Wakelin, вище).

[0057] Згідно з даним винаходом передбачається, що можна застосовувати більше одного мікроорганізму, що солюбілізує фосфати, наприклад, щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять, щонайменше шість, у тому числі будь-яку комбінацію *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Candida*, *Chryseomonas*, *Enterobacter*, *Eupenicillium*, *Exiguobacterium*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Microbacterium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Paenibacillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Swaminathan*, *Thiobacillus*, *Torulospora*, *Vibrio*, *Xanthobacter* і *Xanthomonas*, у тому числі один вид, вибраний з наступної групи: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Arthrobotrys oligospora*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Azospirillum halopraeferans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Candida krissi*, *Chryseomonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter taylorae*, *Eupenicillium parvum*, *Exiguobacterium* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera cryocrescens*, *Microbacterium* sp., *Mucor ramosissimus*, *Paecilomyces hepialid*, *Paecilomyces marquandii*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus mucilaginosus*, *Pantoea agglomerans*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas poae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas trivialis*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* sp., *Streptosporangium* sp., *Swaminathan salitolerans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Torulospora globosa*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis* і *Xanthomonas campestris*.

[0058] Діазотрофи являють собою бактерії та археї, які фіксують атмосферний газоподібний азот з утворенням форми, придатнішої для використання, наприклад, амонію. Приклади діазотрофів включають бактерії з родів *Rhizobium* spp. (наприклад, *R. cellulosilyticum*, *R. daejeonense*, *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardinii*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. indigoferae*, *R. leguminosarum*, *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. meliloti*, *R. mongolense*, *R. miluonense*, *R. sullae*, *R. tropici*, *R. undicola* та/або *R. yanglingense*), *Bradyrhizobium* spp. (наприклад, *B. betae*, *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi* та/або *B. yuanmingense*), *Azorhizobium* spp. (наприклад, *A. caulinodans* та/або *A. doebereineriae*), *Sinorhizobium* spp. (наприклад, *S. abri*, *S. adhaerens*, *S. americanum*, *S. aboris*, *S. fredii*, *S. indiaense*, *S. kostiense*, *S. kummerowiae*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. mexicanus*, *S. morelense*, *S. saheli*, *S. terangae* та/або *S. xinjiangense*), *Mesorhizobium* spp. (*M. albiziae*, *M. amorphae*, *M. chacoense*, *M. ciceri*, *M. huakuii*, *M. loti*, *M. mediterraneum*, *M. pluifarium*, *M. septentrionale*, *M. temperatum* та/або *M. tianshanense*) та їх комбінації. У певному варіанті здійснення діазотроф вибраний з групи, яка включає *B. japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *S. meliloti* та їх комбінації. В іншому варіанті здійснення діазотроф являє собою *B. japonicum*. В іншому варіанті здійснення діазотроф являє собою *R. meliloti*. В іншому варіанті здійснення діазотроф являє собою *S. meliloti*.

[0059] Мікоризні гриби утворюють симбіотичні асоціації з корінням судинних рослин і забезпечують, наприклад, здатність до поглинання води та мінеральних поживних речовин завдяки порівняно великій площі поверхні міцелію. Мікоризні гриби охоплюють ендомікоризні гриби (що також мають назву везикулярно-арбускулярних мікоризних грибів, VAM, арбускулярних мікоризних грибів або AM), ектомікоризні гриби або їх комбінацію. В одному варіанті здійснення мікоризні гриби являють собою ендомікоризні гриби з типу *Glomeromycota* і родів *Glomus* і *Gigaspora*. У додатковому варіанті здійснення ендомікоризний гриб являє собою штам *Glomus aggregatum*, *Glomus brasilianum*, *Glomus clarum*, *Glomus deserticola*, *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus monosporum*, або *Glomus mosseae*, *Gigaspora margarita*, або їх комбінацію.

[0060] Приклади мікоризних грибів включають ектомікоризні гриби з типів *Basidiomycota*, *Ascomycota* і *Zygomycota*. Інші приклади включають штами *Laccaria bicolor*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon amylopogon*, *Rhizopogon fulvigleba*, *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon villosuli*, *Scleroderma cера*, *Scleroderma citrinum* або їх комбінацію.

[0061] Мікоризні гриби включають гриби, що утворюють ерикоїдні мікоризи, арбутоїдні мікоризи або монотропоїдні мікоризи. Арбускулярні мікоризні та ектомікоризні гриби утворюють ерикоїдну мікоризу з багатьма рослинами, що належать до порядку *Ericales*, тоді як у деяких *Ericales* утворюється арбутоїдна та монотропоїдна мікориза. В одному варіанті здійснення мікориза може являти собою ерикоїдну мікоризу, яку переважно утворюють гриби з типу *Ascomycota*, наприклад, *Hymenoscyphous ericae* або *Oidiodendron* sp. В іншому варіанті

здійснення мікориза також може являти собою арбутоїдну мікоризу, яку переважно утворюють гриби з типу Basidiomycota. У ще одному варіанті здійснення мікориза може являти собою монотропоїдну мікоризу, яку переважно утворюють гриби з типу Basidiomycota. У ще одному варіанті здійснення мікориза може являти собою орхідну мікоризу, яку переважно утворюють гриби з роду Rhizoctonia.

[0062] Способи за даним винаходом є застосовними до насіння бобової рослини, типові приклади якої включають сою, люцерну, арахіс, горох, сочевицю, квасолю та конюшину. Способи за даним винаходом також є застосовними до насіння рослини, що не належить до бобових, наприклад, з родин Poaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae і Solonaceae. Типові приклади насіння рослини, що не належить до бобових, включають польові культури, наприклад, кукурудзу, зернові культури, наприклад, рис, ячмінь і пшеницю, бавовник та канолу, і овочеві культури, наприклад, різновиди картоплі, різновиди томату, різновиди огірка, різновиди буряка, латук і канталупу.

[0063] Після обробки та з метою зберігання насіння потім упаковують, наприклад, у мішки на 50 фунтів або 100 фунтів, або мішки для сипких матеріалів, або контейнери відповідно до стандартних методик. Насіння зберігають протягом щонайменше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 або 12 місяців і навіть довше, наприклад, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 місяців або навіть довше у відповідних умовах зберігання, відомих у даній галузі техніки. Як використовується в даному документі, вираз "місяць" має означати 30 днів. Як використовується в даному документі, рік має означати 365 днів. У той час як насіння сої може підлягати висіванню в наступний сезон, насіння кукурудзи можна зберігати протягом набагато триваліших періодів часу, у тому числі понад 3 роки.

[0064] Сигнальну молекулу для рослин можна застосовувати у будь-який придатний спосіб, наприклад, у формі композиції для обробки насіння, яка містить щонайменше одну сигнальну молекулу для рослин і носій, прийнятний з погляду сільського господарства.

[0065] Можна застосовувати будь-який придатний носій, прийнятний з погляду сільського господарства, наприклад, твердий носій, напіврідкий носій, рідкий носій на водній основі, рідкий носій на неводній основі, суспензію, емульсію або концентрат, що емульгується. Носії, прийнятні з погляду сільського господарства, можуть включати, наприклад, допоміжні речовини, інертні компоненти, диспергатори, поверхнево-активні речовини, речовини, що надають клейкість, сполучні речовини, стабілізатори та/або полімери.

[0066] Композиція для обробки насіння додатково може включати один або декілька корисних з погляду сільського господарства/агрономічно корисних засобів (тобто на додаток до сигнальної молекули), наприклад, один або декілька діазотрофів, мікоризні гриби, гербіциди, фунгіциди, інсектициди та/або засоби, що солубілізують фосфати.

[0067] Даний винахід тепер буде описано за допомогою наступних необмежувальних прикладів. Вони представлені винятково з метою ілюстрації та не призначені для обмеження даного винаходу будь-яким чином.

Короткий опис робочих прикладів

[0068] У прикладах 1 і 2 описані порівняльні експерименти в польових умовах із застосуванням насіння сої, у яких було продемонстровано, що із заявленим винаходом досягалася збільшена врожайність рослин. Насіння обробляли згідно із даним винаходом за 5 місяців до посіву комерційним продуктом Optimize®, який являв собою комбінацію інокулянта *Bradyrhizobium japonicum* і LCO-V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) (проілюстрований на фіг. 2), і тільки чистим LCO, і за 4,5 місяця до посіву Optimize® некомерційного класу (тобто меншої чистоти) і тільки LCO, і, з метою порівняння саме цих сигнальних молекул для рослин, під час посіву. Необроблене насіння використовували як ще один контроль. Результати, виражені з погляду відмінностей у врожаї зерна, що вимірюється у бушелях/акр, продемонстрували, що в способах за заявленим винаходом досягалася збільшення врожайності сої порівняно зі способами, що не належать до таких за даним винаходом (тобто з насінням, обробленим під час посіву, та необробленим насінням).

[0069] У прикладах 3 і 4 описані порівняльні експерименти, проведені в теплиці, і при цьому було продемонстровано, що із заявленим винаходом досягалася збільшення інших характеристик росту рослин. У прикладі 3 описаний експеримент, у якому передбачалася обробка насіння сої чистим LCO-V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) за один місяць та один рік перед посівом. Рослини сої (у тому числі коріння) збирали через десять днів після посіву. Результати, описані з погляду відмінностей у довжині й об'ємі коренів, продемонстрували, що зі способами за даним винаходом досягалася значне збільшення цих властивостей. На закінчення, у прикладі 4 описані експерименти, проведені з використанням насіння сої, обробленого Optimize® за 55 днів до посіву, і, з метою порівняння, насіння сої, обробленого за 7 днів до посіву, і

необробленого насіння. Результати, виражені в одиницях середньої площі поверхні листків першого трилисника, продемонстрували, що заявлений винахід передбачає стимулювання росту рослин також і в цьому сенсі.

#### ПРИКЛАД 1

[0070] Випробування в польових умовах проводили для оцінки варіантів здійснення даного винаходу за врожаєм зерна стосовно до насіння сої. Ділянка для випробування в польових умовах була розташована поблизу від Вайтвотера, Вісконсин, і характеризувалася ґрунтом на основі пилувато-мулуватого суглинку за Мілфордом. Дослідження ґрунту, проведене за шість місяців до посіву, продемонструвало pH ґрунту 6,8, вміст органічної речовини 5,3 % і значення вмісту фосфору та калію 39 частин на мільйон і 139 частин на мільйон, відповідно.

[0071] Сигнальні молекули для рослин, використовувані в цьому випробуванні, являли собою Optimize®, Optimize® некомерційного класу (NI-50S-1), чистий LCO-V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) (NI-50GREN-1) і LCO-V некомерційного класу (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) (NI-50S-2CF). Насіння сої, використовуване в цьому дослідженні, являло собою Stine S2118. Сигнальні молекули для рослин розпилювали на насіння з розведенням/без розведення з нормою 4,8 рідкої унції/cwt.

[0072] Дослідження проводили за рандомізованим повноблоковим планом із розміром дослідної ділянки 10 футів на 50 футів (0,011 акра) з міжрядною відстанню 7,5 дюйма. Здійснювали чотири повторності. Насіння обробляли сигнальними молекулами для рослин за 4,5 або 5 місяців до посіву та безпосередньо перед посівом і висівали на глибину 1 дюйм і з нормою для паростків 225000 насінин на акр із застосуванням зернової сіялки John Deere 750 NT. Обидва пестициди Extreme® і AMPS® застосовували за 11 днів до посіву (до появи сходів) з нормами 3,0 пінти й 2,5 фунта, відповідно. Усі з Assure II®, Roundup WeatherMax® і AMPS® застосовували через 46 днів після посіву (після появи сходів) з нормами 6,0 унцій, 21 унція та 2,5 фунта, відповідно. Рослини збирали через 4 місяці та 20 днів після посіву.

[0073] Контрольне насіння обробляли певною кількістю (масою) води, яка відповідала кількості (масі) експериментальної композиції на основі сигнальної молекули (сигнальна молекула + носій). Контрольне насіння зберігали в таких же умовах, що й експериментальне насіння, до посіву та висівали в той же час, що й експериментальне насіння, у той же ґрунт.

[0074] Результати дослідження показано в таблиці 1 нижче.

[0075]

Таблиця 1

	ГРУПА ОБРОБКИ	УРОЖАЙ ЗЕРНА при 13 %
1	Контроль - неінокульований	62,5
2	Optimize - під час посіву	64,2
3	Optimize - за 5 місяців	65,7
4	NI-50GREN-1 - під час посіву	62,2
5	NI-50GREN-1 - за 5 місяців	70,5
6	NI-50S-1 - за 4,5 місяців	67,2
7	NI-50S-2CF - за 4,5 місяців	69,6

[0076] Як показано за допомогою порівняння порівняльної (такої, що не стосується даного винаходу) групи 2 і групи 3, що стосується даного винаходу, обробка насіння сої за допомогою Optimize® комерційного класу за 5 місяців до посіву зумовлювала збільшення врожайності сої на 1,5 бушеля сої. Як показано за допомогою порівняння групи 4 і групи 5, що стосується даного винаходу, обробка насіння сої тільки чистим LCO-V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) за 5 місяців до посіву зумовлювала збільшення врожайності сої на 8,3 бушеля/акр. Як показано за допомогою порівняння групи 2 і групи 6, що стосується даного винаходу, обробка насіння сої за допомогою Optimize® некомерційного класу за 4,5 місяця до посіву зумовлювала збільшення врожайності сої на 3,0 бушеля/акр. На закінчення, як продемонстровано за допомогою порівняння групи 4 і групи 7, що стосується даного винаходу, обробка насіння сої за допомогою тільки LCO-V некомерційного класу (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) за 4,5 місяця до посіву зумовлювала збільшення врожайності сої на 7,4 бушеля/акр. Вимірювання врожаю зерна проводили за рівня вологості насіння 13 %.

#### [0077] ПРИКЛАД 2

[0078] Випробування на сої проводили для оцінки варіантів здійснення даного винаходу за врожаєм зерна стосовно до насіння сої. Ділянка для випробування в польових умовах була розташована поблизу від Вайтвотера, Вісконсин, і характеризувалася ґрунтом на основі пилувато-мулуватого суглинку за Мілфордом. Дослідження ґрунту, проведене за шість місяців

до посіву, продемонструвало pH ґрунту 6,6, вміст органічної речовини 4,8 % і значення вмісту фосфору та калію 41 частина на мільйон і 131 частина на мільйон, відповідно.

[0079] Сигнальні молекули для рослин, використовувані у випробуванні, були такими ж, що й у прикладі 1. Насіння сої, використовуване в цьому дослідженні, являло собою Stine S2118.

5 Сигнальні молекули для рослин розпилювали на насіння з розведенням/без розведення з нормою 4,8 рідкої унції/cwt.

[0080] Дослідження проводили за рандомізованим повноблоковим планом із розміром дослідної ділянки 10 футів на 50 футів (0,011 акра) з міжрядною відстанню 7,5 дюйма. Здійснювали чотири повторності. Насіння обробляли сигнальними молекулами для рослин за 4,5 або 5 місяців до посіву та безпосередньо перед посівом і висівали на глибину 1 дюйм і з нормою для паростків 225000 насінин на акр із застосуванням зернової сівалки John Deere 750 NT. Обидва пестициди Extreme® і AMPS® застосовували за 10 днів до посіву (до появи сходів) з нормами 3,0 пінти й 2,5 фунта, відповідно. Усі з Assure II®, Roundup WeatherMax® і AMPS® застосовували через 45 днів після посіву (після появи сходів) з нормами 6,0 унцій, 21 унція та 2,5 фунта, відповідно. Рослини збирали через 4 місяці та 21 день після посіву.

[0081] Контрольне насіння обробляли певною кількістю (масою) води, яка відповідає кількості (масі) експериментальної композиції на основі сигнальної молекули (сигнальна молекула + носій). Контрольне насіння зберігали в таких же умовах, що й експериментальне насіння, до посіву та висівали в той же час, що й експериментальне насіння, у той же ґрунт.

[0082] Результати дослідження показано в таблиці 2 нижче.

[0083]

Таблиця 2

	ГРУПА ОБРОБКИ	УРОЖАЙ ЗЕРНА при 13 %
1	Контроль - неінокульований	62,4
2	Optimize - під час посіву	64,1
3	Optimize - за 5 місяців	68,6
4	NI-50GREN-1 - під час посіву	65,8
5	NI-50GREN-1 - за 5 місяців	64,0
6	NI-50S-1 - за 4,5 місяців	69,4
7	NI-50S-2CF - за 4,5 місяців	66,6

[0084] Як показано за допомогою порівняння порівняльної (такої, що не стосується даного винаходу) групи 2 і групи 3, що стосується даного винаходу, обробка насіння сої за допомогою Optimize® комерційного класу за 5 місяців до посіву зумовлювала збільшення врожайності сої на 4,5 бушеля сої. Як показано за допомогою порівняння групи 2 і групи 6, що стосується даного винаходу, обробка насіння сої за допомогою Optimize® некомерційного класу за 4,5 місяця до посіву зумовлювала збільшення врожайності сої на 5,3 бушеля/акр. Як продемонстровано за допомогою порівняння групи 4 і групи 7, що стосується даного винаходу, обробка насіння сої за допомогою тільки LCO-V некомерційного класу (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) за 4,5 місяця до посіву зумовлювала збільшення врожайності сої на 0,8 бушеля/акр. Єдиний негативний ефект, як показано за допомогою порівняння групи 4, що не стосується даного винаходу, і групи 5, що стосується даного винаходу, продемонстрував, що обробка насіння сої тільки чистим LCO за 5 місяців до посіву зумовлювала зниження на 1,8 бушеля/акр, при цьому результат був спричинений неопосередковано мінливістю, пов'язаною з випробуваннями в польових умовах. Вимірювання врожаю зерна проводили за рівня вологості насіння 13 %.

[0085] Експерименти в теплиці

[0086] ПРИКЛАД 3

[0087] Насіння сої обробляли за допомогою 10<sup>-7</sup> М чистого LCO-V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) і зберігали при 15 °С. Оброблене насіння та необроблене насіння (контроль) висівали у теплиці через 1 і 12 місяців після обробки в горщиках, що містять пісок:перліт (суміш 1:1). Паростки вирощували протягом 10 днів після посіву насіння, потім паростки збирали, їх коріння очищали та вимірювали на сканері Winrhizo®. Контрольне насіння обробляли певною кількістю (масою) води, яка відповідає кількості (масі) експериментальної композиції на основі сигнальної молекули (сигнальна молекула + носій). Контрольне насіння зберігали в таких же умовах, що й експериментальне насіння, до посіву та висівали в той же час, що й експериментальне насіння, у той же ґрунт. Результати показано в таблиці 3.

Таблиця 3

Обробка	1 місяць після обробки		1 рік після обробки	
	Довжина коренів (см)	Об'єм коренів (см <sup>3</sup> )	Довжина коренів (см)	Об'єм коренів (см <sup>3</sup> )
Контроль	128	0,455	115,5	0,403
LCO	135	0,468	159,3	0,540
% збільшення	5,46	2,86	37,92	34

[0088] Результати, одержані за допомогою обох варіантів здійснення, які стосуються даного винаходу (насіння, оброблене за допомогою LCO за 1 місяць і 12 місяців до посіву), і, зокрема, результати, отримані після попередньої обробки за 1 рік, є значними з урахуванням того, що, як

5

[0089] ПРИКЛАД 4

[0090] Насіння сої, оброблене за допомогою Optimize®, тримали при 15 °C у холодильнику. Насіння висівали через 7 (7 днів до посіву) і 55 (55 днів до посіву) днів після обробки в ящики для спостереження за корінням, що містили суміш торф:перліт. Їх площу листової поверхні (см<sup>2</sup>) вимірювали на першому трилиснику через 19 днів. Як проілюстровано на фіг. 3 і показано в таблиці 4, листки, утворені з насіння, обробленого згідно з даним винаходом, характеризувалися на 50 % більшим середнім збільшенням площі листової поверхні порівняно з

10

варіантом здійснення, що не стосується даного винаходу (42 % порівняно з 28 %).

[0091]

15

Таблиця 4

	Середнє значення	Стандартне відхилення	Ефект	Ефект у %
Середнє значення для UTC	146,25	18,7539		
Середнє значення для 7 днів до посіву	187,05	29,8215	40,81	28 %
Середнє значення для 55 днів до посіву	207,18	20,5278	60,93	42 %

[0092] Оскільки відомо, що кількість бактерій (*Bradyrhizobium japonicum*) на насінні знижується з часом, збільшення середньої площі поверхні, продемонстроване в рослин, отриманих з насіння, обробленого за 55 днів до посіву, може бути викликане дією ризобіального LCO.

20

[0093] Усі патентні та непатентні публікації, що цитуються в даному описі, свідчать про рівень компетентності фахівців у галузі, до якої належить даний винахід. Усі ці публікації включені в даний документ за допомогою посилання тією самою мірою, як якщо кожна окрема публікація або патентна заявка була спеціально й окремо зазначена як включена за допомогою посилання.

25

[0094] Хоча в даному документі даний винахід був описаний з посиланням на конкретні варіанти здійснення, слід розуміти, що дані варіанти здійснення є тільки ілюстраціями принципів і шляхів застосування даного винаходу. Отже, слід розуміти, що можна здійснювати численні модифікації ілюстративних варіантів здійснення і що можна розробити інші засоби без відступу від сутності й обсягу даного винаходу, як визначено в формулі винаходу, що додається.

30

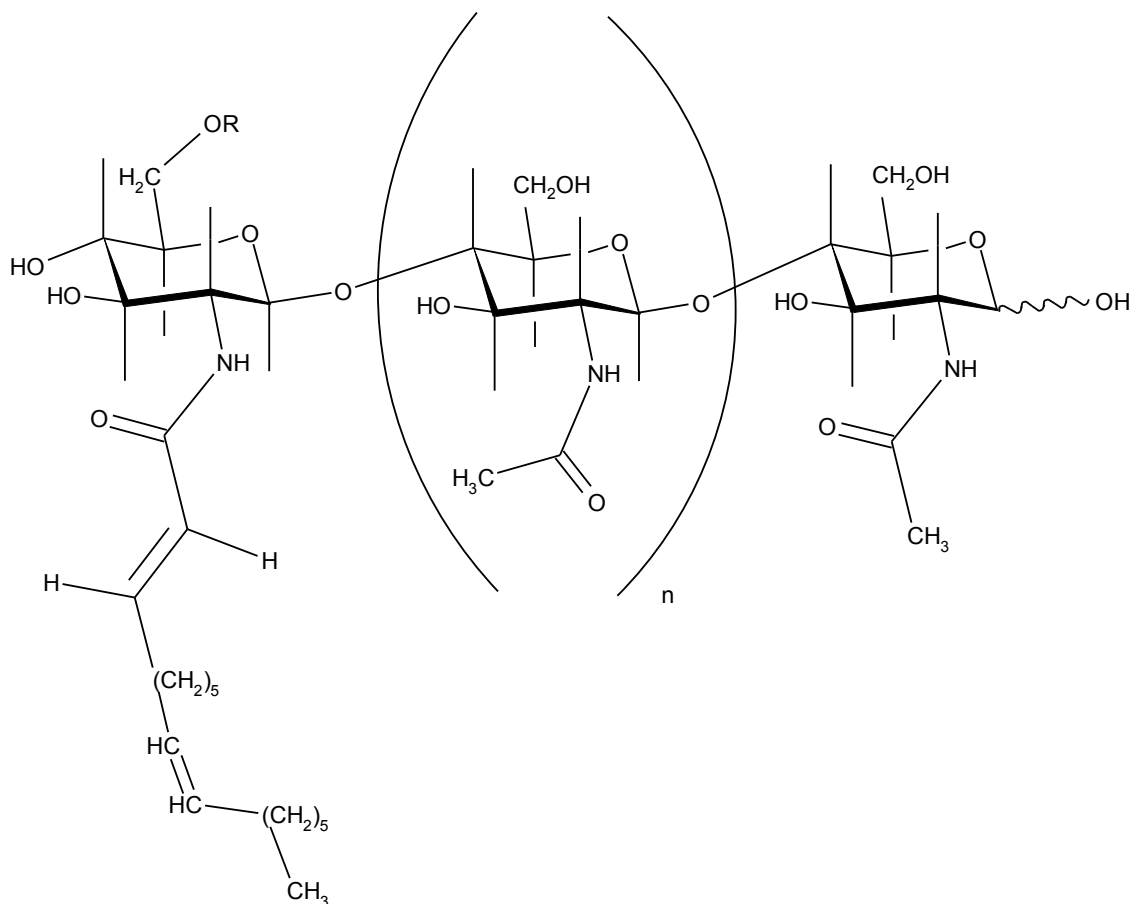
#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб стимулювання росту рослин, який включає обробку насінини ефективною кількістю ліпохітоолігосахариду (LCO) щонайменше за один місяць до посіву.

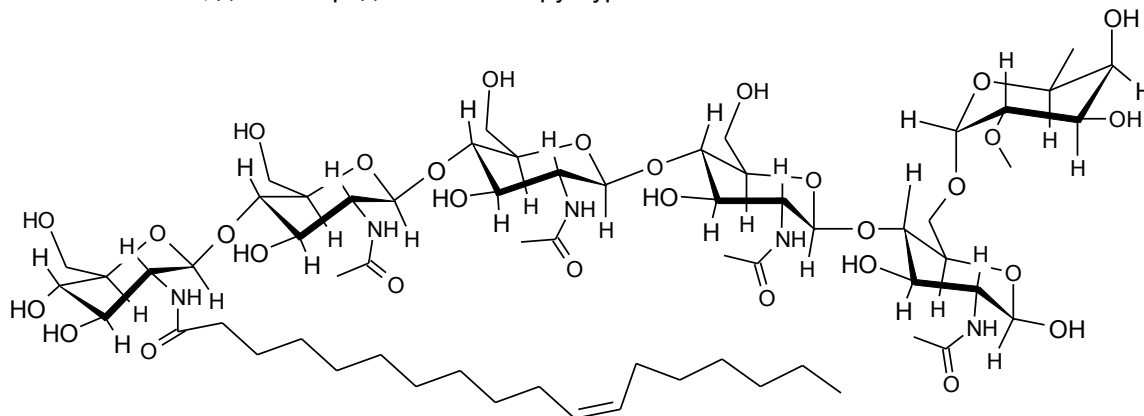
35

2. Спосіб за п. 1, де LCO представлений формулою:

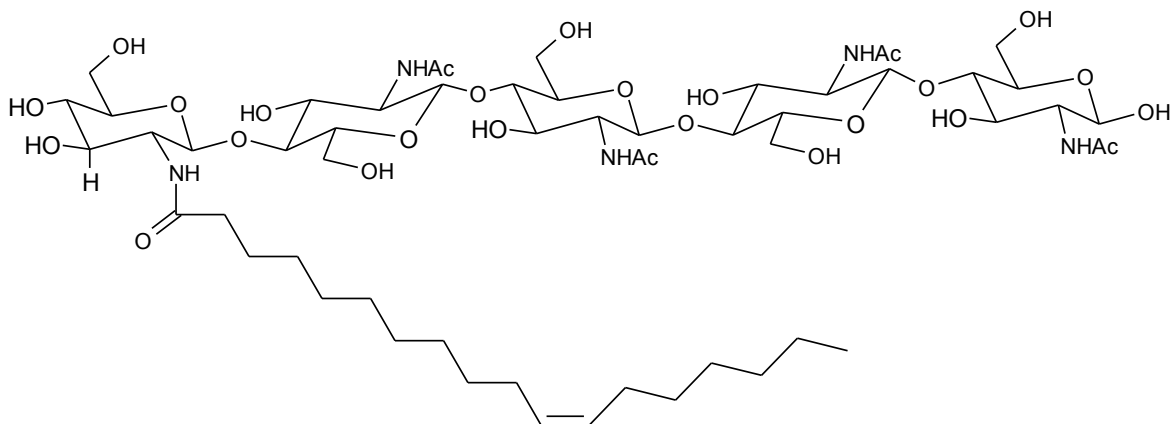




в якій R являє собою H або  $\text{CH}_3\text{CO}-$ , а n дорівнює 2 або 3.  
3. Спосіб за п. 1, де LCO представлений структурою:



5 4. Спосіб за п. 1, де LCO представлений структурою:



5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, де LCO є синтетичним.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, де LCO є рекомбінантним.
7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину бобової рослини.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину гороху.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину сочевиці.
10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину квасолі.
11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину сої.
12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину рослини, що не належить до бобових.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину пшениці.
14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину ячменю.
15. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину бавовнику.
16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину каноли.
17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що насінина являє собою насінину кукурудзи.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що насінину обробляють за допомогою LCO щонайменше за 9 місяців до посіву.
19. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що насінину обробляють за допомогою LCO щонайменше за 12 місяців до посіву.
20. Спосіб за будь-яким з пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що насінину обробляють за допомогою LCO щонайменше за 2 роки до посіву.
21. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що LCO виділяють та/або очищають з виду ризобій, вибраного з групи, яка включає *Bradyrhizobium spp.*, *Mesorhizobium spp.*, *Rhizobium spp.*, *Sinorhizobium spp.* та *Azorhizobium spp.*
22. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що LCO виділяють та/або очищають з *Bradyrhizobium japonicum*.
23. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що LCO виділяють та/або очищають з *Sinorhizobium meliloti*.
24. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що LCO виділяють та/або очищають з *Rhizobium leguminosarum*.
25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що LCO виділяють та/або очищають з арбускулярного мікоризного гриба.
26. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що LCO виділяють та/або очищають з виду з *Glomeromycota*.
27. Спосіб за будь-яким з пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що LCO виділяють та/або очищають з *Glomus intraradices*.

28. Спосіб за будь-яким з пп. 1-27, який додатково включає приведення насінини в контакт щонайменше з одним мікроорганізмом, що солюбілізує фосфати.

29. Спосіб за будь-яким з пп. 1-27, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *Penicillium*.

5 30. Спосіб за будь-яким з пп. 1-27, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *P. bilaiae*.

31. Спосіб за п. 30, який **відрізняється** тим, що насінину приводять у контакт зі:

штамом, який має номер доступу в депозитарії NRRL 50162;

штамом, який має номер доступу в депозитарії NRRL 50169;

10 штамом, який має номер доступу в депозитарії ATCC 20851;

штамом, який має номер доступу в депозитарії ATCC 22348; та/або

штамом, який має номер доступу в депозитарії ATCC 18309.

32. Спосіб за будь-яким з пп. 1-31, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *P. gaestrivorus*.

15 33. Спосіб за п. 32, який **відрізняється** тим, що насінину приводять у контакт зі штамом, який має номер доступу в депозитарії NRRL 50170.

34. Спосіб за будь-яким з пп. 1-33, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *Rhizobium*.

20 35. Спосіб за будь-яким з пп. 1-33, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *R. leguminosarum*.

36. Спосіб за будь-яким з пп. 1-35, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *Sinorhizobium*.

37. Спосіб за будь-яким з пп. 1-35, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *S. meliloti*.

25 38. Спосіб за будь-яким з пп. 1-37, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *Bradyrhizobium*.

39. Спосіб за будь-яким з пп. 1-37, який додатково включає приведення насінини в контакт з одним або декількома штамами *B. japonicum*.

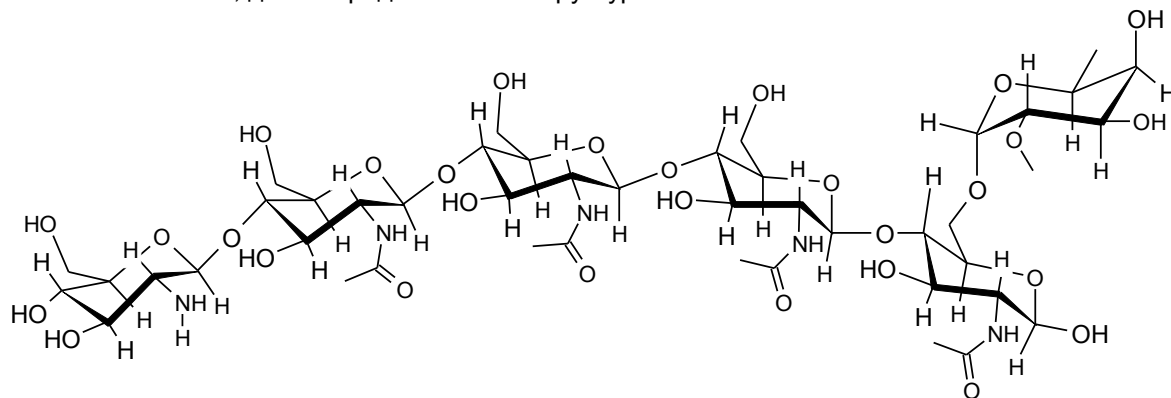
30 40. Спосіб за будь-яким з пп. 1-39, який додатково включає приведення насінини в контакт з фунгіцидом та/або інсектицидом.

41. Спосіб за будь-яким з пп. 1-39, який **відрізняється** тим, що насінину приводять у контакт з металаксиллом, клотіанідиним, мефеноксамом, флудіоксонілом, тіаметоксамом та/або імідаклопридом.

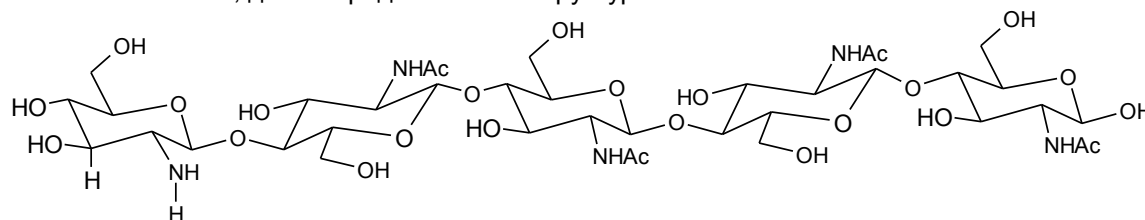
35 42. Спосіб за будь-яким з пп. 1-39, який **відрізняється** тим, що насінину приводять у контакт з мефеноксамом, флудіоксонілом та тіаметоксамом.

43. Спосіб за будь-яким з пп. 1-42, який додатково включає приведення насінини в контакт з хітоолігосахаридом (CO).

44. Спосіб за п. 43, де CO представлений структурою:



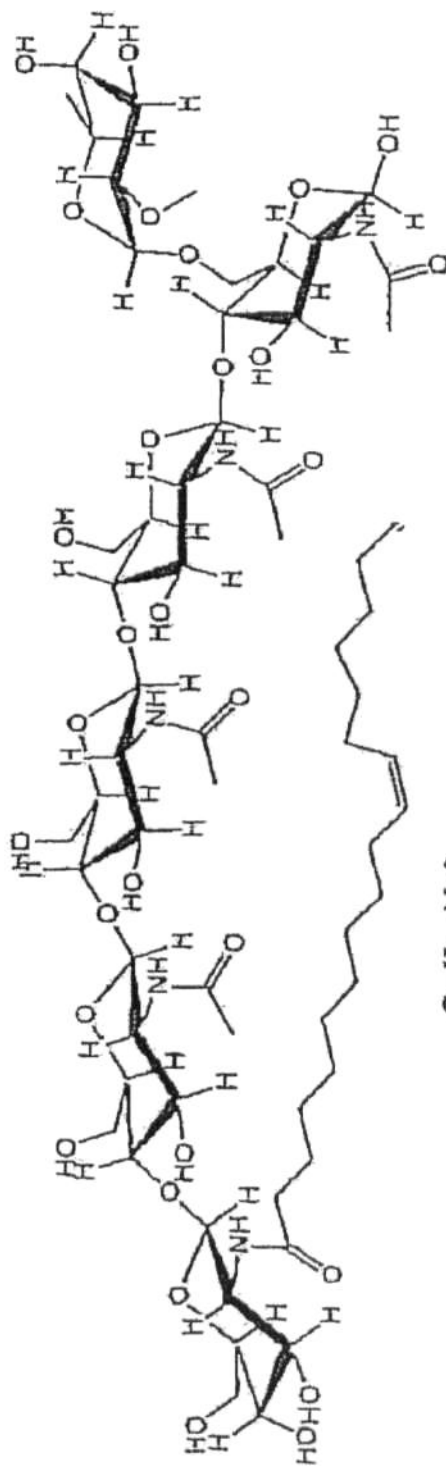
40 45. Спосіб за п. 43, де CO представлений структурою:



46. Спосіб за будь-яким з пп. 1-45, який додатково включає приведення насінини в контакт з хітином та/або хітозаном.
47. Спосіб за будь-яким з пп. 1-46, який додатково включає приведення насінини в контакт із флавоноїдом.
- 5 48. Спосіб за будь-яким з пп. 1-47, який **відрізняється** тим, що LCO застосовують щодо насінини в концентрації від приблизно  $10^{-14}$  до приблизно  $10^{-5}$  моль/л.
49. Спосіб за будь-яким з пп. 1-47, який **відрізняється** тим, що LCO застосовують щодо насінини в концентрації від приблизно  $10^{-11}$  до приблизно  $10^{-5}$  моль/л.
- 10 50. Спосіб за будь-яким з пп. 1-47, який **відрізняється** тим, що LCO застосовують щодо насінини в концентрації від приблизно  $10^{-8}$  до приблизно  $10^{-7}$  моль/л.
51. Спосіб за будь-яким з пп. 1-50, який **відрізняється** тим, що LCO застосовують щодо насінини в кількості, яка варіює в діапазоні від приблизно 1 до приблизно 400 мкг/хандредвейт (cwt) насінини.
- 15 52. Спосіб за будь-яким з пп. 1-50, який **відрізняється** тим, що LCO застосовують щодо насінини в кількості, яка варіює в діапазоні від приблизно 2 до приблизно 70 мкг/cwt.
53. Спосіб за будь-яким з пп. 1-50, який **відрізняється** тим, що LCO застосовують щодо насінини в кількості, яка варіює в діапазоні від приблизно 2,5 до приблизно 3,5 мкг/cwt.

Фиг. 1

LCO-V ( $C_{18:1}$ , MeFuc)



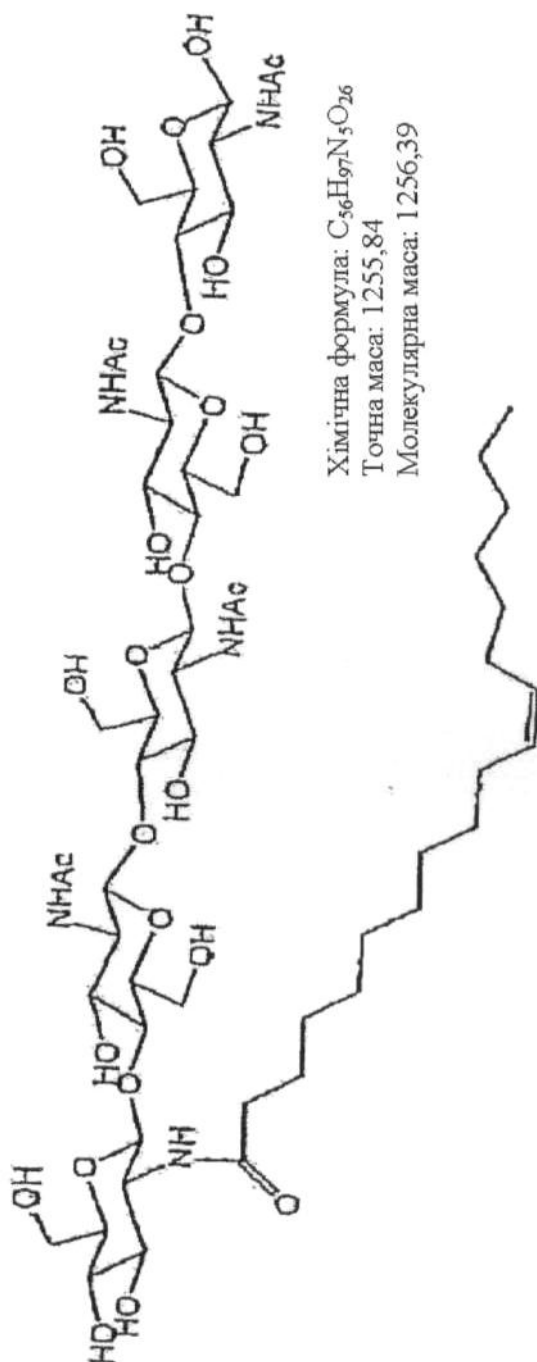
$C_{63}H_{109}N_5O_{20}$

Точна маса: 1415,72

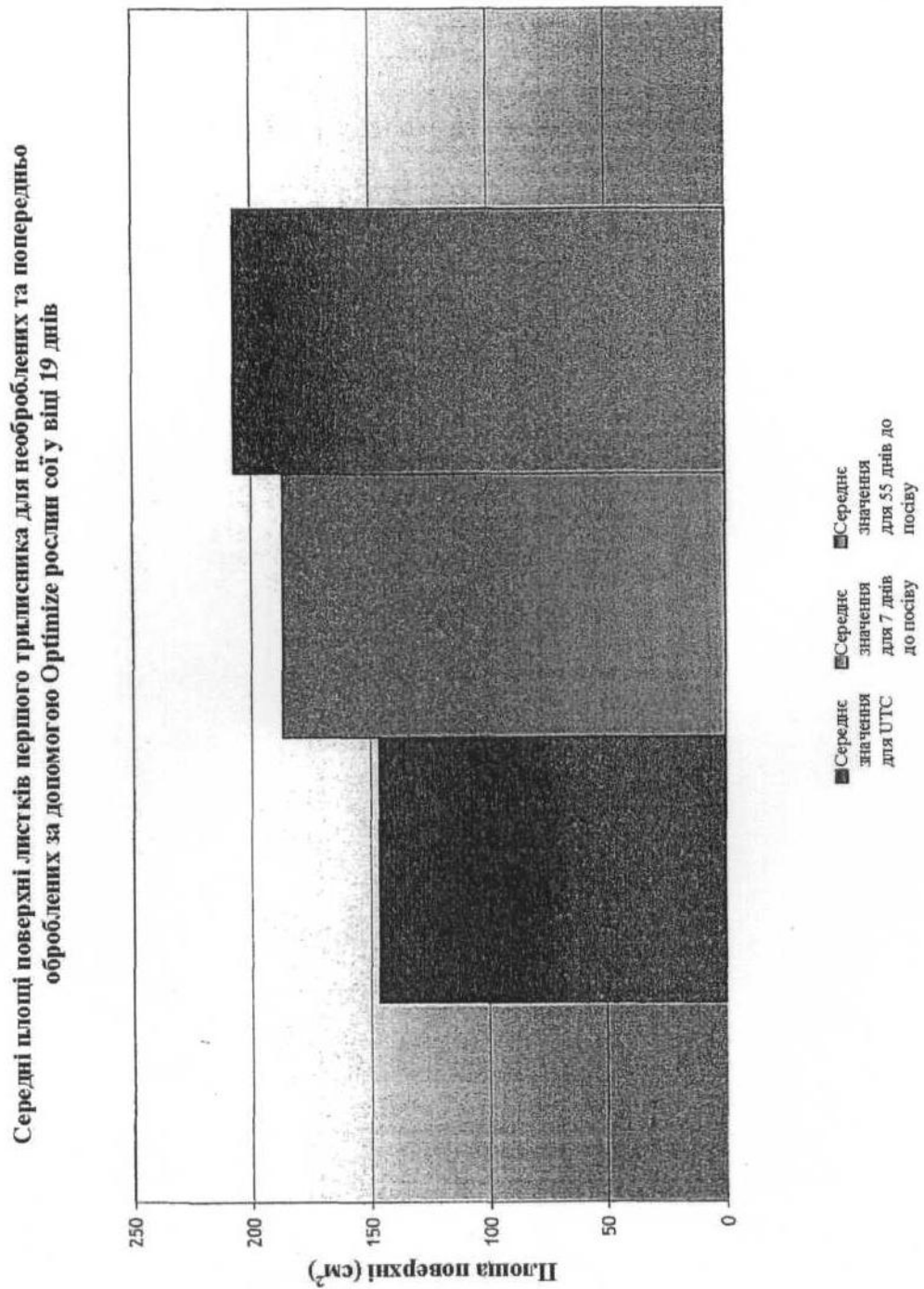
Молекулярна маса: 1416,56

C, 53,42; H, 7,76; N, 4,94; O, 33,88

ФІГ. 2



ФІГ. 3



Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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