

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 113847 (13) C2**  
**(51) МПК (2017.01)****A01N 25/10** (2006.01)**A01N 25/14** (2006.01)**A01N 25/24** (2006.01)**A01N 43/36** (2006.01)**A01N 51/00****A01N 63/00****A01P 3/00****A01P 7/00****ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ****(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2013 13335</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Джессоп Ніколас Х'ю Хілтон (GB)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>19.04.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЕКЗОСЕКТ ЛІМІТЕД,</b> Leylands Business Park, Cold Common, Winchester, Hants SO21 1TH, United Kingdom (GB)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>27.03.2017</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>1106741.0</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 01/78509 A2, 25.10.2001 US 4297339 A, 27.10.1981 US 5283060 A, 01.02.1994 US 2007/072775 A1, 29.03.2007 US 2010/291231 A1, 18.11.2010 DE 19906491 A1, 24.08.2000
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>20.04.2011</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>GB</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.03.2014, Бюл.№ 6</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>27.03.2017, Бюл.№ 6</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/GB2012/000356, 19.04.2012</b>	

**(54) КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПОКРИТТЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ПАТОГЕНУ В ОДНОДОЛЬНИХ РОСЛИН****(57) Реферат:**

Композиція для покриття рослинної структури однодольної рослини, з якої здатні рости коріння та пагони, де зазначена композиція для покриття містить органічний матеріал-носіє та один або більше біологічних агентів, які мають активність щодо щонайменше одного або більше патогенів однодольної рослини.

**UA 113847 C2**



Представлений винахід стосується композицій для нанесення покриттів, які включають органічний компонент та біологічний агент для застосування до рослинних структур однодольних рослин, таких як насіння, з якого здатні рости коріння та пагони, застосування композицій для нанесення покриттів на структури однодольних рослин, такі як насіння, способів отримання таких композицій для покриття та структур однодольних рослин, таких як насіння, покритих такими композиціями для нанесення покриттів. Зокрема, винахід стосується композицій для нанесення покриття на структури однодольних рослин, які містять органічний матеріал-носіє та біологічні агенти, вибрані з хімічних речовин та біологічних агентів активних щодо одного або більше з патогенів рослини, вибраних з бактеріальних, грибових та членистоногих патогенів, які заражають структури однодольних рослин, таких як насіння та цибулини.

Втрати урожаю однодольних зернових реєструються щорічно, та виникають в результаті зараження рослин паразитами завдяки патогенам, таким як бактерії, гриби та членистоногі, які можуть заражати рослину на різних стадіях розвитку, таких, як на посівній стадії. Агрономічні втрати завдяки зараженням патогенами залишаються високими, незважаючи на чисельні захисні заходи, які були розроблені людиною для боротьби з такими зараженнями. Такі захисні заходи включають застосування синтетичних хімічних речовин; застосування генної інженерії у рослин; та застосування живих біологічних агентів, які застосовують в формі покриттів, розпилені та промивані до однодольного насіння.

Пестициди у вигляді хімічних агентів, таких як фунгіциди, бактерициди та артроподициди, як правило, у вигляді інсектицидів та/або акарицидів, можуть бути застосовані до однодольних зернових культур у формі просочувань ґрунту, обробок насіння рідиною, тощо. Такі види хімічної обробки мають тенденцію бути змішаними та можуть негативно вплинути на корисні бактерії, гриби та членистоногі, а також патогени рослин, на які такі обробки є спрямованими.

Коли застосовують традиційні пестициди, наприклад, для обробки насіння, то насіння покривають пестицидом безпосередньо або пестицид застосовують до насіння в присутності неорганічного носія. Такі обробки насіння, як правило, застосовують в рідкій формі, або у вигляді вологої глинистої суспензії, та потім насіння висушують. Такі обробки в основному спрямовані на забезпечення безпосереднього захисту від патогенів, таких як членистоногі та/або, мікроорганізмів, що знаходяться на насінні, та/або мікроорганізмів, що знаходяться на ґрунті, які атакують насіння. Високий рівень хімічних речовин, які зазвичай використовують, вносить хімічне навантаження на довкілля, що може призвести до виникнення екологічних проблем.

Однією з проблем при застосуванні біологічного агента, який є хімічною речовиною в традиційних методиках покриття насіння, є те, що хімічну речовину, як правило, застосовують у вигляді глинистої суспензії, та це може призвести до виникнення нерівномірного нанесення покриття у відповідності з чим насіння не є повністю покритим або у відсотках, аж до 20% насіння, залежно від типу насіння та застосованого способу покриття, не стають повністю покритими. Крім того, покриття насіння не може бути однорідним, та це призводить до виникнення фізичних недоліків у насінній оболонці та покриття може відшаровуватися.

Наступна проблема виникає при використанні біологічних агентів, які вибирають з корисних живих бактеріальних і грибових видів, які можуть бути застосовані традиційно до рослинних структур, наприклад, у вигляді спор у поєднанні з неорганічним носієм у формі порошкових композицій або у формі рідких композицій, які потім можуть бути висушені знову, яка полягає в тому, що біологічні агенти, які застосовують, швидко втрачають життєздатність. Без наміру бути пов'язаною з теорією вважається, що як насіння або зберігаючи органи висушують знову, мікросередовище змінюється та життєздатність живих біологічних агентів, які застосовують, як може бути видно, різко знижується та майже відразу, як висихає композиція, яка застосовується. Втрата життєздатності біологічного агента, як правило, є пов'язаною з розщепленням грибових або бактеріальних спор, що робить їх нежиттєздатними.

На даний момент виявлено, що шляхом використання органічної речовини-носія в поєднанні з біологічним агентом, життєздатність біологічного агента покращується на насінні однодольних рослин, по відношенню до життєздатності біологічних агентів, які традиційно застосовують до такого насіння. Крім того, покриття структури рослини є менш чутливим до відшаровування.

Завданням представленого винаходу є забезпечити покращенні покриття, які містять біологічні агенти для структур однодольних рослин, таких як насіння. Крім того, завданням винаходу є забезпечити покриття для насіння, що застосовує деякі хімічні добавки та/або їх менші кількості для захисту насіння та/або молодих проростків від патогенів, ніж традиційні покриття для насіння.

Ці та інші завдання винаходу стануть очевидними з наступного опису та прикладів.

Відповідно до представленого винаходу передбачається композиція для покриття структур однодольної рослини, де згадана композиція для покриття містить, щонайменше, один органічний матеріал-носіє у вигляді частинок, де матеріал-носіє є вибраним з восків, що мають температуру плавлення  $\geq 50^\circ$  за Цельсієм та один або більше біологічних агентів, які мають активність проти одного або більше патогенів однодольної рослини.

Фермерські зернові культури, як правило, є призначеними для багатьох різноманітних ринків, таких як харчові продукти, виготовлені зі злаків, наприклад, хліб, сухі круп'яні сніданки, продукти з крохмалю, пивоварні продукти та у виробництві корму для одомашнених тварин та худоби, таких як кури та велика рогата худоба. Для цілей представленого винаходу, слід розуміти, що "насінина" та "насіння" вживаються як у множині, так і в однині, в залежності від контексту. Посилання на "насінину" та "насіння" використовують взаємозамінно та означає насіння, як правило, життєздатні насінини, до яких застосовують композиції за винаходом. Насіння однодольних культур, як передбачається в даному документі, означає насіння, яке є здатним до проростання, щонайменше, на традиційних рівнях проростання, характерних для насіння однодольних рослин. Насінини однодольних культур включають ті, які можуть бути застосовані посіву однодольних рослин, таких як види з *Oryza* spp., такий як *Oryza sativa* (рис), *Triticum* spp., такий як *T. aestivum* (пшениця: весняні та зимові різновиди), *Secale* spp., такий як *Secale cereale* (жито), *Avena* spp. такий як *Avena sativa* (овес), *Zea* spp. такий як *Zea mays* [кукурудза (маїс)], *Sorghum* spp. такий як *Sorghum bicolor* (сorgho), *Hordeum* spp. такий як *Hordeum vulgare* (ячмінь) та гібридні схрещування однодольних рослин, такий як х *Triticosecale* (тритікале: схрещування між пшеницею та житом).

Органічний матеріал-носіє вибирають з органічних речовин, які можуть бути застосовані для насіння однодольних рослин переважно у вигляді сухого порошку, де частинки порошку мають заздалегідь визначений середній об'ємний діаметр, або частинки порошку представлені у рідкій формі, такий як олієподібна композиція, або у вигляді водної композиції.

Як правило, органічний матеріал-носіє для застосування у винаході присутній у вигляді частинок в композиції за винаходом та де частинки композиції мають середній об'ємний діаметр певного розміру, як визначено в даному документі. Щоб отримати частинки органічних речовин з середнім об'ємним діаметром, що здатні бути застосованими для використання в даному винаході, органічні матеріали у формі, наприклад, від 1 до 5 кілограмових блоків або таблеток, можуть бути розбиті або подрібнені на дрібні міліметрового розміру шматки (такі як, від 2 мм - 8 мм приблизного діаметру в розмірі, наприклад, від 4 мм до 6 мм) в дробарках. Міліметрового розміру шматки потім можуть бути пропущені через подрібнюючі засоби, такі як стандартний млин, наприклад, подрібнюючий млин Арех, та розмелюють або подрібнюють до частинок, що мають приблизний діаметр в діапазоні від 100 мкм - 500 мкм, наприклад від 250 мкм - 300 мкм. Подрібнені частинки мікронного розміру потім можуть бути пропущені через мікронізуючий апарат, такий як AFG мікронізуючий повітряний млин, щоб отримати частинки бажаного діапазону СОД, такого як, від 15 мкм - 20 мкм, які знаходять застосування в представленому винаході. Кваліфікований фахівець оцінить, що такі методики для отримання маленьких частинок є добре відомими в даній галузі з рівня техніки. Переважно, сухі порошкові композиції за винаходом містять композитні частинки, що мають середній об'ємний діаметр  $\geq 5$  мкм, наприклад, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм аж до 40 мкм або будь-яке значення між ними. Як встановлено в даному документі, середній об'ємний діаметр композитних частинок, як правило, становить  $\geq 10$  мкм або  $\geq 12$  мкм та може знаходитися в діапазоні від 10 мкм до 200 мкм, та може мати значення, яке знаходиться будь-де серед них, наприклад, від 10 мкм до 100 мкм, або від 10 мкм до 40 мкм, або від  $\geq 10$  мкм до 30 мкм, або будь-якого бажаного значення середнього об'ємного діаметра в проміжному положенні. Переважно, сухі порошкові композиції за винаходом містять частинки, що мають середній об'ємний діаметр  $\geq 8$  мкм, наприклад 8 мкм, 9 мкм, 9,7 мкм, 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм, тощо аж до будь-якого середнього об'ємного діаметру за вибором, наприклад, до 200 мкм або будь-яким середнім об'ємним діаметром з проміжним значенням, наприклад, 40 мкм або 30 мкм. Вважається, що частинки за винаходом, які мають середній об'ємний діаметр  $\geq 10$  мкм, є менш торакально небезпечними для людей та не вважаються такими, що є алергенними.

У рідких композиціях, частинки з попередньо визначеним середнім об'ємним діаметром суспендують в тій суспензійній композиції та застосовують до насіння, яке потім сушать, застосовуючи традиційні методики сушіння. Коли органічний матеріал-носіє застосовують до насіння однодольних рослин у формі сухого порошку, частинки органічного порошкового матеріалу можуть мати середній об'ємний діаметр, як описано в даному документі. «Один або більше біологічних агентів», які можуть додавати до сухих порошоків за винаходом включають

хімічні речовини для використання проти патогенів, таких як членистоногі, такі як комахи, павукоподібні та якщо доцільно, їх личинок, яєць або лялечок; хімічні речовини для застосування проти бактеріальних патогенів; та хімічні речовини для застосування проти грибкових патогенів. Крім того, корисні живі біологічні агенти, можуть бути додані до таких сухих порошків для застосування в представленому винаході, де живі біологічні агенти є здатними до цільових бактеріальних патогенів однодольної рослини та/або цільових грибкових патогенів однодольної рослини. Спори за вибором корисних живих біологічних агентів, таких як грибна конідія, або гіфа, або міцелії грибів, які не утворюють спор або конідія-подібних структур, можуть бути додані до сухих порошків для використання в представленому винаході. Відповідні органічні матеріали-носії для використання у винаході, як правило, складаються з восків, що мають температуру плавлення  $\geq 50$  °C, більш переважно  $\geq 60$  °C, та найбільш переважно складаються з твердих восків, що мають температуру плавлення  $\geq 70$  °C.

Природні воски для застосування в представленому винаході, включають карнаубський віск, бджолиний віск, китайський віск, шелаковий віск, спермацетовий віск, мірицилпальмітат, цетилпальмітат, канделільський віск, касторовий віск, урікуровий віск, ланолін, віск цукрового очерету, рематовий віск, віск рисових висівок, тощо.

Синтетичні воски для застосування в представленому винаході, включають прийнятні воски, вибрані з парафінового воску, мікрокристалічного воску, поліетиленових восків, восків Фішера-Тропша, заміщених амідних восків, полімеризованих  $\alpha$ -олефінів, тощо.

Мінеральні воски для застосування в винаході включають гірський віск (наприклад, Lumax® Bayer), церезиновий віск, озокерит, віск торф'яний, тощо.

Прийнятні органічні частинки носія можуть бути вибрані з восків, таких як карнаубський віск, бджолиний віск, гірський віск, китайський віск, шелаковий віск, спермацетовий віск, мірицилпальмітат, цетилпальмітат, канделільський віск, касторовий віск, урікуровий віск, ланолін, віск цукрового очерету, рематовий віск та віск рисових висівок, або суміші з них двох або більше. Такі воски, як правило, демонструють високу ентальпію енергії ґратки під час розплавлення. Переважно органічний матеріал-носіє є карнаубським воском, який може бути застосований в рідкій формі, як правило у формі суспензії, або, переважно, в порошковій формі як дискретні частинки. Як правило, частинки для застосування в винаході мають середнє об'ємне значення, як описано в даному документі.

Крім того, органічні частинки носія для застосування в композиціях за винаходом можуть містити інші компоненти, такі як добавки, вибрані з блокаторів УФ, таких як бета-каротин або п-амінобензойна кислота, барвників, таких як оптичні блискоутворювачі та комерційно доступні барвники, такі як харчові барвники, пластифікаторів, таких як гліцерин або соєва олія, протимікробних агентів, таких як калію сорбат, нітрати, нітроти, пропіленоксид і т.д., антиоксидантів, таких як вітамін Е, бутильований гідроксіанізол (BHA), бутильований гідрокситолуол (BHT), та інші антиоксиданти, які можуть бути присутніми, або їх суміші. Кваліфікований спеціаліст прийме до уваги, що вибір таких добавок, які зазвичай включають, буде зроблений в залежності від кінцевого призначення та очевидної необхідності.

Рідкі композиції за винаходом можуть бути сформульовані як водні композиції або як олієподібні композиції в залежності від розробки. Водні композиції можуть включати поверхнево-активні речовини, вибрані з комерційно доступних поверхнево-активних речовин, таких як Libsorb, Silwet L77, Tween 80, Torpedo II, Newmans T80, Fortune, Guard, Rhino, Biopower, тощо.

Олієподібні композиції, іншими словами, що є композиціями на основі олії, можуть містити будь-яку олію, прийнятну для застосування в представленому винаході, яка може бути вибраною з мінеральних олій, таких як парафінова олія, та рослинних олій, таких як рапсова олія, соєва олія, соняшникова олія, пальмова олія, тощо. Олієподібні композиції для застосування у винаході містять органічні частинки носія, як описано в даному документі, та вони, в свою чергу, можуть бути змішані з агентами, що підвищують плинність, такими як гідрофільні осажені діоксиди кремнію, наприклад, Sipernat 383 DS, Sipernat 320, EXP 4350 та Sipernat D-17, тощо. Такі агенти для запобігання злежуваності можуть бути дисперговані в оліях, наприклад, з метою запобігання піноутворенню.

Кваліфікований фахівець прийме до уваги, що там, де може бути використана водна або олійна композиції, щоб застосувати біологічні агенти для застосування у винаході, рідкий елемент повинен бути видалений з покритої структури рослини після того, як покриття досягається, наприклад, шляхом висушування, використовуючи традиційні процеси висушування, залишаючи композицію для покриття насіння, яка знаходиться в формі сухих частинок, де композиція для покриття насіння складається з органічного носія, як описано в

даному документі, та, щонайменше, одного біологічного агента, який також описаний в даному документі.

Біологічний агент для цілей представленого винаходу є таким, що може бути застосований для контролю популяції рослинного патогену однодольної рослини, та може бути вибраним з хімічних фунгіцидів, артроподицидів, таких як інсектициди та акарициди, бактерицидів, та з живих біологічних агентів, які є здатними контролювати популяцію одного або більше патогенів насіння або несучого шару ґрунту насіння однодольних рослин. Переважно, популяція патогену нанесеного ґрунту на або в безпосередній близькості до насіння однодольної рослини зменшують або роблять нездатними до репродукції біологічного агента відтворення, та/або шляхом їх знищення. Приклади біологічних агентів для застосування в представленому винаході, що є хімічними речовинами для застосування на насінні однодольних рослин, включають ті хімічні агенти, які найбільш загально застосовують при зберіганні насіння зернових культур, які є ефективними проти членистоногих, таких як довгоносик рисовий, *Sitophilus oryzae*; довгоносик амбарний, *Sitophilus granaries*; точильник зерновий, *Rhyzopertha dominica*; міль зернова, *Sitotroga cerealella*; личинка мавританської козявки, *Tenebroides mauritanicus*; мукоїд суринамський, *Oryzaephilus surinamensis*; мукоїд крихітний, *Cryptolestes pusillus*; хрущак малий мучний, *Tribolium species*; шкіроїди, *Trogoderma species*; зернівки, деякі квасолеві та чотиріп'ятнисті зернівки; огнівка амбарна, *Plodia interpunctella*; та огнівка сухофруктова, *Ephestia cautella*. приклади, прийнятних хімічних речовин для застосування у винаході можуть бути вибрані з пиретроїдів, таких як  $\alpha$ -циперметрин,  $\lambda$ -цигалотрин, [ціано-(3-феноксифеніл)метил]-3-(2,2-диброметеніл)-2,2-диметилциклопропан-1-карбоксилат (дельтаметрин) та  $\tau$ -флувалінат, органофосфатів, таких як хлорпірифос (діетоксисульфаніліден-(3,5,6-трихлорпіридин-2-іл)окси-1<sup>A</sup>{5}-фосфан), малатіон (діетил 2 диметоксифосфінотіоілулсульфанілбутандіоат), кумофос (3-хлор-7-діетоксифосфінотіоілокси-4-метилкумарин) та стирифос ([[(E)-2-хлор-1-(2,4,5-трихлорфеніл)етеніл]диметилфосфат), карбаматів, таких як амітраз (N-(2,4-диметилфеніл)-N-[(2,4-диметилфеніл)імінметил]-N-метилметанімідамід), спіносанів, таких як спіносад (Dow Agrichemical, France), інгібіторів гама-амінобутанової кислоти (GABA), таких як фіпроніл (5-аміно-1-[2,6-дихлор-4-(трифторметил)феніл]-4-(трифторметилсульфініл)піразол-3-карбонітрил), неонікотинотидів, таких як імідаклоприд (n-[1-[(6-хлор-3-піридил)метил]-4,5-дигідроімідазол-2-іл]нітроамід), антраніламіди, формонетинів, таких як 7-гідрокси-3-(4-метоксифеніл)хромон, ефірних олій, таких як олія чайного дерева, тим'янова олія (також відома як тимол), цитронелова олія та ментол, та регуляторів росту комах, таких як метоксифенозид (n-трет-бутил-n'-(3-метокси-о-толуіл)-3,5-ксилогідрозид) і т.д.

Приклади живих біологічних агентів (також відомі як організми біоконтролю або агенти біоконтролю), які є загально названими в даній галузі, як "біологічні антагоністи", які можуть бути застосовані в композиціях для покриття за представленим винаходом, включають *Pseudomonas* spp. такий як *P. Xloraphis* для застосування на ячміні та вівсі, та інших однодольних рослинах (доступний від BioAgri AB, Uppsala, Sweden), *Burkholderia* spp. такий як *B. seraciatype* Wisconsin для застосування на ячміні, сорзі та та пшениці (доступний як "Deny" від Stine Microbial Products, Memphis, USA; та для застосування до кукурудзи *B. seraciatype* доступний як "Intercept" від Soil Technologies Corp., Fairfield, USA).

Кваліфікованому спеціалісту буде очевидно, що композиції за винаходом також можуть бути добавлені безпосередньо в ґрунт або середовище для вирощування, в яких рослинні структури, як визначено в даному документі, повинні висаджувати. Такі композиції можуть додавати як порошки та змішувати з ґрунтом або застосовувати як рідкі суспензії, використовуючи традиційні методи.

Патогени нанесеного ґрунту для цілей за представленим винаходом є патогенами, що здатні утворювати колонії на насінному матеріалі та/або патогенами, що заселяють ґрунт та, які є здатними до дії на насіння однодольних рослин. Такі патогени нанесеного ґрунту, як правило, є бактеріями та/або грибами. Приклади бактеріальних та грибкових патогенів нанесеного ґрунту, що атакують однодольні рослини, включають *Rhizoctonia* spp. (наприклад, *R. microsclerotia* активний щодо кукурудзи; та рису; сорго; пшениці; ячменю; вівсу; та жита); *Aspergillus* spp., такого як *A. flavus* та *A. niger* (наприклад, активний щодо кукурудзи), *Tilletia* spp., такого як *T. tritici*, та *T. laevis* (наприклад, активний щодо пшениці) *Sclerophthora* spp., такого як *S. rayssiae*, та *S. graminicola* (наприклад, активний щодо кукурудзи), *Peronosclerospora* spp., такого як *P. sorghi* та *P. spontanea* (наприклад, активний щодо кукурудзи), *Pythium* spp. (наприклад, активний щодо кукурудзи; рису; сорго; пшениці; ячменю; вівсу; жита), *Fusarium* spp. (наприклад, активний щодо кукурудзи; рису; сорго; пшениці; ячменю; вівсу; жита), *Claviceps* spp., такого як *C. purpurea* (наприклад, активний щодо жита; тритікале; пшениці; та ячменю), *C.*

*africana* (наприклад, активний щодо *сorgho*), *C. gigantea* (наприклад, активний щодо кукурудзи), *Gibberella* spp., такого як *G. Avenacea* (наприклад, активний щодо кукурудзи), *Burkholderia glumae* (наприклад, активний щодо рису) *Pseudomonas fuscovaginae* (наприклад, активний щодо рису), *Sclerophthora* spp., такого як *S. macrospora* (наприклад, активний щодо рису), *Cochliobolus* spp., такого як *C. miyabeanus* (наприклад, активний щодо рису), *Fusarium* spp. (активний щодо рису, вівсу, пшениці; кукурудзи), тощо.

Відповідно до наступного аспекту винаходу передбачається застосування частинок органічного носія з воску у виробництві композиції для покриття, як визначено в даному документі, що містить біологічний агент, як визначено в даному документі, вище. На перевагу даному аспекту винаходу, композиція для покриття є композицією для покриття насіння. На додаткову перевагу даному аспекту винаходу, композиція для покриття є композицією для покриття запасуючого органу, де запасуючий орган вибирають з бульби, бульбовидних коренів, бульбоцибулин, цибулин та кореневищ.

Частинки органічного носія вибирають з природних восків, синтетичних восків та мінеральних восків, що мають температуру плавлення  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ , більш переважно,  $\geq 60^{\circ}\text{C}$  та, найбільш переважно, складаються з твердих восків, що мають температуру плавлення  $\geq 70^{\circ}\text{C}$ . Прийнятні воски для застосування в даному аспекті винаходу можуть вибирати з карнаубського воску, бджолиного воску, гірського воску, китайського воску, шелакового воску, спермацетового воску, мірицилпальмітату, цетилпальмітату, канделільського воску, касторового воску, урікурового воску, ланоліну, воску цукрового очерету, рематового воску та воску рисових висівок або суміші з них двох або більше. Переважно, покриття для насіння, яке застосовують в даному аспекті винаходу, включають карнаубський віск, як органічний носій. Переважно в даному аспекті винаходу частинки органічного носія мають середній об'ємний діаметр  $\geq 5$  мкм, такий як в діапазоні  $\geq 8$  мкм до 200 мкм, як описано в даному документі.

В третьому аспекті винаходу передбачається застосування воску, як органічного носія в формі частинок в композиції для покриття насіння однодольних культур, як описано в даному документі. Частинки органічного носія в даному аспекті винаходу вибирають з природних восків, синтетичних восків та мінеральних восків, що мають температуру плавлення  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ , більш переважно,  $\geq 60^{\circ}\text{C}$  та, найбільш переважно, складаються з твердих восків, що мають температуру плавлення  $\geq 70^{\circ}\text{C}$ . Прийнятні частинки органічного носія для застосування в даному аспекті винаходу можуть вибирати з карнаубського воску, бджолиного воску, гірського воску, китайського воску, шелакового воску, спермацетового воску, мірицилпальмітату, цетилпальмітату, канделільського воску, касторового воску, урікурового воску, ланоліну, воску цукрового очерету, рематового воску та воску рисових висівок або суміші з них двох або більше. Переважно, частинки воскового носія для застосування в даному аспекті винаходу включають частинки органічного носія карнаубського воску. Переважно все ж, частинки органічного носія для застосування в даному аспекті винаходу мають середній об'ємний діаметр  $\geq 8$  мкм, такий як в діапазоні  $\geq 10$  мкм до 200 мкм.

В четвертому аспекті винаходу передбачається спосіб виробництва композиція для покриття насіння, як описано в даному документі, що включає

1) вибір органічного матеріалу-носія, де матеріал-носії вибирають з восків, що мають температуру плавлення  $\geq 50^{\circ}$  за Цельсієм;

2) подрібнення зазначеного органічного матеріалу-носія до частинок бажаного середнього об'ємного діаметру  $\geq 5$  мкм, такого як в діапазоні  $\geq 8$  мкм до 200 мкм; та

3) додавання біологічного агенту до частинок продукту зі стадії 2).

Біологічний агент для застосування в даному аспекті винаходу вибирають з хімічного агенту, який є артроподицидом, таким як інсектицид, або акарицид, або їх суміші, або хімічного фунгіциду, або виду гриба та/або виду бактерії, або суміші з них одного або більше. Прийнятні види грибів та види бактерій є відомими та можуть бути вибрані з *Trichoderma* spp., такого як *Trichoderma harzanium* для застосування до пшениці та *Bacillus* spp., такого як *Bacillus subtilis* для застосування до пшениці, та *Pseudomonas species*, такого як *P. fluorescens* для застосування до пшениці та *P. Xloraphis* для застосування до ячменю та вівсу, та інших однодольних рослин (доступний від BioAgri AB, Uppsala, Sweden), *Burkholderia* spp., такого як *B. seraciatype* Wisconsin для застосування до ячменю, сорго та пшениці (доступний як "Denu" від Stine Microbial Products, Memphis, USA; та для застосування до кукурудзи *B. seraciatype* доступний як "Intercept" від Soil Technologies Corp., Fairfield, USA), тощо.

Прийнятні фунгіциди є відомими для застосування для обробки однодольного насіння кукурудзи включають флудіоксоніл [4-(2,2-дифтор-1,3-бензодіоксол-4-іл)-1H-пірол-3-карбонітрил], мефеноксам [метил n-(метоксіацетил)-n-(2,6-ксиліл)-D-аланілат], азоксистробін [метил (2E)-2-{2-[6-(2-ціанофеноксипіримідин-4-ілокси)феніл]-3-метоксіакрилат}], каптан

[(3aR,7aS)-2-[(трихлорметил)сульфаніл]-3a,4,7,7a-тетрагідро-1H-ізоіндол-1,3(2H)-діон], карбоксин [5,6-дигідро-2-метил-1,4-оксатіїн-3-карбоксанілід], манеб [марганцю етиленбіс(дитіокарбамат) (полімерний)], металаксил [метил-n-(метоксіяцетил)-n-(2,6-ксиліл)-DL-аланілат], оксадиксил [2-метокси-n-(2-оксо-1,3-оксазолідин-3-іл)ацет-2',6'-ксилідид], PCNB [пентахлорнітробензол] та тірам [тетраметилтіураму дисульфід або біс(диметилтіокарбамоїл)дисульфід]; для рису карбоксин [5,6-дигідро-2-метил-1,4-оксатіїн-3-карбоксанілід], манкозеб [марганцю етиленбіс(дитіокарбамат) (полімерний) комплекс з цинковою сіллю], металаксил [метил n-(метоксіяцетил)-n-(2,6-ксиліл)-DL-аланілат], та PCNB [пентахлорнітробензол] та тірам [тетраметилтіураму дисульфід або біс(диметилтіокарбамоїл)дисульфід]; для сорго каптан [(3aR,7aS)-2-[(трихлорметил)сульфаніл]-3a,4,7,7a-тетрагідро-1H-ізоіндол-1,3(2H)-діон], манкозеб [марганцю етиленбіс(дитіокарбамат) (полімерний) комплекс з цинковою сіллю], металаксил [метил N-(метоксіяцетил)-n-(2,6-ксиліл)-DL-аланілат], оксадиксил [2-метокси-N-(2-оксо-1,3-оксазолідин-3-іл)ацет-2',6'-ксилідид], та PCNB [пентахлорнітробензол]; для пшениці каптан [(3aR,7aS)-2-[(трихлорметил)сульфаніл]-3a,4,7,7a-тетрагідро-1H-ізоіндол-1,3(2H)-діон], тіабендазол (також відомого як TBZ) [2-(тіазол-4-іл)бензімідазол або 2-(1,3-тіазол-4-іл)бензімідазол, металаксил [метил N-(метоксіяцетил)-N-(2,6-ксиліл)-DL-аланілат], оксадиксил [2-метокси-N-(2-оксо-1,3-оксазолідин-3-іл)ацет-2',6'-ксилідид] та триадіменол [1RS,2RS;1RS,2SR)-1-(4-хлорфенокси)-3,3-диметил-1-(1H-1,2,4-триазол-1-іл)бутан-2-ол]; та для ячменю, вівсу та жита імазоліл (RS)-1-[(3-алілокси-2,4-дихлорфенетил)імідазол або аліл (RS)-1-(2,4-дихлорфеніл)-2-імідазол-1-ілетиловий етер, манкозеб [марганцю етиленбіс(дитіокарбамат) (полімерний) комплекс з цинковою сіллю], манеб [марганцю етиленбіс(дитіокарбамат) (полімерний)], PCNB [пентахлорнітробензол], тірам [тетраметилтіураму дисульфід або біс(диметилтіокарбамоїл)дисульфід], триадіменол (1RS,2RS;1RS,2SR)-1-(4-хлорфенокси)-3,3-диметил-1--(1H-1,2,4-триазол-1-іл)бутан-2-ол, та дифеноконазол 3-хлор-4-[(2RS,4RS;2RS,4SR)-4-метил-2-(1H-1,2,4-триазол-1-ілметил)-1,3-діоксолан-2-іл]феніл-4-хлорфеніловий етер.

Прийнятні інсектициди є відомими для застосування на однодольних зернових, як насіння для обробки та включають такі як тіаметоксам [(EZ)-3-(2-хлор-1,3-тіазол-5-ілметил)-5-метил-1,3,5-оксадіазинан-4-іліден(нітро)амін] для рису та кукурудзи; імідаклоприд [(E)-1-(6-хлор-3-піридилметил)-N-нітроімідазолідин-2-іліденамін], метіокарб [4-метилтіо-3,5-ксилілметилкарбамат], та тіодикарбу [(3EZ,12EZ)-3,7,9,13-тетраметил-5,11-діокса-2,8,14-третіа-4,7,9,12-тетраазапентадека-3,12-дієн-6,10-діон] для кукурудзи та злакових зернових (жито, пшениця, овес та тритікале), та клотіанідин [(E)-1-(2-хлор-1,3-тіазол-5-ілметил)-3-метил-2-нітрогуанідин] для кукурудзи та злакових (жито, овес, пшениця та тритікале), циперметрин [(RS)- $\alpha$ -ціано-3-феноксибензил (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-дихлорвініл)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат або (RS)- $\alpha$ -ціано-3-феноксибензил (1RS)-цис-транс-3-(2,2-дихлорвініл)-2,2-диметилциклопропанкарбоксилат] для пшениці.

Органічний матеріал-носії в даному аспекті винаходу можуть вибирати з восків, таких як з тих восків, які описані в даному документі раніше. Прийнятні воски можуть вибирати з восків, таких як карнаубський віск, бджолиний віск, гірський віск, китайський віск, шелаковий віск, спермацетовий віск, мірицилпальмітат, цетилпальмітат, канделільський віск, касторовий віск, урікуровий віск, ланолін, віск цукрового очерету, рематовий віск та віск рисових висівок або суміші з них двох або більше. Переважно, частинки воскового носія для застосування в даному аспекті винаходу містять сухі частинки карнаубського воску, урікурового воску та воску рисових висівок, або суміші з них двох або більше. Переважно, вибраний матеріал-носії є карнаубським воском.

В наступному аспекті винаходу, передбачається композиція для покриття насіння, яку отримують за способом, як описано в даному документі.

В наступному аспекті винаходу передбачається композиція для покриття, як описано в даному документі, для застосування до насіння однодольних культур.

В наступному аспекті винаходу передбачається спосіб покриття однодольного насіння композицією для покриття, яка містить органічний матеріал-носії та біологічний антагоніст до одного або більше грибкових патогенів, бактеріальних патогенів та членистоногих патогенів таким чином, щоб обмежити пошкодження згаданими патогенами зазначеного насіння однодольної рослини, спосіб, що включає додавання біологічного антагоністу до органічного матеріалу-носію, де органічний матеріал-носії знаходиться в формі сухих частинок, змішування двох компонентів разом та застосування одержаної в результаті композиції в формі сухих частинок до насіння однодольних культур. Таким чином, композицію для покриття насіння для використання у винаході застосовують в формі сухих частинок. Безумовно, кваліфікованому спеціалісту буде зрозуміло, що органічний матеріал-носії, крім того, може містити додаткові



пігменти, пластифікатори та інші другорядні компоненти, як описано в даному документі. Як альтернатива, покриття для насіння може бути застосоване в рідкій формі, як описано в даному документі, та потім насіння висушують, залишаючи композицію для покриття, яка знаходиться в формі сухих частинок, на насінні. Однак, переважним є те, що композицію для покриття застосовують в формі сухих частинок для легкого застосування, та вартість виробництва утримують низькою. Органічний матеріал-носіє в даному аспекті винаходу можуть вибирати з карнаубського воску, бджолиного воску, гірського воску, китайського воску, шелакового воску, спермацетового воску, мірицилпальмітату, цетилпальмітату, канделільського воску, касторового воску, урікурового воску, ланоліну, воску цукрового очерету, рематового воску та воску рисових висівок або суміші з них двох або більше. Переважно, органічний матеріал-носіє є карнаубським воском в формі сухих частинок.

Композиція для обробки в даному аспекті винаходу включає один або більше біологічних агентів, вибраних з хімічних артроподицидів, таких як інсектициди, фунгіциди, бактерициди та живі біологічні агенти, як описано в даному документі раніше.

Зараз слідують приклади, що ілюструють винахід. Слід розуміти, що приклади не повинні бути тлумачено як такі, що обмежують винахід будь-яким чином.

Фігура 1: Споріві навантаження *Trichoderma* на пшеницю.

Розділ - приклади

Контроль за *Alternaria* sp. пшениці (*Triticum aestivum*) [доступний від United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)] шляхом обробок насіння, використовуючи приклади антагоністів *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* та *Bacillus subtilis* [доступний від United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)].

Альтернатива (п'ятнистість) листя

Симптоми

Більшість нижніх листків завжди є першими, що показують ознаку інфікування, яка поступово поширюється на верхні листки. Спочатку хвороба викликає появу на їх листках, нерегулярно розкиданих маленьких, овальних, безбарвних уражень. Плями стали неправильної форми, так як вони збільшуються та колір приймає від темно-коричневого до сірого. У міру прогресування хвороби, декілька плям стають ближчими та покривають великі площі листка, що в кінці в результаті призводить до смерті цільного листка. Яскраво-жовта крайова зона іноді спостерігаються навколо плям. У випадку серйозного нападу, також інфікуються оболонки листя, ості та колоскова луска.

Чорні порошкоподібні спори грибка покривають уражені місця на цій стадії у вологих умовах. Ці спори поширюються вітром та викликають захворювання на здорові листя та рослини. Хвороба розповсюджується дуже швидко в теплих та вологих умовах. Сильно інфіковані поля мають спалений зовнішній вигляд.

Недоліки традиційної обробки насіння

i) Обмежена можливість дози - Кількість пестициду, яка може бути застосована, обмежується кількістю, яка в дійсності буде прилипати до насіння.

ii) Обмежена тривалість захисту - Тривалість часто є короткою завдяки відносно невеликій кількості біологічного агента (наприклад, хімічного), яку застосовують до насіння, розбавленню біологічного агента, коли рослина росте, та руйнуванню біологічного агента.

iii) Обмеженого терміну зберігання обробленого насіння - Виробництво надлишку обробленого насіння є небажаним, тому що термін зберігання обробленого насіння може бути обмеженим. Надмірно оброблене насіння не може продаватись як зерно для круп.

Всі три з даних обмежень можна подолати або значно зменшити шляхом включення частинок карнаубського воску, як носія для біологічного агента, в даному випадку, який не діє на мікроорганізми, які застосовують до насіння. За сприятливих умов, мікроорганізми ростуть та колонізуються на зовнішній поверхні насіння або розсади, що розвивається. Біологічні агенти можуть допомогти у зниженні гниття насіння, захворюваності розсади або кореневої гнилі.

Наступні випробування проводять для вивчення можливого впливу включення частинок карнаубського воску.

Перша фаза - Виділення культур

1. Підтримання культур

Реєстрації зберігають з кожної виділеної субкультури, які мають присвоєний їм інвентарний номер. Всі планшети та предметні скельця, які стосуються такої субкультури, маркують інвентарним номером.

Крім того, постійні встановлені лактофенольні (LP) предметні скельця виконують з кожної з вихідних культур та заносять в файл для контрольних цілей.

Не більше, ніж три покоління субкультури проходить перед пасируванням через живого господаря та повторне виділення для того, щоб зберегти пристосованість організму.

Субкультури зберігають для майбутнього застосування на картопляному агарі з декстрозою (PDA) при 4°C.

- 5 Кожному ізоляту присвоюють інвентарний номер та субкультури маркують таким номером. ДНК екстрагують для перевірки індивідуальності та зберігають при -20°C. Еталонний зразок чистої культури зберігають в гліцерині при -20°C. На завершення повторюють експеримент з ідентифікації ДНК культури, щоб підтвердити, що організм не мутував в процесі роботи.

## 2. Культивування збудника

- 10 Виділення патогенних грибів з враженої тканини у чисті культури є одним зі стандартних способів в ідентифікації та в описуванні захворювань. Це є важливим кроком в доказі патогенності організмів, які раніше не зустрічались.

Способи, як правило, включають:

- 15 а. Обробка поверхні стерилізацією  
 б. Покриття (можливо на селективному середовищі) зразків ураженої тканини з відповідними запобіжними заходами.  
 с. Субкультивування, щоб отримати чисті культури.

## 3. Очистка культур

- 20 Маленькі дезінфіковані шматочки кореня штучно інокульованої рослини культивують на водному агарі. Грибкові колонії, які виникають найбільш часто, є можливим цільовим патогеном. Декілька сапрофітів, крім того, можуть бути присутніми в тканинах інфікованої рослини, та вони можуть рости в середовищі з основним патогеном. Звичайна стерилізація поверхні складається з протирання тканини (або занурення в) 0,1% розчином гіпохлориту натрію (NaOCl - іноді також називають як "NaClO") з наступним промивання стерильною дистильованою водою. Для
- 25 отримання чистої культури патогену, маленький зразок беруть з краю колонії, що росте, фламбованою петлею або скальпелем та з прожилками на поверхні попередньо відлитого планшету PDA. Включення хлорамфеніколу (бактеріостатичного протимікробного агенту) при 30 мг/л знижує ризик бактеріального зараження. Як розвиток смуги на агарі, грибкові спори відокремлюють до тих пір, доки одинарні спори не будуть отримані, з яких окремі колонії будуть
- 30 рости.

Дану процедуру повторюють до тих пір, доки чисті культури не будуть отримані.

## 4. виділення окремої спори

- Виділення окремих спор є важливим для дослідження патогенної варіабельності. Інокулят спор розміщують в пробірку, що містить 10 мл стерильної води. Дану суспензію спори штрихують вздовж відміченої лінії на поверхні тонкого відгалуження водного агарного середовища, та інкубують при 22°C. Після 24 годинної інкубації, вибирають пророщені спори, використовуючи стереоскопічний мікроскоп, та переносять одну спору одночасно на інший агаровий планшет.
- 35

5. Приготування препарату предметного скла для мікроскопічного дослідження та посилення ідентифікація патогену: тканину можуть секціонувати або скоблити поверхню, потім занурювати у воду/лактофенол. Макроскопічно видно, що грибкові структури можуть бути відокремлені від тканини господаря, щоб дослідити та ідентифікувати. Ідентифікація залежить від утворення спор та, внаслідок цього, інфікований матеріал будуть інкубувати у вологому середовищі протягом ночі перед дослідженням з метою сприяти споруляції. Бавовняний синій барвник додаватимуть до лактофенолу для того, щоб підкреслити грибкової структуру. Зразок буде поміщений у краплі сатину на предметне скло та обережно нагрівають шляхом пропускання через повільне полум'я протягом декількох секунд до утримання в лактофенолі.

40

Цілий гістологічний зріз секцій може бути очищеним та забарвленим для полегшення ідентифікації, використовуючи наступний спосіб:

- 50 Пластинки листка роблять прозорими шляхом нагрівання їх в пробірках в лактофенолі доки на стануть прозорими (до 20 хвилин), не доводячи до кипіння. Пляма при нагріванні в 0,5% бавовняному синьому в лактофенолі на предметному склі протягом 5-10 хвилин. Ретельно промивають в лактофенолі та витримують в тому самому.

## 6. Ріст та середовища

- 55 Субкультури оцінюють для росту та проростання в діапазоні температур 13,5°C, 18°C та 22,5°C. Ряд середовищ досліджують на прийнятність. В той час як PDA є, як правило, прийнятним для більшості видів грибів, виявлено, що застосування низько поживного агару, такого як агар з водопровідною водою, знижує продуктивний ріст та може стимулювати утворення спор. Тому PDA, агар з водопровідною водою, та селективні середовища з

літератури, агар Чапека-Докса (Dawson (1962) Saboutaudia 1. 214-219) є включеними в межі оціночних випробувань.

Диск діаметром 5 мм ріжуть з краю культури, яка активно росте, застосовуючи прокалене в полум'ї свердло для пробок. Його розташовують перевернутими вверх дном в центрі чашок з попередньо налитими середовищами. П'ять відтворювань роблять для кожного типу середовищ та температури (всього 45 планшетів). До чашок в кожному інкубаторі застосовують повну рандомізацію. За чашками спостерігають доки одній культурі вдається повністю покрити чашку в будь-якому одному з середовищ. На даний момент здійснюють наступні вимірювання: діаметр колонії грибів, колір та край. Крім того, реєструють рівень споруляції.

П'ять дисків діаметром 5 мм вирізають з кожної чашки, використовуючи прокалене в полум'ї свердло для пробок, та суспендують в 20 мл дистильованої води (+0,05% Tween 20®). Потім зразок піддають дії ультразвуку протягом 2 хвилин, щоб вивільнити спори та потім струшують, щоб допомогти утворенню однорідної суспензії спор. Зразки оцінюють на концентрацію спор, використовуючи гемоцитометр, вдосконалений Нейбауером (Neubauer), використовуючи стандартну методологію підрахунку.

Середнє для кожного типу середовища розраховують, та ANOVA застосовують, щоб дослідити результати для значних відмінностей.

Фаза два - дослідження *in vitro*:

1. Скрінінг мікроорганізмів та карнаубський віск, щоб визначити взаємодії

Для того, щоб пояснити ефекти, які спостерігають, мікроорганізми, патогени та антагоністи скринінгують щодо ефекту карнаубського воску для ідентифікації будь-якого носія. Це дасть можливість визначити ефект від обробки, а також будь-який синергетичний ефект, що виникає в результаті використання, застосовуючи антагоніст з частинками карнаубського воску.

а. Чашки з відповідними середовищами застосовують, ґрунтуючись на одержаних даних з експерименту зазначеного вище. Подрібнений на повітрі карнаубський віск стерилізують, використовуючи автоклав, та потім перемелюють, використовуючи млин з подвійним лезом, одержуючи частинки з приблизним СОД 130 мкм. Стерилізовані середовища потім охолоджують до 50°C (стадія плавлення). Карнаубський віск потім вводять в середовища. Досліджують дві концентрації карнаубського воску; 1 г/л та 10 г/л. Диск діаметром 5 мм відрізають з краю культури, що активно росте, використовуючи прокалене в полум'ї свердло для пробок. Його розташовують перевернутими вверх дном в центрі чашок з попередньо налитими середовищами/карнаубським воском. П'ять відтворювань роблять для кожної концентрації та інкубують при оптимальній температурі для росту/споруляції (як визначено в попередньому експерименті). Швидкості росту та характеристики порівнюють з контролями, використовуючи дані з експерименту «Ріст та середовища» вище.

Відмінності аналізуватимуть, використовуючи ANOVA.

б. Диски патогену та антагоністів посипають різними обробками карнаубського воску та розміщують у відповідних середовищах. Необхідно, щоб частинки карнаубського воску були вільними від мікроорганізмів, щоб бути здатними приймати участь в даному експерименті. Порівнюють ріст оброблених та необроблених організмів.

2. Дослідження дії антагоніста щодо патогенів

i. Вплив антагоністів на життєздатність *Altemaria* sp. міцелій (*in vitro* аналіз I)

Всі антагоністичні ізоляти досліджують в подвійному аналізі культури щодо патогенних грибів на PDA або альтернативних попередньо визначених середовищах. Агарні пробки *Altemaria* sp. та ізолят антагоністу, які випробовували, упорядковують на 7 см по окремої на 9 см агарових чашках. Зони інгібування та зони перекриття оцінюють через 7 днів інкубації при 13,5°C, 18°C та 22,58°C. Коли антагоніст переростає міцелію *Altemaria* sp., зону гіфової взаємодії між обома досліджують мікроскопічно (100x). Штами грибів без мікроскопічно видимого ефекту на міцелію *Altemaria* sp. виключають з наступних експериментів. Більш того, життєздатність *Altemaria* sp. в області взаємодії досліджують шляхом переносу міцеліальних дисків на водно-агарові чашки через 5 днів після першого контакту. міцелію *Altemaria* sp. оцінюють як життєздатні, коли ріст типового гіфу спостерігають мікроскопічно (100x). Кожен експеримент повторюють тричі з трьома зразками на відтворювання.

ii. Вплив антагоністів на проростання *Altemaria* sp. склероції, одержаного *in vitro* (*in vitro* аналіз II)

Склероція *Altemaria* sp. однакового розміру розташовують на 6 день старої культури (PDA, 20°C) грибового антагоністу. Після інкубації протягом 14, 28 та 35 днів при 20°C, вісім склероцій на відтворювання (три відтворювання на антагоніст) переносять з агарної чашки на водний агар. Міцеліальний ріст з даних склероції оцінюють під світловим мікроскопом (100x).

3. Підтвердження патогенності

Стадії, щоб виконати постулати Коха (Koch) (Кох 1890, критерії спрямовані на встановлення причинно-наслідкового зв'язку між хвороботворним мікроорганізмом та захворюванням)

а) Описують виражені симптоми захворюлих злакових культур.

5 б) Виділяють підозрюваний патоген - ті ж самі культури повинні бути виділеними з рослин з подібними симптомами.

с) Одержують чисту культуру та застосовують її для інокуляції здорового рослинного матеріалу.

д) Спостерігають симптоми, виражені для інокульованих рослин - симптоми повинні бути такими самими як ті, що спостерігають спочатку у злакових культур.

10 е) Знову ізолюють патоген з заново захворюлого матеріалу. Культура повинна бути такою ж, що й вихідна очищена культура.

і. Непряме застосування - рослина

15 Використовуючи здорові рослини - в ґрунт можуть вносити, безпосередньо використовуючи суспензію спор, виготовлену з чистої агарової культури або з культури, що росте в колбах. Грибкові спори або бактеріальну суспензію можуть додавати після появи сходів, таким чином, щоб кореневу систему змочити суспензією. Потім за рослинами спостерігають протягом 7 днів та реєструють симптоми. Постулати Коха застосовують для того, щоб підтвердити, що симптоми стосуються інокульованого патогену.

ii. Пряме застосування - насіння

20 Посівні культури для одержання суспензій спор вирощують на водному агарі, що містить стерильні насіння. Грибні спори та гіфи або бактеріальну спор та вегетативний ріст зіскочують з колонії та переносять у стерильну воду. Дану суспензію спор потім застосовують до насіння та змішують, щоб забезпечити рівномірний розподіл. Насіння потім:

25 • розміщують на вологому фільтрувальному папері та інкубують при оптимальній температурі росту протягом 5 днів.

• висівають в теплий стерилізований заливний компост та інкубують в культиваторі при оптимальній температурі росту протягом 7 днів.

Проявлення симптомів та проростання реєструють для обох наборів експериментів та застосованих постулатів Коха.

30 4. Аналіз спільного розташування карнаубського воску/антагоністу

Сухий порошкоподібний препарат спор виробляють, використовуючи сепаратор спор. Вміст води в препараті знижують до нижче 5%, використовуючи вологопоглинач та кульки діоксиду кремнію. Концентрацію спор визначають, використовуючи гемоцитометр Нейбауера та стандартизовану методологію підрахунку.

35 Стадії перемелювання з повітрям в процесі мікронізації за Бойсом (Boyes) (для частинок карнаубського воску з СОД приблизно 25 мкм та 75 мкм)

1. 2 кг блоків карнаубського воску спочатку потрібнюють до частинок приблизно від 4 до 6 мм в подрібнювачі KT Handling Ltd Model 04 (серійний номер 729/C), слідуючи інструкціям виробника.

40 2. Подрібнені частинки потім пропускають через подрібнючий млин Apex Construction Ltd Model 314.2 (серійний номер A21306) та далі зменшують розмір в діапазоні від 250 до 300 мкм.

3. Подрібнені частинки потім пропускають через струменевий млин Hosokawa Micron Ltd Alpine 100AFG (серійний номер 168092), слідуючи інструкціям виробника, параметри млина за прийнятної швидкості (на швидкості 8000 обертів на хвилину для частинок, що мають СОД 15 мкм або на швидкості 2500 обертів на хвилину для частинок, що мають СОД 75 мкм), з позитивним тиском в системі 0,03 бар.

4. Розмелювання з повітрям повинне підтримувати до 6 бар, система промивання повітряного потоку та класифікування зазору коліс промиваючого повітря є обома, для яких повинні бути встановлені на мінімумі 0,5 бар та не більше ніж 0,75 бар, при очищенні повітряного фільтра слід фіксувати дельту не більшу, ніж 5 бар, щоб досягати кінцевий розмір частинки з СОД 15 мкм або 75 мкм, як вимагається.

Ентостат комбінували з насінням пшениці при трьох навантаженнях (дивись нижче).

55 Два розміри частинки карнаубського воску, що мають СОД 15 мкм та 75 мкм, відповідно, досліджують в комбінації з композицією спор при двох різних співвідношеннях (1:3, 2:2). Зразки суміші карнаубського воску/спори аналізують, використовуючи електронну фотомікроскопію, щоб визначити ефект спільного розміщення. Реєструють будь-яку зміну, що спостерігається.

Крім того, обидва розміри карнаубського воску, про який йде мова, змішують з гомогенізованим зразком міцелію та досліджують, як описано вище.

5. Навантаження частинки карнаубського воску

Адгезію частинок карнаубського воску до насіння апроксимують шляхом застосування фотомікроскопії (якісний аналіз) та флуориметричного аналізу (кількісний аналіз). Застосовують два розміри частинок карнаубського воску (з 1% globrite), що мають СОД 15 мкм та 75 мкм, відповідно. Чотири комбінації: два співвідношення композиції карнаубський віск/спора, разом з одним міцелієм та контрольним носієм (тільки карнаубський віск), становить загалом вісім обробок. Обробки застосовують до 10 г насіння та повторюють тричі. Три субзразки беруть з кожного повторення, та середнє значення застосовують в аналізі.

Для флуориметричного аналізу до трьох зразків по 1 г кожний додають по 5 мл етанолу та піддають дії ультразвуку, щоб допомогти вивільненню частинок карнаубського воску з насіння. Зразки аналізують, використовуючи Perkin Elmer L55 флуориметр (Perkin Elmer, MA, USA). Статистичний аналіз варіації між обробками виконують, використовуючи ANOVA.

Розмір насінини та архітектура варіюють, в значній мірі, між видами зернових культур та це впливає на норму внесення добрив та спосіб. Гомогенна суміш досягається шляхом перевертання циліндру з композицією насіння та карнаубського воску, адаптованою для отримання латерального змішування/перевертання за допомогою включення кутових внутрішніх лопаток, розташованих на ролик Wheaton протягом 5 хвилин.

Фаза три - In vivo:

*Alternaria* sp., разом з найбільш успішною моделлю антагоністу застосовують в серіях експериментів in vivo. Основна конструкція є експериментом з розщепленими ділянками з температурою, яка є основним фактором ділянки (13,5°C, 18°C та 22,55°C) та співвідношення карнаубського воску/антагоністу (3 обробки: 2 x спора, 1 x міцелія), яка є під-ділянкою. Чотири гомогенних суміші з кожної обробки одержують, використовуючи спосіб, описаний вище та дані відображають повторення.

Обробки:

- 1) Пропорція застосування 1 -  $7,5 \times 10^6$  конідії  $\text{кг}^{-1}$
- 2) Пропорція застосування 2 -  $7,5 \times 10^8$  конідії  $\text{кг}^{-1}$
- 3) Застосування 3 - міцелія
- 4) Контроль 1 - контрольний носій (тільки карнаубський віск)
- 5) Контроль 2 - без обробки

суміші (істинні повторення): A, B, C, D

Суб-зразки з кожної суміші:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .

Суміші та обробки систематизували відповідно до рандомізованої блочної конструкції.

Дослідження в горщиках

Кожна температура (камера росту) містить 60 горщиків з рослинами.

Оброблене насіння сіють відповідно до рекомендацій постачальника. Ґрунт/компост (1:1 Джона Іннеса № 2 та торф'яний компост) стерилізують нагріванням перед інокуляцією 10 мл суспензії спор *Alternaria* sp. та ретельно перемішують перед посівом.

Рослини розташовують в камерах росту на період протягом 21 дня зі спостереженнями за проявами симптомів, які роблять кожні 48 годин після появи. Воду подають через капілярні підстилки двічі на день.

Через 21 рослини видаляють зі своїх горщиків та далі проводять оціночні вимірювання:

- % проростання
- % змочуваність перед проростанням
- % змочуваність після проростання
- маса кореню
- маса паростку

Крім того, прояви симптомів оцінюють на основі шкали ушкоджень.

Середні значення вимірювань, взяті з суб-зразків  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , порівнюють для кожної обробки, використовуючи ANOVA.

Зразки беруть з 5 рослин, які демонструють симптоми, та застосовують постулати Коха, щоб підтвердити спричиняючий організм (шляхом порівняння з еталонним предметним склом культури-господаря).

Експеримент повторюють.

Другий приклад

Контроль *Pythium graminicola* [United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)] на пшениці (*Triticum aestivum*), використовуючи способи обробки насіння, використовуючи флудіоксоніл.

Експериментальна розробка - як в дослідженні в горщиках, в прикладі 1, вище.

Карнаубський віск плавлять, використовуючи мідні ванночки. Під час охолодження додають флудіоксоніл в кількості 1 % від маси карнаубського воску. Даній суміші дають затвердіти перед

подрібненням та обробляють за допомогою млина, як описано вище, з параметрами швидкості перемелювання 6000 обертів на хвилину, щоб отримати частинки з СОД 25 мкм.

Обробка для дослідження в горщечку - контроль 1 - контрольний носій (тільки карнаубський віск) контроль 2 - без обробки.

- 5 Обробка 1 - 1% карнаубський віск з флудіоксонілом 10 г на кг насіння.  
Обробка 2 - 1 % карнаубський віск з флудіоксонілом 3,2 г на кг насіння.  
Оцінювання та аналіз, як в попередньому дослідженні в горщечку.  
Третій приклад

Відповідно до:

- 10 Контроль *Agriotes Mancus* spp. (Coleoptera: Elateridae), або на пшеничному проволочнику, (личинкова форма жука-щелкуна), що живе на пшениці (*Triticum aestivum*), використовуючи способи обробки насіння, використовуючи тіаметоксам.

Початком сезону пошкодження дротяники складається з видовбування насіння, де личинки вступили під час проростання. Саджанці рослин також можуть бути поранені або вбиті шляхом личинок тунелювання в рослині нижче лінії ґрунту. Іноді, дротяники висвердлюють отвори в стеблах великих рослин та тунелю в декількох дюймах, але шкода не є значною.

Експериментальна розробка - як в дослідженні в горщечках, описаному вище.

- 20 Карнаубський віск плавлять, використовуючи мідні ванночки. Під час охолодження додають тіаметоксам в кількості 1 % від маси карнаубського воску. Даній суміші дають затвердіти перед подрібненням та обробляють за допомогою млина, як описано вище (параметр швидкості 6000 обертів на хвилину), щоб отримати частинки з СОД 25 мкм.

Обробка для дослідження в горщечку -  
контроль 1 - контрольний носій (тільки карнаубський віск),  
контроль 2 - без обробки.

- 25 Обробка 1 - 1% тіаметоксамальний карнаубський віск 4,2 г на кг насіння.  
Обробка 2 - 1% тіаметоксамальний карнаубський віск 1,3 г на кг насіння.

Порожні горщики вистилають скрінговим матеріалом нейлонової сітки перед наповненням ґрунтом для горщиків. Конструюють каркас з проволочки та нейлон з комірками зв'язаними над рамкою, щоб забезпечити закриті експериментальне поле, розроблене таким чином, що комаха не зможе уникнути оброблених ділянок.

- 30 Насінню дають прорости протягом трьох днів перед додаванням личинки вікової стадії п'ять до поверхні ґрунту кожного горщика перед повторним закриттям клітки з комірками.

Спостереження проводять понад 21 день.

Рослини оцінюють щодо:

- 35 • % проростання  
• пошкодження  
• маси кореня  
• маси паростка.

- 40 Процедурам, деталізованим в прикладі один, слідують, щоб дослідити антагоністичний ефект *Trichoderma harzianum* [United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)], *Pseudomonas fluorescens* [UKNCC] та *Bacillus subtilis* [UKNCC] на *Fusarium* sp., грибковому патогені рису (*Oryza sativa*).

Процедурам, деталізованим в прикладі один, слідують, щоб дослідити антагоністичний ефект *Trichoderma harzianum* [United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)], *Pseudomonas fluorescens* [UKNCC] та *Bacillus subtilis* [UKNCC] на *Colletotrichum graminicola*, грибковому патогені сорго (*Sorghum bicolor*).

Процедурам, деталізованим в прикладі два, слідують, щоб дослідити дію металаксилу на *Pythium* sp., грибковому патогені рису (*Oryza sativa*).

- 50 Процедурам, деталізованим в прикладі два, слідують, щоб дослідити дію прохлоразу на *Rhizoctonia* sp., грибковому патогені сорго (*Sorghum bicolor*).

Процедурам, деталізованим в прикладі три, слідують, щоб дослідити дію тіаметоксаму на личинку хруща (*Phyllophaga chnite*), комаху-шкідника сорго (*Sorghum bicolor*).

- 55 Процедурам, деталізованим в прикладі три, слідують, щоб дослідити дію імідаклоприду/бета-цифлутрину на мошку рисового насіння (*Cricotopus sylvestris*), комаху-шкідника рису (*Oryza sativa*).

Пригнічення агентів, що спричиняють грибкове захворювання у пшениці (*Triticum aestivum*), використовуючи покриття насіння *Trichoderma* sp. та частинками карнаубського воску

Потенціал *Trichoderma* sp. (Ascomycota), як біологічного агента в захисті проти рослинних патогенів, є відомим.

Гіфи *Trichoderma* є здатними проникати в гіфи інших грибів та екстрагувати поживні речовини з середини, одержуючи в результаті пригнічення та можливу смерть господаря. *Trichoderma* демонструє швидкий ріст міцелію та є здатним до зовнішнього конкурування з іншими грибами за поживні речовини.

Існує декілька комерційно доступних композицій *Trichoderma*, які продаються як засоби захисту зернових продуктів. Їх зазвичай поставляють у вигляді порошкової композиції, що змочується, та застосовують до ділянок культивування у вигляді зрошування. Недоліком даної форми застосування є те, що існує необхідність обробляти всю ділянку культивування, тоді як потребує обробки тільки область безпосередньо навколо насінини або рослини, що потребує обробки. Чим більше число конідій, доставлених в дану область, тим більший рівень контролю вони здатні передавати. В наслідок цього, система цільового застосування здатна доставляти достатню кількість конідій до необхідної області, пропонує явну перевагу в застосуванні *Trichoderma* в порівнянні з традиційними застосуваннями.

Мета експерименту: оцінити потенційне застосування ентостату, як технології покриття насіння для доставки корисних мікробів

#### Способи

Стадії перемелювання з повітрям в процесі мікронізації за Бойсом (для частинок карнаубського воску з СОД приблизно 10 мкм)

1. 2 кг блоків карнаубського воску спочатку подрібнюють до частинок від приблизно 4 до 6 мм в подрібнювачі KT Handling Ltd Model 04 (серійний номер 729/C), слідуючи інструкціям виробника.

2. Подрібнені частинки потім пропускають через подрібнюючий млин Apex Construction Ltd Model 314.2 (серійний номер A21306) та далі зменшують розмір в діапазоні від 250 до 300 мкм.

3. Подрібнені частинки потім пропускають через струменевий млин Hosokawa Micron Ltd Alpine 100AFG (серійний номер 168092), слідуючи інструкціям виробника, параметри млина зі швидкістю 12500 обертів на хвилину, з позитивним тиском в системі 0,03 бар.

4. Розмелювання з повітрям повинне підтримувати до 6 бар, система промивання повітряного потоку та класифікування зазору коліс промиваючого повітря є обома, для яких повинні бути встановлені на мінімумі 0,5 бар та не більше ніж 0,75 бар, при очищенні повітряного фільтра слід фіксувати дельту не більшу, ніж 5 бар, щоб досягати кінцевий розмір частинки з СОД 9,7 мкм.

Ентостат комбінували з насінням пшениці при трьох навантаженнях (дивись нижче).

1. Дані базисної лінії: способи покриття насіння

1.1. Покриття насіння. *Trichoderma harzianum* (який містить  $7,75 \times 10^9$  колонії утворюючих одиниць  $\cdot g^{-1}$  Sylvan Bio, Loches, France) з відсотком проростання 95% застосовували до пшениці (варіант Hereward, Herbiseeds, Twyford, UK), використовуючи частинки карнаубського воску з СОД 9,7 мкм. Цільове навантаження становило  $10^5$  конідій на насінину, ґрунтуючись на інформації, одержаній з літератури.

Частинки карнаубського воску змішували з порошком сухої конідії при різних співвідношеннях та 0,01 г (0,2% за масою) застосовували безпосередньо до сухого насіння, 5 г насіння на концентрацію. Для кожної концентрації, чотири серії з 10 насінин використовували для оцінки навантаження конідії.

Використаними співвідношеннями конідії до карнаубського воску були:

100% конідії, 50% конідії, 25% конідії та 9% конідії із залишком в кожному випадку, що становить частинки карнаубського воску.

1.2. Підрахунок. Безпосередній підрахунок, щоб визначити навантаження конідії на насіння, роблять шляхом застосування гемоцитометру (Improved Neubauer, Hawksley, Lancing, UK).

Посівна культура: Приготування суспензії.

Пагони, як правило, формують у водному носію, незважаючи на те, що вони з гідрофобними клітинними стінками (такі як *Trichoderma*) не суспендуються легко у воді. Для однорідного суспендування гідрофобних пагонів у воді є необхідним піддати дії ультразвуку та/або застосувати способи механічного суспендування. Механічна суспензія пагонів, використовуючи мікропестики, забезпечує гарну суспензію конідії у воді без спричинення пошкодження клітинам. Крім того, поверхнево-активна речовина може сприяти суспендуванню пагонів (Tween 20 при 0,05%). Щоб суспендувати гідрофобну конідію, зібрані конідії поміщають в 1,5 мл мікроцентрифужну пробірку, в пробірку додають 0,5 мл стерильної води, мікропестик вставляють в пробірку, та конідіальну масу обережно перемішують вручну, використовуючи мікропестик (попередити вивільнення конідії в повітря). Мікропестик приєднують до двигуна (наприклад, Kontes, Argos двигун з кульковим пестиком) та суспензію енергійно перемішують, в той же час двигаючи пестик вгору та вниз, та переміщуючи з боку в бік, приблизно 30 секунд.

Так як гемоцитометричний спосіб не робить різниці між життєздатними та нежиттєздатними пагонами, існує необхідність визначити життєздатність спор таким чином, що дози можуть бути одержані на основі життєздатних пагонів.

Насіння миється та підрахунок *Trichoderma* навантаження виконували на 4 серіях насіння на обробку. Посівну культуру промивали від насіння шляхом додавання в 1 мл стерильного 0,05% Tween 20 в пробірку еппендорфа (Eppendorf) та струшуючи протягом 30 секунд, щоб видалити конідію з поверхні насіння. Потім зразки піддавали дії ультразвуку протягом двох хвилин, щоб зруйнувати будь-які агрегати конідії. Одержані підрахунки застосовували для обчислення середнього навантаження конідії на насіння, покриті різними обробками. Одержані результати, використовуючи 100% порошок конідії, застосовували як еталонний тест, та комбінацію порошків конідії/карнауцького воску порівнювали з нею, як визначення ефективності навантаження.

Підтвердження життєздатності конідії досягали шляхом нанесення розбавлення на конкретні середовища *Trichoderma* (TSM) (дивись нижче). Серії розбавлення готували та дублювали чашок інокулювали з серій. Підрахунки колонії утворюючих одиниць (КУО) виконували через 7 днів, що дає кількісно визначити рівні посівної культури на насінні. Крім того, свіжі, невикористані конідії клали, щоб забезпечити порівняння перед та після застосування насіння. Крім того, вимірювали відсоток проростання. Одержували задовільну щільність конідії, використовуючи поширеність приблизно  $10^6$  конідій в 100 мкл середовища в 9 см чашці Петрі. Конідію інкубували в темноті при 25°C протягом п'яти днів, та, щоб спостерігати, площу потім фіксували, використовуючи лактофенол. Фаза контрастної мікроскопії, використовуючи інвертований складний мікроскоп, що дає можливість достатнього контролювання конідії. Конідії вважалися життєздатними, якщо довжини зародкової трубки була подвоєною діаметру пагону, що розглядається. Підраховували кількості пророслих та непророслих конідій в довільно вибраних ділянках зображення або в паралельних трансектах, визначених за допомогою окулярного мікрометра. Нарахували мінімум 300 конідій, щоб забезпечити точну оцінку. Бажаним є визначити життєздатність пагонів на культурах відтворення та в різних положеннях на одному й тому ж планшеті.

Це дозволяло калібрування способів покриття насіння, щоб одержати подібні рівні навантажень *Trichoderma* на насіння для кожного способу покриття.

1.3. Проростання насіння. Одну серію (5 насінин) насіння з кожної обробки розміщували на папері тестування насіння (Ватман 181) в 9 см чашці Петрі. Чашки герметично закривали плівкою Parafilm та витримували при 20°C протягом 7-10 днів та визначали швидкість проростання. Це повторювали з необробленим насінням.

Вибрані середовища *Trichoderma* (адаптовані з Williams, Clarkson et al 2003) одержували наступним чином:

На 1000 мл  
Інгредієнти основного поживного середовища:  
0,2 г  $MgSO_4$  3,0 г глюкози  
0,9 г  $K_2HPO_4$  0,15 г бенгальської рози  
0,15 г KCl 20 г агару  
1,0 г  $NH_4NO_3$  950 мл дистильованої  
води

Процес приготування основного поживного середовища

Змішують рідкі інгредієнти зі всіма твердими інгредієнтами, за виключенням агару, в 1 л колбі Ерленмейера. Додають 20 г агару та струшують або перемішують. Закривають пробкою з вовняної вати та накривають фольгою. Автоклавують.

Біоцидне середовище (на літр)

0,25 г кристалізованого хлорамфеніколу  
0,2 г хінтозину  
0,2 г каптану  
1,2 мл пропамокарбу (Previcur)  
50 мл стерильної дистильованої води.

Маса насіння

Використовували як міру гомогенності серії насіння. Вісім повторень з 25 насінин зважують та реєструють коефіцієнт варіації (Cv). Даний коефіцієнт не повинен перевищувати значення 5. Якщо це виконується, потім процедуру повторюють та середнє з всіх 16 зразків використовували для обчислення кількості насінин на грам.



Зернові	Середня маса (г)	SD	Cv	TGW (г)
Пшениця	1,258	0,059	4,678	50,305

## Результати

Прямий підрахунок кількостей, використовуючи гемоцитометр

- 5 Вихідна щільність спор *Trichoderma harzianum* сухого препарату спори (при 5% вмісту води), визначена, використовуючи гемоцитометр, становила  $7,75 \times 10^9$  спори  $г^{-1}$  ( $n=4 \pm 2,6 \times 10^7$  95%CL).

## Підрахунок спор з помитого насіння

Мінливий	% спор	n	середнє	Se середнє
Кількість спор	9	4	300750	11499
	25	4	757750	21453
	50	4	1062500	18875
	100	4	2145000	109278

- 10  $10^5$  цільових спор на насінину

Існували чіткі та статистично значні відмінності між середніми кількостями спор на насінину, досягнутими різними обробками, як визначено одностороннім ANOVA ( $F(3,12) = 190,83$ ,  $p < 0,001$ ). Всі обробки перевищували цільову  $10^5$  спор насінина $^{-1}$ .

15

% спор	Середня кількість спор насінина $^{-1}$	*Очікувана кількість спор	Як % від 100% обробки	**Як відсоток від очікуваного	t значення	p значення
100%	905250	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
50%	1062500	1072500	50%	99%	-0,53	0,633
25%	757750	536250	35%	141%	10,32	0,002
9%	300750	193050	14%	156%	9,37	0,003

\*Очікувану кількість спор розраховували з середньої кількості спор, яка досягається при 100% обробці, за умови ідеального розподілу. Тому слід очікувати, що 50% обробка в результаті призведе до половини спор від 100% обробки і т.д.

- 20 \*\*По суті вимірювання покращення ефективності адгезії спор.

Виявляється, що додавання ентостату понад 50% покращує ефективність адгезії спор до насіння, так як фактичні середні кількості значно перевищували очікувані результати на основі 100% спорової обробки (f-тест).

25

Визначення проростання

Середнє проростання конідії (зі зразка 300)

Свіжа конідія  $276,50 \pm 5,80$ ,  
 $n = 4$ Конідія з митого насіння  $275,25 \pm 6,18$ ,  
 $n = 4$ 

Не існує статистично значної різниці між життєздатністю свіжої конідії та тією, що відмита з насіння, як визначено одностороннім ANOVA ( $F(1,6) = 0,04$ ,  $p = 0,847$ ).

Оцінка підрахунку з КУО кількостей

30

Порівняння кількостей гемоцитометру та КУО (скореговані на розбавлення)

Обробка	n	середнє	Se середнє	Групування (застосування Тьюкі способу)
100 КУО	4	2150000	83964	A
100 Гемо	4	2145000	109278	A
50 КУО	4	1060000	12910	B
50 Гемо	4	1062500	18875	B
25 КУО	4	787500	15058	C
25 Гемо	4	757750	21453	C
9 КУО	4	303250	9059	d
9 Гемо	4	300750	11499	d

Способи, що не використовують разом літери, є досить різними.

- 5 існувала статистично значна різниця між групами, як визначено одностороннім ANOVA ( $F(7,24) = 205,95$ ,  $p = < 0,001$ ). Критерій Тьюкі по одержаним результатам виведеної достовірності представляв собою результат відмінностей у % спор переважніше, ніж підрахунок за застосованим способом.

Висновки

- 10 Насіння пшениці може бути покрите спорами *Trichoderma* в надлишку цільових  $10^5$  спор насіння<sup>-1</sup> для всіх обробок.

Застосування ентостату у співвідношенні більшому ніж 1:1 підвищує ефективність доставки спори, як результат зменшення зіпсутих або втрачених спор.

Життєздатність проростання спор не впливає на їх застосування як покриття для насіння.

- 15 Встановлення кількості шляхом безпосереднього підрахунку спор, використовуючи гемоцитометр або шляхом застосування підрахунку КУО дає статистично подібні результати та, внаслідок цього, будь-який з двох способів може бути використаний, що однозначно доводить, що життєздатність проростання не залежить від обробки.

- 20 Описаний спосіб для пшениці, як передбачається вище, застосовують, щоб оцінити ефективність доставки спор за ентостатом до насіння ячменю, жита, вівсу, кукурудзи та житнього злаку. Подібні або кращі результати одержували, в залежності від навантаження та розміру насіння.

Ефекти покриття насіння на пригнічення захворювання

- 25 Насіння покривають *Trichoderma*, використовуючи воду або ентостат для досягнення навантажень приблизно  $10^5$  та  $10^6$  КУО насіння<sup>-1</sup>. Водні обробки є суспензіями спор в стерильній воді, в якій зразки насіння замочують протягом однієї години. Потім насіння знову висушують, подібно до комерційного сценарію, або висівають волого покритими. Ентостат застосовують у співвідношенні 3:1 та 9:1 ентостату до спор, відповідно. Способи обробки насіння потім порівнюють щодо їх здатності до захисту проростаючої розсади пшениці від *Gaeumannomyces graminis*, агента, що спричиняє захворювання - випрівання у пшениці.

- 30 Інокуляція насіння *Trichoderma*. Насіння пшениці cv. Hereward інокулюють як слідус далі (цільова концентрація на насінину):

1) *Trichoderma* концентрацією  $10^5$ /насіння, використовуючи водну суспензію (вологе покриття)

- 35 2) *Trichoderma* концентрацією  $10^6$ /насіння, використовуючи водну суспензію (вологе покриття)

3) *Trichoderma* концентрацією  $10^5$ /насіння, використовуючи водну суспензію (сухе покриття)

4) *Trichoderma* концентрацією  $10^6$ /насіння, використовуючи водну суспензію (сухе покриття)

- 40 5) *Trichoderma* концентрацією  $10^5$ /насіння, використовуючи ентостат 3:1

6) *Trichoderma* концентрацією  $10^6$ /насіння, використовуючи ентостат 3:1

7) *Trichoderma* концентрацією  $10^5$ /насіння, використовуючи ентостат 9:1

8) *Trichoderma* концентрацією  $10^6$ /насіння, використовуючи ентостат 9:1

9) Без *Trichoderma*, тільки вода

10) Без *Trichoderma*, тільки ентостат

- 45 11) тільки насіння.

Підрахунок. *Trichoderma* кількісно визначали, використовуючи стандартні способи покриття розбавлення на специфічних середовищах *Trichoderma*. Це підтверджує КУО навантаження на насіння для обробок 1-8. Покриття розбавлення виконують з дублюванням.

*Gaeumannomyces* біоаналіз

Приготування посівної культури - відомо, що *Gaeumannomyces* sp. є патогенним до пшениці, ячменю, жита, вівсу та дерноутворюючі злаки, вирощують на PDA чашках з вихідних культур та інкубують при 20°C, щоб отримати активно ростучі колонії. Агарні пробки видаляють з чашок та застосовують, щоб інокулювати стерилізовані (автоклавовані при 121 °C протягом 20 хвилин)

5 суміші для посадки Джона Іннеса № 2 (John Innes) (80% вміст вологи; 60 г), змішують з кісочками картоплі (2 мм<sup>2</sup>, 25 г) в 500 мл колбах Ерленмейера. Колби інкубують при 20°C протягом 14 днів. Рівні посівної культури в середовищі кількісно визначають, використовуючи традиційний спосіб покриття розбавлення.

10 Ефективність обробки насіння на *Gaeumannomyces*. Насіння висівають в індивідуальні комірки планшету для насіння, що містить *Gaeumannomyces* - інокульоване середовище (приблизно 15 мл/комірка). Чотири серії повторення з десяти насінин на обробку саджають в комірки. Одноразовий висів, планшети розміщують в камері для росту рослини (Weiss Gallenkamp Fitotron SG120) при 20°C з освітленням протягом приблизно 16 годин. Комірки змочують знизу. Кількість паростків, що вижили, реєструють кожні 3 дні протягом 21 дня.

15 Реєструють час появи паростків, відсоток успішного проростання та відсоток рослин, що демонструють симптоми, результати аналізують. Спостерігають відмінності у обробленого за методикою ентостат насіння та необробленого насіння.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

20

1. Композиція для покриття у формі порошку для насіння однодольних рослин, де зазначена композиція для покриття містить щонайменше один органічний матеріал-носіє у формі частинок, що мають середній об'ємний діаметр  $\geq 5$  мкм, де матеріал-носіє вибирають з воску, який має температуру плавлення  $\geq 50^\circ$  за Цельсієм, та один або більше біологічних агентів, що

25

2. Композиція для покриття за п. 1, де середній об'ємний діаметр частинки становить від 8 до 200 мкм.

3. Композиція для покриття за п. 1 або п. 2, де біологічний агент вибирають з хімічного агента та живого біологічного агента або є їх сумішшю.

30

4. Композиція для покриття за будь-яким одним з попередніх пунктів, де біологічний агент вибирають з хімічного фунгіциду, артроподициду або бактерициду або є сумішшю двох або більше з них.

5. Композиція для покриття за п. 4, де артроподицид є інсектицидом або акарицидом.

35

6. Композиція для покриття за будь-яким одним з попередніх пунктів, де органічний матеріал-носіє вибирають з карнаубського воску, бджолиного воску, гірського воску, китайського воску, шелакового воску, спермацетового воску, канделільського воску, касторового воску, урикурового воску або воску рисових висівок або є сумішшю двох або більше з них.

7. Композиція для покриття за будь-яким одним з попередніх пунктів, де щонайменше один патоген є видом бактерії, видом грибів або видом членистоногих.

40

8. Композиція для покриття за будь-яким одним з пп. 1-3, де біологічний агент є щонайменше одним біологічним антагоністом, який є присутнім у формі бактеріальної спори та/або грибної спори, розташованої на поверхні зазначеної частинки.

9. Застосування органічного матеріалу-носія, де органічний носій складається з частинок воску, що мають середній об'ємний діаметр  $\geq 5$  мкм та вибраний з природного воску, синтетичного

45

10. Застосування за п. 9, де органічний матеріал-носіє вибирають з карнаубського воску, бджолиного воску, гірського воску, китайського воску, шелакового воску, спермацетового воску, мірицилпальмітату, цетилпальмітату, канделільського воску, касторового воску, урикурового воску, ланоліну, воску цукрової тростини, рематового воску або воску рисових висівок або є сумішшю з них двох або більше.

50

11. Застосування воску, як органічного матеріалу-носія, у вигляді сухої частинки в композиції для покриття однодольного насіння за будь-яким одним з пп. 1-8.

12. Застосування за п. 11, де органічний носій вибирають з природного воску, синтетичного

55

13. Спосіб виробництва композиції для покриття однодольного насіння за будь-яким одним з пп. 1-8, за яким:

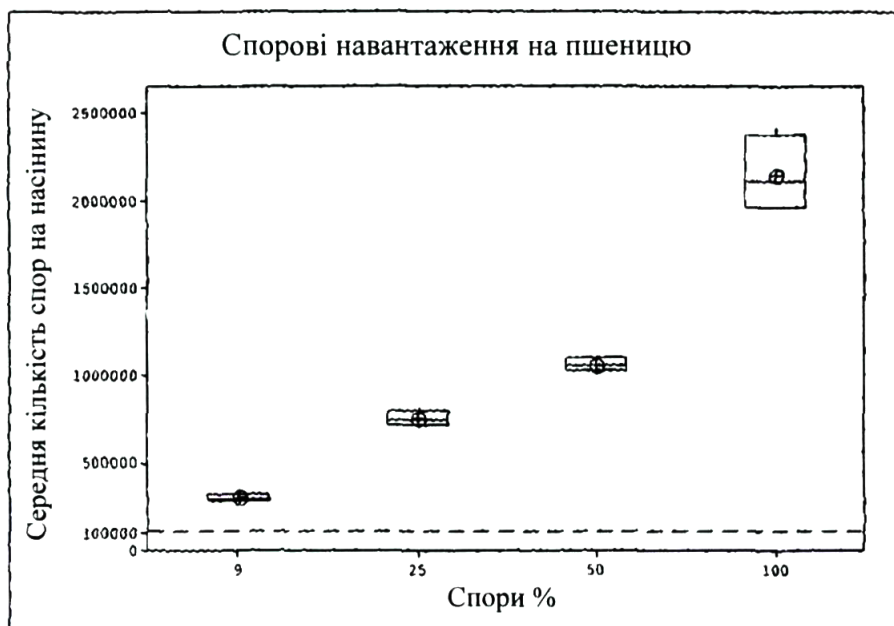
1) вибирають органічний матеріал-носіє з воску, що має температуру плавлення  $\geq 50^\circ$  за Цельсієм,

2) подрібнюють зазначений органічний матеріал-носії до частинок з середнім об'ємним діаметром  $\geq 5$  мкм, та

3) додають до частинок, одержаних на стадії 2), один або більше біологічних агентів, що мають активність щодо щонайменше одного патогену однодольної рослини.

5 14. Спосіб покриття насіння однодольної культури композицією для покриття, що містить органічний матеріал-носії в формі частинок, що мають середній об'ємний діаметр  $\geq 5$  мкм, де матеріал-носії вибирають з карнаубського воску, бджолиного воску, гірського воску, китайського воску, шелакового воску, спермацетового воску, канделільського воску, касторового воску, урикурового воску або воску рисових висівок або є сумішшю з двох або більше з них, та один  
10 або більше біологічних агентів, які мають активність проти щонайменше одного патогену однодольної рослини та які вибирають з інсектициду, акарициду, фунгіциду, бактерициду та живого біологічного агента, причому біологічний агент додають до органічного матеріалу-носія, змішують два разом та наносять композицію на насіння однодольної рослини.

15 15. Спосіб за п. 14, де композицію для покриття наносять у вигляді сухої частинки на насіння однодольної рослини.



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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