



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **37987** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A01N 63/00
A01C 1/06
A01C 1/08 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІНДУКУВАННЯ ХВОРОБОСТІЙКОСТІ РОСЛИН ТОМАТІВ

1

(21) а200601995
(22) 24.02.2006
(24) 25.12.2008
(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.
(72) ПЕРКОВСЬКА ГАЛИНА ЮРІЇВНА, UA, СЕРГІ-
ЄНКО ВАЛЕНТИНА ГРИГОРІВНА, UA, ДМИТРИЄВ
ОЛЕКСАНДР ПЕТРОВИЧ, UA, ГРОДЗИНСЬКИЙ
ДМИТРО МИХАЙЛОВИЧ, UA
(73) ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИ-
ЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, UA

2

(57) Спосіб підвищення стійкості рослин томатів до хвороб з використанням препаратів, дія яких спрямована на індукування хворобостійкості у рослин, зниження їх ураження фітопатогенними мікроорганізмами та зменшення рівня пестицидного навантаження, який **відрізняється** тим, що рослини обробляють вуглеводною фракцією клітинних стінок фітопатогенного гриба *Botrytis cinerea* у концентрації 0,01% - 0,04%.

Корисна модель відноситься до сільськогосподарства, зокрема захисту овочевих культур, з використанням препаратів, що індукують хворобостійкість рослин. Корисна модель може бути використаний для зниження ураженості рослин томатів від грибкових захворювань в період вегетації.

Томати, які є однією з головних овочевих культур, уражуються багатьма хворобами, серед яких найбільш шкідливими є фітофтороз та альтернаріоз, збудниками яких є фітопатогенні гриби *Phytophthora infestans* та *Alternaria* spp. Розвиток цих хвороб при сприятливих метеорологічних умовах має характер епіфітотії. Одним з найбільш поширених способів захисту овочевих культур від хвороб є застосування фунгіцидів системно-контактної та контактної дії (Ридоміл голд МЦ, Акробат МЦ та інші). Проте їх недоліком є те, що потрібно проводити багаторазові обприскування рослин фунгіцидами, які можуть накопичуватись в ґрунті, рослинах і забруднювати навколишнє середовище.

Сучасний стан екологічної безпеки в Україні потребує постійного пошуку шляхів зменшення пестицидного навантаження на агробіоценози. В зв'язку з цим розробка альтернативних, екологічно безпечних методів захисту рослин є особливо актуальною. Одним з таких альтернативних методів захисту є індукування природної хворобостійкості рослин за допомогою біотичних елісаторів. Біотичні елісатори - це метаболіти фітопатогенних мікроорганізмів, які розпізнаються рослинами та слугу-

ють сигналом для включення захисних реакцій. Їх дія, на відміну від фунгіцидів, направлена не на знищення патогена - збудника хвороби, а на індукування механізмів природної стійкості рослин, що дозволяє зменшити кількість обробок фунгіцидами і, таким чином, сприяє оздоровленню навколишнього середовища.

Відомі способи застосування біотичних елісаторів для зниження ураженості рослин с.-г. культур фітопатогенними мікроорганізмами. Це використання екстракту міцелію гриба *Fusarium culmorum* в концентрації 0,5-1,0% від сухої речовини проти хвороб картоплі [1], міцелію гриба *Fusarium sambucinum* v. *minus* в концентрації 0,03-0,05% від сирої маси міцелію проти хвороб картоплі [2], екстракту міцелію грибів *Fusarium solani* і *Botrytis allii* проти хвороб цибулі ріпчастої [3], гомогенату дводобової культури гриба *Botrytis allii* в концентрації 0,01 - 0,03% проти проростання і хвороб цибулі при зберіганні [4], препарату Імуноцитопіту проти хвороб овочевих культур, який створено на основі ненасичених поліенових жирних кислот, в тому числі арахідонової кислоти (C_{20:4}), сечовини та антиоксидантів [5].

Проте в патентній літературі немає відомостей про використання біотичних елісаторів, а саме вуглеводних компонентів клітинних стінок фітопатогенних грибів, які більш стійкі при використанні, ніж білкові чи ліпідні метаболіти, проти хвороб овочевих культур.

(13) **U**(11) **37987**(19) **UA**

Відомий також, обраний як прототип, спосіб підвищення стійкості рослин томатів до хвороб [6]. У способі використаний екстракт міцелію гриба *V. cingerea* у концентрації 0,03-0,08% від сирової маси міцелію. Препарат призначений для стимулювання природного імунітету рослин по відношенню до патогенних грибів, а також для регулювання росту та розвитку рослин. Однак, відомий препарат має недоліки. Так, препарат включає складну композицію із вуглеводів, білків і ліпідів (в тому числі ненасичених жирних кислот), в якій два останніх компонента нестійкі в використанні, що ускладнює його виробництво. З літератури відомо, що вуглеводи (оліго- та полісахариди), як основний компонент клітинних стінок фітопатогенів, хімічно стабільні та високо активні як індуктори захисних реакцій та хворобостійкості різних рослин.

Нами було показано, що вуглеводна фракція клітинних стінок (ВФКС) отримана з *V. cingerea*, є активним біотичним еліситором різних захисних реакцій у цибулі. Так у клітинах суспензійної культури *Allium oleraceum* ВФКС індукувала „окиснювальний вибух“ та синтез антимікробних речовин - фітоалексинів ІД і 2Д [7]. Важливою є здатність біотичних еліситорів індукувати не тільки локальну стійкість, але і системну довготривалу стійкість рослин протягом всієї вегетації.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити ефективний, екологічно безпечний спосіб індукування стійкості томатів до хвороб з використанням хімічно стійкого біотичного еліситора, який стимулював би природний імунітет по відношенню до патогенних грибів.

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі, який заявляється, індукування стійкості томатів до хвороб здійснюється вперше за допомогою біотичного еліситора, яким є ВФКС з фітопатогенного гриба *V. cingerea* (штам 2307 з колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України), у концентрації 0,01-0,04% або 100-400мкг/мл екв. глюкози і який здатний індукувати системну довготривалу хворобостійкість рослин.

Двотижневий міцелій гриба, вирощений на рідкому середовищі Чапека, руйнували за допомогою ультразвука та рідкого азоту. Гриб *V. cingerea* відрізняється швидким ростом і накопиченням культуральної маси, тому отримання необхідної кількості клітинних стінок не викликає значних труднощів. Клітинні стінки були очищені з міцелію гриба від білків, ліпідів, нуклеїнових кислот [7]. З них за допомогою кислотного гідролізу була отримана ВФКС. Кислотний гідроліз клітинних стінок (1 мг клітинних стінок + 1мл 2 N соляної кислоти) проводили 4 год при температурі 100°C. ВФКС використовували для індукції хворобостійкості в процесі вегетації рослин.

Спосіб, що заявляється, здійснюється таким чином. ВФКС з *V. cingerea* у концентраціях 100 - 400мкг/мл була проаналізована на здатність індукувати хворобостійкість рослин томатів (сорт Флора, сприйнятливий до специфічних фітопатогенів - *Phytophthora infestans* та *Alternaria* spp.) в умовах

лабораторно-вегетаційного та польового проведення дослідів.

Ефективність дії ВФКС оцінювали порівняно з дією відомих препаратів для захисту рослин від хвороб: фунгіцид Ридоміл Голд МЦ, 68 з.п. (діюча речовина - металаксил + манкоцеб) (еталон), норма витрати 2,5кг/га; 68%, робоча концентрація 0,5% та Імуноцитифіт (діюча речовина - етиловий ефір арахідонової кислоти) (еталон), робоча концентрація 0,02%. Оцінку захисної дії ВФКС та зазначених препаратів визначали за методом Крайцбурга-Еггerta [8].

Приклад 1. В лабораторно-вегетаційних дослідах рослини томатів у фазі 5-6 справжніх листків обробляли (обприскували) розчином ВФКС у концентраціях 200 і 400мкг-екв. глюкози/мл (0,02-0,04%) для виявлення імуністимулюючої дії проти збудника фітофторозу. Через 3 дні проводили штучне інфікування рослин суспензією зооспорангіїв збудника фітофторозу, концентрація 10^5 спор/мл. Після інфікування рослини накривали вологими ізоляторами для створення сприятливих умов для зараження. Обліки ураження рослин фітофторою проводили на 7 і 11-й день після інюляції за 7 бальною шкалою і визначали ступінь розвитку хвороби. Повторність досліду 4-кратна. Результати дослідів наведені в таблиці 1. ВФКС проявляв значний захисний ефект проти збудника фітофторозу. На 7-й день після обприскування розвиток хвороби у варіантах, оброблених еліситором, було значно нижчим - 2,1 і 8,8% порівняно з контролем 16,4%. При цьому ефективність дії ВФКС при високих концентраціях була в 2,1 раза вища, ніж при менших концентраціях. На 11-й день після обробки рослин біотичним еліситором розвиток хвороби в варіантах, оброблених еліситорами, досягав 68,0 і 96,0%, в контролі - 100% і ефективність дії при нижчій концентрації становила 32,0%, а при вищій - лише 4%.

Одержані результати свідчать, що більш високі концентрації еліситорів індукують короткотривалу локальну стійкість, а низькі концентрації - довготривалу, системну хворобостійкість рослин. Концентрація 0,01% була обрана як сенсibiliзуюча для польових дослідів.

Приклад 2. У 2003 році було відмічено індукцію системної стійкості рослин томатів за допомогою ВФКС на природному інфекційному фоні у польових дослідах. Обприскування рослин препаратами проводили двічі за сезон по основних фазах розвитку: бутонізації - початку цвітіння та початку плодоутворення (18 та 25 липня). За період спостережень обробка рослин томатів розчином ВФКС знижувала розповсюдження альтернаріозу (особливо в початковий період розвитку хвороби у 1,7 рази порівняно з контролем) і забезпечувала біологічну ефективність з 39,3% до 10,9% (табл. 2).

За даними таблиці 3, урожайність томатів при обприскуванні ВФКС (500,9ц/га) була на рівні варіанта з Ридомілом Голд (515,5ц/га) проти 490ц/га в контролі. На плодах було зафіксовано розвиток як альтернаріозу, так і фітофторозу. ВФКС при концентрації 0,01% мав ефективність 31,6% і 55,7% проти альтернаріозу і фітофторозу відповідно.

Ефективність дії еталона - Ридоміла Голд при концентрації 0,4% була, відповідно, 52,6% і 46,0%. Це свідчить про те, що біотичний еліситор може забезпечити захисний ефект не нижче фунгіциду Ридоміл Голд.

Приклад 3. У 2005 році рослини томатів сорту Флора обприскували розчином ВФКС в концентрації 0,01% тричі за сезон по основних фазах розвитку: бутонізації - початку цвітіння, початку плодоутворення (4, 14 та 26 липня) (Київський НДЦ УААН). Домінуючими хворобами на помідорах були фітофтороз (збудник *Ph. infestans*) та суха плямистість - альтернаріоз (збудники *Alternaria solani* та *Alternaria alternata*). На природному інфекційному фоні вегетаційного сезону 2005 р. також спостерігали зниження розвитку хвороб на рослинах томатів при обробці ВФКС (таблиця 4).

Обприскування рослин томатів розчином ВФКС ефективно гальмувало розповсюдження фітофторозу та альтернаріозу, особливо в початковий період розвитку хвороб. В період спостережень за розвитком хвороб у варіанті з обробкою ВФКС цей показник був значно нижчим - з 6,2 до 79% (з 26.07 по 17.08) порівняно з контролем - з 19,8 до 94%. Еталони -Імуноцитопіт і Ридоміл Голд МЦ також виявляли високу ефективність захисту рослин проти фітофторозу та альтернаріозу, але при більш високих нормах витрат - Імуноцитопіт (0,02%) і Ридоміл Голд МЦ (0,5%).

Одержані результати свідчать, що біотичний еліситор ВФКС, виділений нами з гриба *B. cinerea*,

забезпечує високий ступінь захисту рослин в польових умовах протягом вегетації. В досліді встановлено, що ВФКС є ефективним індуктором стійкості проти хвороб томатів, які викликаються фітопатогенними грибами *Ph. infestans*, *A. solani* та *A. alternata*.

Таким чином, застосування екологічно безпечного біотичного елісатора, виділеного з клітинних стінок фітопатогенного гриба *B. cinerea*, шляхом обприскування рослин дозволяє підвищити стійкість томатів до інфекційних хвороб, знизити ураженість рослин під час вегетації та розвитку рослин.

Імуностимулююча дія ВФКС пояснюється тим, що він містить біологічно активні речовини (олігосахариди), які активізують захисні процеси рослинного організму. Механізм дії цього елісатора є системна сенситивізація рослинних тканин, завдяки чому підвищується їх здатність вмикати захисні реакції (синтез фітоалексинів, накопичення патоген-залежних білків, механічне зміцнення клітинних стінок) при наступній зустрічі з шкідливими організмами.

Оскільки індуктори захисних реакцій діють за тим же принципом, за яким рослини захищаються в природних умовах, можна вважати, що їх використання для підвищення хворобостійкості рослин не буде порушувати екологічної рівноваги та дозволить суттєво обмежити застосування пестицидів у рослинництві.

Таблиця 1

Вплив вуглеводів клітинних стінок *Botrytis cinerea* на ураженість рослин томатів фітофторозом (лабораторно-вегетаційний дослід, сорт Флора)

№ п/п	Варіант дослідів	Концентрація, %	Розвиток хвороби після інфікування рослин, %		Гальмування розвитку хвороби (ефективність дії), %	
			7-й день	11-й день	7-й день	11-й день
1	Контроль (вода)	-	16,4	100	-	-
2	Вуглеводи клітинних стінок <i>B. cinerea</i>	0,04	2,1	96,0	97,2	4,0
3	Вуглеводи клітинних стінок <i>B. cinerea</i>	0,02	8,8	68,0	46,3	32,0
	HIP ₀₅		4,2	3,8	-	-

Таблица 2

Захисний ефект вуглеводів клітинних стінок *Botrytis cinerea*
проти альтернаріозу рослин томатів (Київський НДЦ, сорт Флора, 2003р.)

№ п/п	Варіант досліджу	Концентрація, %	Розвиток альтернаріозу, %				Ефективність дії, %			
			25.07	31.07	7.08	15.08	25.07	31.07	7.08	15.08
1	Контроль	-	26,7	46,7	51,1	61,7	-	-	-	-
2	Вуглеводи клітинних стінок <i>B. cinerea</i>	0,01	16,2	41,7	44,9	55,0	39,3	10,7	12,1	10,9
3	Ридоміл Голд МЦ, 2,0кг/га, з.п., (еталон)	0,4	14,4	30,0	35,5	47,5	46,1	35,8	30,5	23,0
	НІР ₀₅		3,1	4,8	3,7	5,0	-	-	-	-

Таблица 3

Вплив вуглеводів клітинних стінок *Botrytis cinerea* на урожайність
томатів та захист плодів проти альтернаріозу та фітофторозу (Київський НДЦ, сорт Флора, 2003р.)

№	Варіант досліджу	Концентрація, %	Урожайність плодів		Ураження плодів, %		Зниження ураження плодів, %	
			ц/га	% до контролю	альтернаріоз	фітофтороз	альтернаріоз	фітофтороз
1	Контроль	-	490,0	-	9,5	11,3	-	-
2	Вуглеводи клітинних стінок <i>B. cinerea</i>	0,01	500,9	102,2	6,5	5,0	31,6	55,8
3	Ридоміл Голд МЦ, 2,0кг/га, з.п., (еталон)	0,4	515,5	105,2	4,5	6,1	52,6	46,0
	НІР ₀₅		12,8	-	3,4	3,7	-	-

Джерела інформації

1. Озерецковская О. Л. и др. Известия АН СССР.серия биол. 1986, №1, с. 23-32.

2. Клыков С. А., Воловик А. С. Биологически активные вещества в борьбе с основными болезнями картофеля. //Защита растений. 1987, №10, с. 20-21.

3. Дмитриев А. П., Перковская Г. Ю. Альтернативные экологически безопасные методы защиты растений. В кн.: Аграрна освіта на початку III тисячоліття. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції. - Львів, 2001. - с. 39-47.

4. А. С. № 1311043, А01F25/00, 1985. / Дмитриев А. П., Тверской Л. А., Гродзинский Д. М. Способ хранения лука репчатого.

5. Кульнев А. И., Соколова Е. А.. Многоцелевые стимуляторы защитных реакций, роста и раз-

вития растений (на примере препарата иммуноци-тофита). - Пушине, 1997. - 100 с.

6. А. С. № UA 68663A, A01N63/00, 2004, бюл. № 8. / Перковська Г. Ю., Сергієнко В. Г., Охрімчук В.М., Дяченко А. І., Дмитрієв О. П. Спосіб підвищення стійкості рослин томатів до хвороб.

7. Г. Ю. Перковская, Ж. Н. Кравчук, Д. М. Гродзинский, А. П. Дмитриев Индукция активных форм кислорода и фитоалексинов в культуре клеток лука (*Allium* сера) биогенными элиситорами из гриба *Botrytis cinerea*. Физиология растений. 2004.- 51.- 5.- с. 680-685.

8. Крайцбург-Еггерт Д. Новый метод определения эффективности фунгицидов против фитотрофа картофеля. // Сельское хозяйство за рубежом. - 1973, № 5. - с. 54-56.