



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103397** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
A01N 37/44 (2006.01)
A01N 37/06 (2006.01)
A01P 23/00

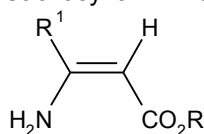
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 00451	(72) Винахідник(и): Просяник Олександр Васильович (UA), Хохлова Тетяна Віталіївна (UA), Бурмістр Михайло Васильович (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.01.2012	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ХІМІКО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ", пр. Гагаріна, 8, м. Дніпропетровськ, 49005, Україна (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.10.2013	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Критенко С.П., титов А.Ф. Влияние абсцизовой кислоты и цитокинина на синтез белка при холодной и тепловой адаптации растений // Физиология растений. - 1990. - Т. 37, № 1. - С. 126-132 UA 11665 A1, 25.12.1996 UA 27302 C2, 15.09.2000 UA 25057 C1, 25.12.1998
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.01.2013, Бюл.№ 2	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2013, Бюл.№ 19	

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПОХІДНИХ ДЕГІДРОАМІНОКИСЛОТ ЯК ЗАСОБІВ, ЩО ПІДВИЩУЮТЬ МОРОЗО- І ХОЛОДОСТІЙКІСТЬ РОСЛИН**(57) Реферат:**

Застосування похідних дегідроамінокислот загальної формули



сполуки 1-4, (I)

де: 1) R=CH₃; R¹=CO₂K; 2) R=CH₃; R¹=CONH₂; 3) R=C₂H₅; R¹=CONH₂, 4) R=C₂H₅; R¹=C₆H₄OCH₃,
як засобів, що підвищують морозо- і холодостійкість рослин.

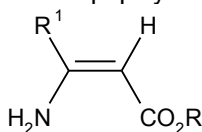
Галузь застосування - сільське господарство; засоби, що захищають рослини від несприятливих умов зростання.

Задача вирішується шляхом застосування похідних дегідроамінокислот загальної формули (I), які за механізмом дії є промоторами біосинтезу природних фітогормонів. Передпосівна обробка насіння водними розчинами цих сполук у концентраціях 10-1000 мг/л сприяє зниженню фізичного стресу рослин при негативних температурах і зменшує залежність рослинництва від погодних умов навколишнього середовища.

Винахід дозволяє підвищити врожайність сільськогосподарських культур за рахунок раннього посіву і захисту таких посівів від холоду і заморозків. Спосіб обробки - інкрустація або напіввологий.

UA 103397 C2

Винахід належить до біологічно активних сполук класу похідних дегідроамінокислот загальної формули



сполуки 1-4, (I)

де: 1) $\text{R}=\text{CH}_3$; $\text{R}^1=\text{CO}_2\text{K}$; 2) $\text{R}=\text{CH}_3$; $\text{R}^1=\text{CONH}_2$; 3) $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$; $\text{R}^1=\text{CONH}_2$; 4) $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$; $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$,

які сприяють підвищенню морозо- і холодостійкості рослин. Галузь застосування - сільське господарство; засоби, що захищають рослини від несприятливих умов зростання.

Застосовуються різні способи підвищення холодостійкості рослин: оптимізація мінерального живлення, загартовування рослин і насіння, обробка посівів і насіння речовинами, що підвищують їх холодостійкість.

Згідно з теорією загартовування, рослинам для набуття властивості морозостійкості потрібно пройти три етапи підготовки: перехід у стан спокою, першу і другу фази загартовування. Вступ у стан спокою без наступних етапів незначно підвищує морозовитривалість. Перехід у стан спокою супроводжується зміщенням балансу фітогормонів у бік зменшення вмісту ауксинів і гіберелінів і збільшення вмісту абсцизової кислоти (АБК), а обробка рослин у цей період інгібіторами росту (хлорхолінхлоридом або трийодбензойною кислотою) підвищує стійкість рослин до низьких температур [Полевой, В.В. Физиология растений [Текст]: учеб. для биол. спец. вузов / В.В. Полевой - М.: Высш. шк., 1989.-464 с].

Як препарати, що підвищують холодостійкість рослин, запропоновані кінетин, який знижує стрес цитокінінового типу (Зауралов О.А. Определение эффективности регуляторов роста для повышения холодоустойчивости теплолюбивых растений [Текст] / О.А. Зауралов // Агрохимия. - 1997. - № 2. - С. 71-75) і тидіазурон [N-феніл-N'-(1,2,3-тіадіазол-5-іл)сечовина] (Пат. №2195809 РФ, МПК А01G 7/00, А01N 47/36. Средство для повышения холодоустойчивости растений / Пугаев С.В. и др. - № 2000101798/13, заявл. 24.01.00, опубл. 10.01.03).

Недоліками цих препаратів є низька розчинність у воді, високі концентрації робочих розчинів та їх вартість.

Відоме використання як стимуляторів росту і кріопротекторів кремнійорганічних сполук - акрилоксисиланів (акрисил) (Пат. № 2085076 РФ, МПК А01N 55/10. Стимулятор роста растений и кріопротектор / Корзинников Ю.С. и др. - № 92005361/04, заявл. 10.11.92, опубл. 27.07.97) та хлорметилметилдіетоксисилану (Пат. № 2081582 РФ, МПК А01N 55/10. Средство повышения зимо-морозостойкости растений / Корзинников Ю.С. и др. - № 93005453/13, заявл. 01.02.93, опубл. 20.06.97), а також комплексних препаратів на основі поліетиленоксидів (Дьяконенко Г.Ю. Мітотична активність у проростках озимих культур після передпосівної обробки насіння агрохімічними препаратами на основі кріопротекторів [Текст]/ Г.Ю. Дьяконенко, А.М. Компанієць // Физиология растений.-2009. - Вип. 10, № 878. - С. 138-141).

Відоме використання препарату Епін Екстра (епібрасиноїду) - синтетичного аналога природного фітогормону (Будыкина Н.П. Изменение холодоустойчивости растений при обработке препаратом ЭПИН_екстра в зависимости от зонального действия температуры [Текст]/ Н.П. Будыкина, Т.Ф. Алексеева, Н.И. Хилков // Современная физиология растений: от молекул до экосистем: материалы докладов международной конференции (в трех частях.). 4.2. Стресс, адаптация и выживание растений. - Сыктывкар, 2007.-470 с). Недоліком цього класу сполук є висока вартість, неприпустимість використання лужних розчинів.

Найбільш вивчено застосування АБК як засобу підвищення стійкості рослин до дій низьких температур [Критенко С.П. Влияние абсцизовой кислоты и цитокинина на синтез белка при холодовой и тепловой адаптации растений [Текст]/ С.П. Критенко, А.Ф. Титов // Физиология растений.-1990. - Т. 37, № 1. - С. 126-132]. Абсцизова кислота, яка є одним з фітогормонів рослин, має важливе значення в адаптації рослин до стресів навколишнього середовища, таких як посуха, холод, зміна сольового балансу, так як регулює їх ріст та розвиток. Физиологічна дія АБК включає індукцію спокою, приглушення проростання, приглушення цвітіння, приглушення виходу в стрілку (розвитку квітконіжки), активацію старіння і опір стресу (наприклад, посилення холодостійкості). Відомо застосування АБК як кріопротектора, вивчено її вплив на холодове і теплове загартовування рослин, а саме на стійкість до холоду і тепла незагартованих рослин. Встановлено, що при загартовуванні рослин вміст ендогенної абсцизової кислоти значно зростає. Наприклад, при загартовуванні здатної до холодової адаптації картоплі виду *Solanum commersonii* вміст ендогенної АБК зростає в 2,5 рази [Chen, H.H. Involvement of abscisic acid in

potato cold acclimation [Text] /H.H. Chen, P.H. Li, M.L Brenner // Plant Physiol.-1983. -Vol. 71, № 2. - P. 362-365; Ryu, Stephen, B. Potato cold hardiness development and abscisic acid. I. Conjugated abscisic acid is not the source of the increase in free abscisic acid during potato (*Solanum commersonii*) cold acclimation [Text] / Stephen B. Ryu, Paul H. Li // Physiologia Plantarum.-1994.- Vol. 90. - P. 15-20]. У мутанта арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), з низьким вмістом ендогенної АБК, у порівнянні з диким типом була відсутня або різко знижена здатність до холодової адаптації [Gilmour, S.J. Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana* [Text] / S.J. Gilmour, M.F Thomashow // Plant and Mol. Biol.-1991. -Vol. 17, № 1. - P. 1233-1240]. В той же час екзогенна обробка цього мутанта абсцизовою кислотою приводила до появи ефекту адаптації рослин до холоду [Heino, P., Sandman G., Lang V. Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh [Text] / P. Heino, G. Sandman, V. Lang. // Theor. and Appl. Genet.-1990-V. 79. - P. 801-806; Mantyla, E. Role of Abscisic Acid in Drought-Induced Freezing Tolerance, Cold Acclimation, and Accumulation of LT178 and RAB18 Proteins in *Arabidopsis thaliana* [Text] / E. Mantyla, V. Lang, and E.T. Palva // Plant Physiol.-1995. - Vol. 107, № 1. - P. 141-148]. При цьому був показаний взаємозв'язок між експресією регульованих холодом і регульованих абсцизовою кислотою генів [Koornneef M., Hanhart C.J., Hilhorst H.W.M., Karssen C.M. In vivo inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants of *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. 1989. V. 90, N 2. P. 463-469]. Аналогічні результати були одержані і при вивченні інших видів рослин. Таким чином, абсцизова кислота має важливе значення у регуляції холодо- і морозовитривалості рослин.

Недоліком застосування АБК в рослинництві є використання лужних розчинів, у зв'язку з тим, що вона погано розчиняється у воді, а також складність технології її одержання і висока вартість.

В основу винаходу поставлена задача розширення асортименту сполук, що здатні захищати рослини від дії низьких температур. При застосуванні цих хімічних препаратів підвищується схожість насіння, збільшується кількість і якість рослин, що перезимували у польових умовах, і, відповідно врожайність.

Задача вирішується шляхом застосування похідних дегідроамінокислот загальної формули (I), які за механізмом дії є промоторами біосинтезу природних фітогормонів. Передпосівна обробка насіння водними розчинами цих сполук у концентраціях 10-1000 мг/л сприяє зниженню фізичного стресу рослин при негативних температурах і зменшує залежність рослинництва від погодних умов навколишнього середовища.

Як регулятори росту рослин використовують похідні дегідроамінокислот формули (I). Відоме використання:

- Z-ізомеру Калієвої солі 2-аміно-3-метоксикарбонілакрилової кислоти (препарат 1), який одержують омиленням диметилового естеру амінофумарової кислоти калію гідроксидом (Пат. 11665 Україна, МПК C07C 229/30 A01N 33/08, A01P 21/00 Калієва сіль z-(alpha-аміно-beta-метоксикарбоніл) акрилової кислоти як ростостимулюючий засіб при пророщенні насіння пшениці та огірків / Просяник О.В. та інші. - № 4766770/SU, заявл. 20.10.89; опубл. 25.12.96. Бюл. № 4);

- Z-ізомеру амідів 2-аміно-3-метоксикарбонілакрилової кислоти (препарат 2) та Z-ізомеру амідів 2-аміно-3-етоксикарбонілакрилової кислоти (препарат 3), які одержують амонілізом диметилового і діетилового естерів амінофумарової кислоти, відповідно (Пат. 27302 Україна. МПК A01N 33/08, A01N 33/06, C07C 69/60, C07C 69/657. Засіб для підвищення врожайності картоплі / Просяник О.В. та інші. - № 5013009, заявл. 15.10.91; опубл. 15.09.00. Бюл. №4);

- етилового естеру п-метокси-3-амінокоричної кислоти (препарат 4), який одержують взаємодією п-метоксифенілмагнію броміду з ціаноцтовим естером з подальшим розкладанням амонію хлоргідратом (Пат. 25057 Україна, МПК A01N 37/02. Стимулятори розвитку кореневої системи рослин / Просяник О.В. та інші. - № 93007575, заявл. 29.10.93; опубл. 25.12.98. Бюл. № 6).

Винахід ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Вивчення впливу похідних дегідроамінокислот на стійкість рослин до заморозків.

Методика дослідів. Насіння кукурудзи і сої розміщують в чашки Петрі, обробляють робочими розчинами препарату 1 і АБК відповідних концентрацій (кількість робочих розчинів становить 25-30 % від маси насіння) і витримують протягом 8 годин - для кукурудзи і 2 годин - для сої. Після цього насіння висушують спочатку на фільтрувальному папері, потім протягом 15 годин у сушильній шафі при активному вентиляванні і температурі +20 °С. Висушене насіння висівають у вегетаційні посудини на глибину, прийнятну для даної культури. Склад ґрунтового субстрату: ґрунт - фракція до 3 мм, пісок - фракція 0,2-2 мм, торф у співвідношенні 2:1:1.

У кліматичній камері підтримують наступний температурний режим: день/ніч - +24 °C/+18 °C. На 10-й день після сходів температуру повітря знижують до -2 °C, -4 °C, -8 °C зі швидкістю від +18 °C до 0 °C-4 години, від 0 °C до -2 °C-2 години, від -2 °C до -4 °C-3 години, від -4 °C до -8 °C-4 години. Тривалість впливу облікової температури - 2 години. Повторність досліду триразова.

5 Результати дослідів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив препарату 1 на стійкість рослин до заморозків в % (де % - кількість відсотків рослин, що збереглися після обробки холодом)

Культура	Температура, Т°С	Концентрація діючої речовини, мг/л					
		10	10	100	100	1000	1000
		АБК (прототип)	Препарат 1	АБК (прототип)	Препарат 1	АБК (прототип)	Препарат 1
		Стійкість рослин до заморозків, в %					
Кукурудза	-2	91,5	97,8	100	100	100	100
	-4	34,8	46,7	68,8	89,3	34,0	95,8
	-8	0	12,50	0	15,6	0	21,2
Соя	-2	100	100	100	100	100	100
	-4	88,9	86,1	94,3	91,2	95,0	96,1
	-8	0	0	56,3	57,6	37,5	26,8

Контроль - АБК лужний, P_H=11

Дані дослідів показують, що препарат 1 забезпечує додатковий приріст стійкості рослин до низьких температур до 60 % і за своєю ефективністю перевершує дію АБК (найближчий аналог)

10 на кукурудзі і однаково з АБК впливає на сою.

Приклад 2. Вивчення впливу похідних дегідроамінокислот на схожість і ефективність проростання насіння огірків сорту "Конкурент".

Методика дослідів. Насіння огірків сорту "Конкурент" у кількості 25 штук замочують на 18-20 годин в розчинах препаратів 1-4 концентрацією 1 мг/л. Потім розкладають у чашки Петрі і ставлять в холодильну камеру при температурі нижче біологічного мінімуму. На відповідний день згідно з Міжнародними правилами аналізу насіння визначають схожість. Далі насіння витримують при температурі біологічного оптимуму і в відповідні строки аналізують схожість. Результати дослідів наведені в таблиці 2.

15

Таблиця 2

Вплив препаратів на схожість насіння огірків сорту "Конкурент"

Варіант дослідів	Температура проростання									
	8 °C		10 °C		25 °C					
	кількість	%	кількість	%	на 3 день		на 6 день		на 16 день	
	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%
Препарат 1	0	0	0,3	1,2	9,1	36,4	22,6	90,7	20,3	81,0
Препарат 2	0	0	1	4,0	8,0	32,0	24,0	95,0	25,0	100,0
Препарат 3	0	0	2	8,0	9,0	36,0	21,3	85,0	22,3	89,3
Препарат 4	0	0	0,3	1,2	8,8	35,2	21,0	84,0	23,0	92,0
АБК	0	0	0,8	3,2	7,0	28,0	19,2	76,8	20,5	82,0
Контроль	0	0	0,4	1,6	2,0	8,0	16,3	65,2	16,0	64,0

20

Таким чином, в результаті попереднього холодого загартовування насіння огірків сорту "Конкурент" спостерігається підвищення польової схожості на 20-30 % у порівнянні з контролем. Крім того, при подальшій культивуванні тенденція перевищення контролю зберігається.

5 Приклад 3. Вивчення впливу препарату 1 на збільшення врожайності кукурудзи при ранніх строках посіву.

Методика експерименту. Дослід закладено методом рандомізованих блоків. Повторність - чотириразова, площа ділянки 10 м².

10 Препаратом 1 оброблено насіння середньостиглого гібрида кукурудзи сорту "Ювілейний 60". Препарат наносять на насіння напіввологим методом (н.в.) і інкрустацією (і). Плівкоутворювач - 2 % розчин NaKMЦ. Концентрація робочих розчинів – 1 мг/л. Результати дослідів наведені в таблиці 3.

Таблиця 3

Вплив препарату 1 на врожайність кукурудзи сорту "Ювілейний 60"

Варіант дослідів	Врожайність		Густота	стояння
	ц/га	% до контролю	тис/га	% до контролю
АБК	82,8	100	34500	100
Препарат 1	103,8	126,5	46000	133,3

15 При використанні препарату 1 як засобу для підвищення холодостійкості рослин врожайність кукурудзи зростає на 26 ц/га в порівнянні з АБК.

Таким чином, що при ранніх строках посіву прибавка врожайності формується за рахунок густоти стояння рослин, що підтверджує ефект холодопротекції. Однак необхідно відзначити, що проявлення цього ефекту в великій мірі залежить від генотипу культури.

20 Приклад 4. Вивчення впливу препарату 3 на поліпшення посівних якостей сої при ранніх строках посіву (температура ґрунту + 8 °С).

Методика дослідів. Насіння сої сорту "Білосніжка" перед посадкою обробляють водними розчинами препарату 3 напіввологим способом. Результати дослідів наведені в таблицях 4, 5.

Таблиця 4

Вплив препарату 3 на польову схожість і густоту стояння сої сорту "Білосніжка"

Варіант дослідів	Конц. (ДВ, %).	Лабораторна схожість, %	Польова схожість, %	Густота стояння, шт/м ²	Тривалість вегетаційного періоду, днів
Препарат 3	0,001	99,7	67,7	46,2	129
	0,01	99,5	68,0	45,4	129
	0,1	99,2	72,8	43,0	129
Контроль (без обробки)		96,2	66,3	44,0	135

25

Таблиця 5

Вплив препарату 3 на врожайність сої сорту "Білосніжка"

Варіант дослідів	Варіант обробки (конц. ДВ %)	Врожайність зерна		Кількість бобів на одну рослину		Кількість зерен на одній рослині		Маса зерна на одній рослині	
		ц/га	% до контролю	шт.	% до контролю	шт.		шт.	% до контролю
Препарат 3	0,001	17,8	132,8	15,3	102	26,8		4,2	120
	0,01	17,5	130,6	16,2	108	29,5		4,2	120
	0,1	18,4	137,3	14,4	96	26,4		3,8	109
Контроль (без обробки)		13,4	100	15,0	100	27,0		3,5	100

Встановлено, що передпосівна обробка насіння сої препаратом 3 при ранніх строках посіву дозволяє підвищити польову схожість на 5 %, що приводить до збільшення густоти стояння і, як наслідок, у цілому до збільшення врожайності на 30-37 %. Крім того, тривалість вегетаційного періоду скорочується на 6 днів.

Таким чином, виявлений ефект холодопротекторної дії препарату 3 з наступним позитивним впливом на врожайність середньоранніх гібридів кукурудзи і сої при ранніх строках посіву.

Приклад 5. Вивчення стійкості паростків озимого ячменю до дії особливо низьких температур.

Методика досліджу. Насіння озимого ячменю обробляють розчином препарату 1.

Встановлено, що короточасний вплив температури $-40^{\circ}\text{C} \div -42^{\circ}\text{C}$ на паростки озимого ячменю підвищує його врожайність за рахунок збільшення кількості перезимованих рослин. При цьому врожайність зростає на 15 %. Результати дослідів наведені в таблиці 6.

Таблиця 6

Вплив препарату 1 на врожайність озимого ячменю

Варіант досліджу	Варіант обробки (конц. ДВ %)	Врожайність	
		ц/га	% до контролю
Препарат 1	0,001	76,8	115,5
АБК	0,001	69,5	104,5
Контроль (без обробки)		66,5	100

Застосування даних препаратів шляхом передпосівної обробки насіння сприяє зниженню фізичного стресу рослин, який вони одержують при знижених температурах, і зменшує залежність рослинництва від погодних умов навколишнього середовища.

Винахід дозволяє підвищити врожайність сільськогосподарських культур за рахунок раннього посіву і захисту таких посівів від холоду і заморозків. Спосіб обробки - інкрустація або напіввологий.

Позитивний ефект досягається за рахунок підвищення стійкості ранніх сходів до впливу низьких температур, збільшення кількості і якості перезимованих у польових умовах рослин, що в цілому приводить до збільшення врожаю і скороченню строків вегетаційного періоду. Крім того, для овочевих культур, що вирощуються у закритих ґрунтах, застосування даних сполук дозволить прискорити ранні сходи та зменшити енергозатрати.

Ефективність дії винаходу встановлено при обробці водними розчинами препаратів насіння сої, кукурудзи, пшениці, ячменю і огірків.

Токсикологічні дослідження похідних дегідроамінокислот показали, що даний клас сполук при однократному надходженні в організм теплокровних належать до малотоксичних речовин.

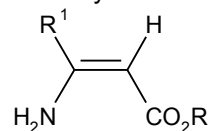
При вивченні гострої токсичності встановлено, що при однократному надходженні в організм теплокровних препарати є малотоксичним. LD_{50} для мишей і пацюків становить > 1000 мл/кг.

У концентраціях нижче 10 % препарат не виявляє подразливої дії на шкіру і слизову оболонку ока.

Винахід має практичне значення і може бути застосований в сільському господарстві для захисту рослин від дії низьких температур.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування похідних дегідроамінокислот загальної формули



сполуки 1-4, (I)

де: 1) $\text{R}=\text{CH}_3$; $\text{R}^1=\text{CO}_2\text{K}$; 2) $\text{R}=\text{CH}_3$; $\text{R}^1=\text{CONH}_2$; 3) $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$; $\text{R}^1=\text{CONH}_2$; 4) $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$; $\text{R}^1=\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$, як засобів, що підвищують морозо- і холодостійкість рослин.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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