



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 82486

(13) C2

(51) МПК (2006)

A01N 65/00

A01N 25/02

C12N 1/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) КОМПОЗИЦІЯ, ЯКА МІСТИТЬ РЕГУЛЯТОРИ РОСТУ РОСЛИН, ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ПОСИЛЕННЯ РОСТУ І РОЗВИТКУ РОСЛИН

1

(21) a200501224
(22) 16.07.2003
(24) 25.04.2008
(86) PCT/US2003/022308, 16.07.2003
(31) 60/396,833
(32) 16.07.2002
(33) US
(46) 25.04.2008, Бюл.№ 8, 2008 р.
(72) ХІРОМОТО БРАЯН ТОКУІШІ
(73) ЕЙ.БІ.АР, ЛЛС
(56) JP2104278, 17.04.1990
JP53069826, 21.06.1978
DATABASE WPI Section Ch, Week 199021 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1990-161268 XP002342193 & JP 02 104278 A (YAMAZAKI S) 17 April 1990 (1990-04-17)
DATABASE WPI Section Ch, Week 197830 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C03, AN 1978-54390A XP002342194 & JP 53 069826 A (IIZUKA KENKYUSHO KK) 21 June 1978 (1978-06-21)
DATABASE WPI Section Ch, Week 198020 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C03, AN 1980-35225C XP002342195 & JP 55 045365 A (NODA SHOKUKIN KOGYO CO LTD) 31 March 1980 (1980-03-31)
(57) 1. Композиція, яка містить регулятори росту рослин, яка являє собою стерилізований фільтрат культури, відновлений з міцелію гриба *Laetiporus*, інкубованого у середовищі, яке містить принаймні 10 % наявних вуглеводнів, і має значення BRIC 12-15, за наявності світла з довжиною хвиль приблизно 500-800 нм і в умовах аерування, при якому міцелієва підкладка залишається неушкодженою, де таке середовище додатково містить щонайменше 0,005-0,1 % мас./об. іонів калію і каротин у кількості, достатній для забезпечення жовтого забарвлення, і де такий фільтрат являє собою рідку фракцію такої культури, з якої були денатуровані і видалені протеїни, і який необов'язково висушується.
2. Композиція за п. 1, де таке середовище містить мелясу і/або сироп або сік папай або ананаса.
3. Спосіб одержання композиції за п. 1, який полягає в інкубуванні міцелію гриба *Laetiporus* у середовищі, яке містить принаймні 10 % наявних вуг-

2

леводнів, і має значення BRIC 12-15, за наявності світла з довжиною хвиль приблизно 500-800 нм і в умовах аерування, при якому міцелієва підкладка залишається неушкодженою, де таке середовище додатково містить каротин у кількості, достатній для забезпечення жовтого забарвлення, і щонайменше 0,005-0,1 % мас./об. іонів калію, у відновленні фільтрату культури, денатуруванні розчинних протеїнів у фільтраті і видаленні таких денатурованих протеїнів, а також у стерилізації та необов'язковому висушуванні залишкового фільтрату культури з одержанням такої композиції.
4. Спосіб за п. 3, в якому денатуровані білки видаляють фільтруванням.
5. Спосіб за п. 3, в якому стерилізацію здійснюють пастеризацією.
6. Склад для застосування з метою посилення росту і/або розвитку рослин, який містить ефективну кількість необов'язково висушеної композиції за будь-яким з пп. 1, 2, розведеної для застосування на зернових культурах або деревах.
7. Склад за п. 6, який додатково містить принаймні один пестицид і/або щонайменше один підживлювач для рослин, і/або принаймні один гербіцид.
8. Склад за п. 6, який додатково містить принаймні один еліситор вироблення фітоалексину.
9. Склад для застосування з метою посилення росту і/або розвитку рослин, який містить композицію за будь-яким з пп. 1, 2, висушену на діатомовій землі або частинках добрива.
10. Спосіб посилення росту або розвитку рослин, в якому принаймні частину рослини обробляють складом за будь-яким з пп. 6-9.
11. Спосіб посилення росту або розвитку рослин, в якому насіння обробляють складом за будь-яким з пп. 6-9.
12. Спосіб за п. 10, який полягає у тому, що принаймні частину рослини додатково обробляють принаймні одним пестицидом і/або принаймні одним підживлювачем, і/або принаймні одним гербіцидом.
13. Спосіб за п. 11, який полягає у тому, що насіння додатково обробляють принаймні одним пестицидом і/або принаймні одним підживлювачем, і/або принаймні одним гербіцидом.

(13) C2

(11) 82486

(19) UA

У цій заявці заявлено пріоритет згідно з [§119(e) 35 Кодексу США на основі попередньої заявки серійний номер 60/396,833, поданої 16 липня 2002 року], зміст якої повністю включений до цієї заявки.

Винахід стосується композиції, яка посилює ріст і якісні показники продовольчих та декоративних культур. Зокрема, винахід стосується стерилізованого фільтрату, який одержують компостуванням середовища з високим вмістом цукрози, переважно з сільськогосподарських відходів.

У минулому застосовувався ряд підходів до підвищення урожайності продовольчих культур, включно з використанням добрив в якості підживлювальних добавок, застосуванням пестицидів для протидії негативним наслідкам зараження паразитами, а також додаванням гормонів росту, таких як ауксини і гіберелові кислоти. У випадку кожного із названих підходів, особливо у випадку застосування синтетичних матеріалів, виникають проблеми з небажаними змінами навколишнього середовища і одночасним дисбалансом екосистеми.

Відомо, що регулятори росту виробляються деякими грибами. Наприклад, гібереліни, індолацетова кислота, цитокіни та інші сполуки, які мають властивості регуляторів росту, описуються в [Basidiomycetes в редакції Brizuela, M.A., та ін., Revista Ibero Americana de Mycologia (1998) 15: 69-74]. Регулятор росту рослин дигідроампуліцин виробляється грибом *Ampulliferina* [Kimura, Y., et al., Bioscience Biotech. & Biochem. (1993) 57: 687-688]. При цьому також відомо, що *Neurospora* і різні фітопатогенні гриби виробляють регулятори росту рослин. Також відомо, що *Polyporus versicolor*, білий трутовик, виробляє регулятори росту рослин. Однак, умови для посилення вироблення факторів росту рослин різняться значною мірою.

Було доведено, що базидіоміцети виробляють гібереліни, ауксини, індолацетову кислоту, абсцизинову кислоту, цитокініни і етилен, а також інші метаболіти-стимулятори росту рослин. Однак, продукування цих факторів висвітлювалося або в контексті їх продукування у зв'язку з рослиною *per se*, або ж у контексті маломасштабних лабораторних досліджень.

Цей винахід стосується способу одержання факторів росту рослин з грибів, окрема грибів класу *Basidiomycetes*, на промисловому рівні. Загалом, до цього часу це вважалося неможливим. Наприклад, [у підручнику "Прикладна мікологія" ("Handbook of Applied Mycology", Vol.4, Fungal Biotechnology (1992)) на сторінці 588] сказано:

"Цікаво зауважити, що види *Taphrina* і *Ehobasidium* утворювали дріжджеподібні клітини і спори на шарах поверхні тканини рослини-хазяїна, зараженої паразитами. В умовах вирощування в ході процесу ферментації (SMF) занурюванням в синтетичне середовище продукування цитокіну такими грибами було дуже незначним, щоб викли-

кати значні морфологічні зміни, які виникають у рослині-хазяїні природним шляхом, незважаючи на вирощування в ферментному середовищі у формі дріжджеподібних клітин. У зв'язку з цим зауважувалось, що продукування цитокіну патогенними гіфальними клітинами *Taphrina*, які ростуть на тканинах-хазяях, без сумніву, було різним за кількістю. Значна подібність вищезазначеного типу росту гриба на тканині-хазяїні до росту гриба в умовах застосування методики твердого ферментування є добре відомою."

Крім того, відповідно до зазначеного джерела:

"Очевидно, що гриби-паразити, мікоризальні гриби, аскоміцети і базидіоміцети не мають потенціалу продукувати цитокін під дією ферментів внаслідок проблем, пов'язаних з культивуванням і повільним темпом росту.

Технологія виготовлення і виділення цільового продукту полягає у застосуванні великих об'ємів рідини для виділення дуже незначних об'ємів GA3 (гіберелінової кислоти 3), а отже така технологія є високозатратною порівняно з технологіями ферментування, що застосовуються для одержання інших продуктів, таких як лимонна або глюконова кислоти.

Після сепарації міцеліальних клітин фільтруванням або центрифугуванням гіберелінову кислоту 3 абсорбують з допомогою придатних смол/абсорбентів або екстрагують у придатних розчинниках. Додаткове очищення включає ряд таких операцій, як повторне розділення "рідина-рідина", концентрація у вакуумі і остаточна обробка для одержання гіберелінової кислоти 3 у вигляді аморфного порошку або кристалів."

Таким чином, хоча й відомо, що деякі паразитарні гриби можуть виробляти регулятори росту рослин, вони не можуть виробляти такі регулятори у ферментній системі у кількості, достатній для практичного застосування за винятком випадків, якщо будуть здійснені культивування, екстрагування і концентрування.

Нами було виявлено, що нешкідливий для навколишнього середовища стимулятор росту може бути одержаний компостуванням сільськогосподарських відходів у присутності міцелію, стерилізацією фільтрату культури і застосуванням одержаного фактора у вигляді рідкого компосту (LCF) безпосередньо на польових культурах, навіть у розведеному вигляді при розведенні водою у співвідношенні 1 до 500 або до 1:10000. Для одержання придатного розчину не потрібно проводити екстрагування або хімічну сепарацію. Існує потреба лише у фільтруванні і нагріванні. Для екстрагування або концентрації не потрібно використовувати розчинники або шари смол. Тверді речовини і сам фільтрувальний матеріал, що використовувались на стадії фільтрації нагрітої рідкої культури можуть висушуватись і також використовуватись як джерело стимуляторів росту рослин. Такий висушений матеріал може додаватися до компосту в якості добавки.

Винахід стосується композиції для стимулювання швидкого кореневого росту і розвитку рослин, а також для підвищення врожайності польових культур, дерев і інших рослин, яка включає пастеризований фільтрат культури міцелію, вирощуваного переважно на основі сільськогосподарських відходів, але у будь-якому випадку у середовищі з високою концентрацією вуглеводнів. Одержаний фактор у вигляді рідкого компосту (LCF) може застосовуватись різними способами щодо ряду культур для підвищення темпів росту і врожайності.

Таким чином, винахід стосується способу одержання рослинної добавки, який полягає у тому, що міцелій культивують у середовищі, концентрація вуглеводнів в якому становить принаймні 10% за наявності світла, аерують в умовах, при яких міцелієва підкладинка залишається неушкодженою, культуру збирають, денатурують протеїн, видаляють тверді продукти і пастеризують або іншим способом стерилізують фільтрат для одержання згаданої композиції. Відповідно до іншого аспекту винахід стосується композиції, одержаної таким способом. Таким чином, композиція згідно з винаходом включає стерилізований фільтрат міцелію, вирощеного в середовищі з високим вмістом вуглеводнів, яке переважно складається з сільськогосподарських відходів. Відповідно до ще одного аспекту винахід стосується способів покращення темпів росту рослин і їх врожайності шляхом застосування такої композиції або окремо, або у поєднанні з іншими промоторами росту рослин. Таким чином, цей винахід також стосується способів культивування рослин, всяких застосовують композиції згідно з винаходом або окремо, або у поєднанні з, наприклад, гербіцидами, інсектицидами, нематодіцидами або іншими стимуляторами росту чи підживлювачами.

Приклади реалізації винаходу

Цей винахід стосується нешкідливої для навколишнього середовища стимулюючої ріст рослин композиції, яка позначається як "фактор росту у вигляді рідкого компосту" (LCF). LCF є стерилізованим фільтратом міцелію, який був вирощений в певних умовах і в середовищі з високим вмістом вуглеводнів. Композиції згідно з винаходом включають стерилізований фільтрат міцелію, а також його висушені форми, або ж відновлені тверді форми. Як правило, будь-яку таку композицію розводять у водному розчині. Одержаний розведений LCF, нанесений на продовольчі культури, такі як кукурудза, таро, салат, сою, огірок, помідор, ананас та інші продовольчі культури має здатність стимулювати кореневий ріст, підвищувати плодоносіння і покращувати врожайність. Було доведено, що LCF усуває симптоми зараження нематодами у рослин, що прийняли, і сприяє зниженню прояву симптомів захворювань, таких як плямистість листя, викликана грибами, гниття листя і загивання кореневої системи під дією бактерій. LCF також може використовуватись для продовження строку зберігання квітів і листя після зрізу. LCF також має здатність пришвидшувати ріст дерев, завдяки чому він, наприклад, сприяє відновленню лісонасаджень.

LCF згідно з винаходом містить регулятори росту рослин, які є вторинними метаболітами грибною культури, а також мають здатність стимулювати прояв захисних механізмів у рослин. Продуктування таких регуляторів росту рослин залежить від відповідних умов культивування, від складу відповідного середовища росту, а також від відповідної обробки, яку застосовують після культивування. Використовуване середовище повинно містити достатню кількість вуглеводнів і достатню кількість іонів калію для того, щоб відповідні прекурсори могли впливати на метаболічне продукування регуляторів росту рослин. Меласа містить приблизно від 2 до 6% калію, а тому є переважним, нешкідливим для навколишнього середовища джерелом, хоча також можуть використовуватись інша сировина, така як банани, картопля, сливи, помаранчі, помідори, артишоки, гарбузові культури, виноград, соняшник, шпинат, насіння або мигдаль. Кінцева концентрація K^+ має становити від 0,005% до 0,1% мас./об., переважно від 0,01% до 0,1% мас./об.

Загалом чим, вищим є вміст вуглеводнів, тим більш ефективним є продукування регуляторів росту рослин. Однак, занадто висока концентрація вуглеводнів у вигляді цукрозу може небажаним чином підвищити осмотичний тиск, а відтак уповільнити або взагалі зупинити ріст грибів. Інші фактори, які посилюють продукування регуляторів росту рослин у готовому продукті, включають ріст в умовах аерування, при якому міцелієва підкладинка залишається неушкодженою, та при наявності світла, переважно в тій частині видимого спектру, в якій довжині хвиль є значною. Умови освітлення, придатні для цієї культури, взяті із [патенту США 5,123,203], зміст якого входить до об'єму цього винаходу. Завдяки додаванню каротиноїдного пігменту та зниженню кількості Ca^{+2} у субстраті плодів, перевагу надавали джерелам червоного світла. Таким чином, продукування регуляторів росту рослин також посилюється завдяки додаванню каротину до середовища у кількості, достатній для одержання жовтого кольору. Якщо в якості джерела вуглеводнів використовують ананасовий сік, то цим забезпечується достатній вміст каротину.

Середовище культури має концентрацію цукру, що відповідає вмісту 5-10% меласи. Хоча для одержання середовища можуть використовуватись сільськогосподарські відходи, можуть використовуватись будь-які придатні вуглеводні та інші необхідні живильні речовини, включно з каротином. Частина поживних речовин може постачатись самим міцелієм, який одержують внаслідок культивування грибів у присутності злакових та інших поживних речовин. Таким чином, необхідний вміст цукрозу може бути забезпечений завдяки використанню сиропів, одержаних з різної сировини, включно з різними фруктовими сиропами, кукурудзяним сиропом, сиропом з цукрової тростини, сиропом з цукрового буряка, меласою і подібними. Також можуть використовуватись сиропи, одержані з інших фруктів, таких як ананас, помаранч, слива, виноград, папайя і багато інших. Перевагу віддають використанню рослинних екстрактів в якості джерела живлення для середовища.

Таке середовище повинне мати вміст наявних вуглеводнів, вищий від того, який використовують при вирощуванні грибів. Під "наявними вуглеводнями" маються на увазі джерела енергії вуглеводнів, які метаболізуються грибною культурою. Типові складники таких вуглеводневих джерел включають цукрозу, глюкозу, інші прості цукри і дисахариди. Як правило, середовище містить приблизно від 10% мас/об. Наявних вуглеводнів, переважно 12% мас/об, більш переважно 13% мас/об., і навіть більш переважно 15% мас./об. Як альтернатива, в результаті досягнення кінцевої концентрації у середовищі дані зчитування BRIC становлять 10, більш переважно принаймні 12, найбільш переважно принаймні 15. Велика перевага віддається високим концентраціям наявних вуглеводнів і, як зазначалося вище, обмеження полягає лише у тому, що потрібно уникати створення неприйнятно високого осмотичного тиску. Оскільки гриби здатні переробляти целюлозу, підвищення рівнів вуглеводнів може переважно забезпечуватись за рахунок використання целюлози або іншого вуглеводню, який не підвищує осмотичного тиску.

Як показує практика, оптимальні показники BRIC для культури середовища є 12 - 15. Для однієї із типових культур показники BRIC вище 19, наприклад 24 або 30, мало наслідком або дуже повільний ріст або відсутність росту як такого. При BRIC 19 міцелій покривав поверхню середовища, але лише тонкою плівкою; при BRIC 11 і BRIC 8 досягають дуже гарних показників росту. Однак, при BRIC нижче 11 вміст регулятора росту рослин був нижчим.

Окрім наявного вуглеводню в якості джерела вуглецю, середовище також повинне містити інші поживні речовини, у першу чергу джерела азоту і різні кофактори. Як правило, достатня кількість більшості з таких поживних речовин міститься у міцелії, який використовують для інокуляту. Однак, схоже на те, що важливим є достатній вміст каротину, який забезпечує видимий жовтий колір, у середовищі.

Якщо в якості наявних вуглеводнів хоча б частково використовують мелясу, вона сама є джерелом багатьох вітамінів та інших поживних речовин, які потрібні грибам. Перевагу віддають сиропам з цукрової тростини порівняно з сиропами з цукрового буряка, оскільки вони забезпечують кращий запас поживних речовин. Інші джерела необхідних поживних речовин одержують за рахунок використання бананів для забезпечення калієвих іонів, також корисною добавкою до такого середовища є папайя. Папайя містить каротиноїди, цукрози і сірчані сполуки. В ній особливо високий вміст фруктози.

Середовище спочатку стерилізують, переважно нагріванням до достатньої температури протягом достатнього проміжку часу для видалення будь-яких забруднюючих організмів. Після цього очищене середовище засівають культурою гриба, а саме міцелієм.

Згідно з винаходом може використовуватись будь-який гриб, за умови, що він може використовуватись в описаних тут методиках культивування.

Тоді як говорилося про затіть багатьох грибів виробляти регулятори росту рослин, як правило, це було не так у випадку комерційного або практичного одержання таких сполук.

Культивування грибів, які можуть використовуватись для одержання композицій, що містять фактор росту рослин у вигляді рідкого компосту (LCF) згідно з винаходом, може здійснюватись ефективним способом з використанням доступного обладнання. Тоді як використовують барабани з нержавіючої сталі, останні є дорогими і, за винятком випадків, коли така нержавіюча сталь спеціально виготовлена як корозійно стійка, під час ферментації можуть виникнути проблеми з корозією. Тому перевага надається скляним або пластиковим контейнерам. Було виявлено, що найзручніше вирощувати гриби у прозорих пластикових барабанах об'ємом 55 галонів, в яких в якості корка використовують бавовняну пробку. Внутрішню поверхню стінок барабанів або інших контейнерів перед використанням спочатку очищають, наприклад, з допомогою розведеного розчину йоду.

Переважними грибами, які використовуються згідно з винаходом, є гриби Basidiomycetes (базидіоміцети), а саме клас грибів, який в природі співіснує з рослинами, і ріст якого залежить від них. Basidiomycetes можуть бути пористими або перепончатими, при цьому в методиці згідно з винаходом віддають перевагу використанню в якості вирощуваних міцеліїв пористі гриби, зокрема гриби сімейства Polyporaceae. Polyporaceae загалом можуть класифікуватись як такі, що утворюють види коричневих або білих гнильних грибів. Коричневі гнильні гриби розкладають білу целюлозу деревини, на якій вони ростуть, таким чином залишаючи коричневий лігнін. Білі гнильні гриби зумовлюють протилежне - вони розкладають лігнін і залишають білу целюлозу. Таким чином, переважними грибами, які використовуються згідно з винаходом, є коричневі гнильні гриби Polyporus, і зокрема гриби родини Bridgeporus, Ceriporia, Daedalea, Laetiporus, Oligoporus і Pycnoporellus.

Таким чином, у відповідних необхідних умовах культивування можуть використовуватись різні члени класу Basidiomycete, але переважно гриби родини Polyporus, і зокрема ті, що відносяться до типу коричневих гнильних грибів.

Особливо переважним грибом, який використовується згідно з винаходом, є Laetiporus, зокрема Laetiporus sulphureus. Laetiporus sulphureus (трутовик сірчано-жовтий) є паразитом, що росте на уражених ділянках твердих порід дерев. Його часто можна зустріти на Гаваях на Eucalyptus robusta. Оскільки такий гриб живе всередині деревини, його не видно ззовні. Визріле тіло гриба з'являється у вигляді „скоб“ сірчаного або оранжевого кольору раз у кожні кілька років. Гриби живляться ядром деревини і виробляють об'ємну коричневу гниль зсередини, оскільки після розчинення целюлози і геміцелюлози під дією ферментів залишається лігнін. Дерево гине через багато років після первинного зараження. Здатність цього гриба контролювати ріст дерева-хазяїна раніше в опублікованих джерелах не відзначалася, також з цим грибом не був пов'язаний будь-який матеріал,

що стимулює ріст рослин. У рідкій грибній культурі з контрольованим ростом згідно з винаходом, такі фактори росту рослин виробляються у значних кількостях і доведено, що вони впливають на ріст рослин поза хазяїном. Як описується у цій заявці, для використання матеріалу, що стимулює ріст рослин, нагріванням рідини руйнують ферменти, які розкладають тканину. Матеріал стимулятора росту витримує температуру в 100°C.

Було показано, що рідина, яка містить культуру гриба *L. sulphureus*, стимулює проростання насіння кукурудзи, сої, листового салату, квасолі, злакових і трав'яних культур. Було доведено, що спрей для листя має вплив на ананаси, каву, помідори, таро, цукрову тростину та інші культури. Зазвичай цей гриб впливає на ріст евкаліпта заввишки 100 футів з тонами біомаси. Стимулюючий ефект помітний також на менших рослинах за умов належного розведення. Рідину, що містить культуру, можна розводити у відношенні 1:3000, наприклад водою, і вона не втрапить своєї ефективності. В природі гриби *Laetiporus* балансують вироблення різних регуляторів росту рослин для стимулювання росту великого дерева-хазяїна з масивним стовбуром і кореневою системою. Цей баланс застосовується відносно менших рослин та дерев з досягненням бажаних ефектів.

Таким чином, міцелій переважно включає *Basidiomycete*, більш переважно коричневий гнильний *Basidiomycete* і більш переважно гриб *Laetiporus*, які вирощують за придатних умов відповідно до вибраного організму гриба. Живильне середовище для гриба містить придатні компоненти, які спеціально підбираються для конкретного гриба, але, звичайно ж, завжди має містити джерело вуглецю, джерело азоту і відповідні вітаміни і кофактори. Грибницю одержують культивуванням упродовж відповідного проміжку часу, достатнього для одержання достатньої кількості грибною інкуляту, що дозволить утворитись міцелієвій підкладинці у середовищі культури згідно з винаходом. Зазвичай час формування міцелію із вихідного інкуляту становить від 5 до 100 днів.

Наявний на ринку рідкий міцелій, що використовується у цьому винаході, може бути одержаний від Kukui Spawn Co., у минулому Maui Shiitake Trading Company, обидві на о. Мауї.

Після цього рідкий міцелій використовують для засівання середовища культури з метою одержання LCF. інкульоване середовище культури культивують без перемішування у присутності світла, переважно у довгій частині видимого спектра, при температурі 15-37°C, переважно приблизно 20°C протягом проміжку часу, достатнього для генерування необхідних рівнів регуляторів росту рослин. Як правило, регулятори росту рослин виробляються у корисних кількостях через 30 днів культивування, переважно через 45 днів і більш переважно через 60 днів.

Хоча перемішування інкульованого середовища культури слід уникати, щоб не порушити міцелієву підкладинку, аерація середовища може бути бажаною. Аерація може забезпечуватись, наприклад, барботуванням кисню через середовище або іншими засобами, завдяки чому міцеліє-

ва підкладинка залишається неушкодженою. Було виявлено, що достатня кількість кисню доступна навіть без барботування повітря через середовище, і забезпечується аерацією, що виникає внаслідок взаємодії з поверхнею міцелію.

Під "довгою частиною видимого спектра" мається на увазі світло з довжиною хвиль приблизно 500-800нм, переважно 600-750нм. Допустимі інші довжини хвиль, але домінуюча довжина хвиль має не виходити за межі цього діапазону. Таким чином, щодо відсоткової кількості фотонів, у довгій частині спектр має бути представлено більше, ніж 50% таких фотонів.

Рівень регуляторів вмісту рослин може бути визначений з допомогою стандартних методик біоаналізу. Порівняння росту розсади сої при відомих концентраціях LCF, який використовують для промочування посадкового ґрунту, використовують як стандарти росту. Колір розчину LCF корелюється з його ефективністю щодо розсади сої протягом часу. Показники добрив були визначені як для оброблюваних рослин, так і для контрольних рослин, і розсаду вивчали через 14 днів після нанесення компосту. Різниці у загальній масі, масі коренів, довжині коренів, масі листя і висоті встановлюються для порівняння з ефектами, які досягаються у випадку застосування стандартних розчинів LCF. Альтернативно, колір рідини, що містить культуру, може використовуватись як один із показників, так як було встановлено, що зміна кольору з жовтого на колір темного вина пов'язана з виробленням регуляторів росту рослин.

Міцність розчину LCF контролюється шляхом приведення кольору у відповідність кольору відомого розчину "Стандарт", який при використанні на сої розводять у відношення 1:500. Зазвичай культуру, яка інкубувалась протягом 60 днів, розводять водою у відношенні 1:2 для досягнення інтенсивності кольору, яка відповідає Стандарту. Внаслідок більш тривалого періоду інкубування, культуру додатково розводять для одержання рівнів розчину LCF Стандарт.

В міру визрівання культури, міцелієва підкладинка розростається, і рідку частину культури можна легко видалити асептичним шляхом, якщо утворилась достатня кількість регуляторів росту рослин. Твердий матеріал видаляють із зібраного середовища культури, переважно фільтруванням або, як альтернатива, центрифугуванням або іншим відомим методом відділення твердих речовин. Після цього рідку частину нагрівають до 100°C і витримують протягом 10 хвилин. На цій стадії денатурують ферменти, такі як целюлаза, ліпаза і геміцелюлаза. Також можуть застосовуватись хімічне/температурне екстрагування білків або фільтрування мембран. Після цього денатуровані білки можуть відфільтровуватись через паперові фільтри або видаляти центрифугуванням. Після цього рідку частину стерилізують придатними методами, такими як пастеризація і ультрафільтрування, переважно пастеризація. Після цього одержаний пастеризований "LCF" упаковують у стерильні контейнери. Після цього колбу з міцелієвою підкладинкою за необхідності повторно наповнюють стерильним холодним живильним розчи-

ном для одержання додаткової кількості LCF. Перше продукування LCF займає 60 днів, друге потребує лише приблизно 30 днів з моменту утворення міцелієвої підкладки на першому етапі. Третє і наступні продукування замають 30 днів і можуть продовжуватись аж доки посудина з клітиною не стане забрудненою.

Під „фільтратом культури” маєтись на увазі рідка частина бажаної культури. „Фільтрат культури” є загальноживим терміном, незважаючи на той факт, що виділення такого фільтрату необов'язково може здійснюватися саме фільтруванням. Насправді, у випадку ряду культур згідно з винаходом утворюється міцелієва підкладка, завдяки чому фільтрат культури може бути видалений декантуванням або сифонуванням. Таким чином, термін „фільтрат культури” просто вживається на позначення рідкої частини культури.

„Стерилізація” LCF згідно з винаходом може бути здійснена рядом способів. Оскільки пастеризація є найбільш практичною, композицію називають фактором у вигляді рідкого компосту. Однак, також можуть застосовуватись інші способи стерилізації, такі як ультрафільтрування або додавання антибіотиків або дезинфікуючих речовин, таких як йодофор.

Окрім стерилізованого фільтрату культури, композиції LCF згідно з винаходом також містять матеріал, який акумулюється під час фільтрації культури і може висушуватись. Цей матеріал також містить регулятори росту рослин і може використовуватись подібно до стерилізованого фільтрату.

Міцелієву підкладку можна використовувати повторно після видалення

середовища для збирання LCF. Як правило, так середовище може бути видалене з допомогою трубок, які розміщують під міцелієм, і замінене стерильним середовищем. Оскільки під час видалення первинного середовища підкладка розривається, нове стерильне середовище можна просто перезалити у контейнер, після чого частини підкладки відновлюються і продовжують рости.

Окрім того, що таке середовище продукує регулятори росту рослин відповідно до методик даного винаходу, було встановлено, що це середовище також містить елісатори матеріалів, які забезпечують захист рослин від патогенних організмів. Такі захисні механізми, загалом відомі як фітоалексини виробляються рослинами, інфікованими паразитами або патогенними організмами. Загальний опис цих механізмів може бути знайдений [у звіті на основі лекції на тему „Як рослини захищають себе від патогенних організмів,” Лекція 8, Університет штату Айдахо, факультет ботаніки, курс 405/504, яку можна прочитати на www.uidaho.edu/ag/plantdisease]. Як зазначається в цій лекції, як правило, структурний захист полягає у, наприклад, утворенні восків, коркових шарів, опалих шарів і подібних, що створює перешкоди для переривання процесів метаболізму у рослин. Метаболічні механізми захисту включають первинно існуючі, а також ті, які виробляються у відповідь на інфікування патогенними організмами. Такі захисні механізми включають вироблення

токсичних речовин, які класифікуються як фітоалексини. LCF згідно з винаходом має здатність викликати реакції подібного типу.

Таким чином, один аспект цього винаходу стосується одночасно ефектів регулювання росту рослин, які викликає LCF, та зумовлення вироблення фітоалексинів. Такий ефект може бути посилений за рахунок додавання інгібіторів фітоалексину, таких як продукт під назвою Messenger, що містить білок харпін, який виробляється компанією Eden Bioscience.

LCF розводять до придатної концентрації для застосування на сільськогосподарських культурах і деревах. Можуть застосовуватись розведення у відношенні 1:100 - 1:2,000 або 1:5,000 залежно від концентрації регулятора росту рослин та бажаних ефектів. Рівень розведення, звичайно ж, залежить від вихідної концентрації регулятора росту рослин, способу нанесення матеріалу та ряду інших факторів, як можуть бути визначені середнім фахівцем у цій галузі. У багатьох випадках було встановлено, що розведення LCF до 1:6,000 або й вище, а саме 1:10,000, є ефективним. LCF також може висушуватись на інертній основі, такий як тальк або діатомова земля, для його подальшого використання або ж може висушуватись на гранульованому добриві для покращення дії такого добрива. Загалом розведений LCF може наноситись будь-яким відомим способом, наприклад, додаванням до посадкового розчину або до аерозолі для листя, додавання через крапельну зрошувальну систему, примішування до посадкового ґрунту, нанесення на ґрунт, в який висаджують розсаду і т.д.

Відповідно до одного з варіантів у випадку використання у вигляді спрею або добавки до ґрунту співвідношення розчину LCF становить 6-8 унцій LCF на 30 галонів води на акр. Однак, перевагу віддають використанню більшої кількості рідини. Переважно загальна кількість рідини, яку наносять на один акр становить 100 - 500 галонів при розведенні приблизно 1 пінту -1,5 кварта (1,43л.) на 100 - 200 галонів води. Таким чином, як правило використовується співвідношення 1 кварта LCF у вигляді стерилізованого середовища на 125 - 200 галонів води на акр, і таку розведену суміш наносять у вигляді спрею, або ж таке співвідношення становить 2 кварта стерилізованого фільтрату культури LCF на 325 галонів води на акр.

Однак, як зазначалося вище, фільтрат культури LCF також може висушуватись на гранульованій речовині і наноситись у вигляді сухого матеріалу.

LCF та його розведення або інші композиції також можуть змішуватись з іншими кислотними матеріалами, такими як пестициди, інші підживлювачі і/або добрива для комбінованого застосування. Змішування з основними добривами або розчинами слід уникати. Особливо переважною сумішшю є суміш з поверхнево-активними сумішами злакових ад'ювантів, що описано в заявці РСТ, номер публікації [WO 96/38590], яка включена до цього опису шляхом посилання. Альтернативно також можуть використовуватись нематичидні суміші, які повністю складаються з індивідуальних компонентів, таких як суміші лау-

рилсульфату натрію, меляса, сафлорова олія і сир. Це описано у паралельній [заявці 60/390,289, поданій 21 червня 2002 року] і включеній у цей опис як посилання. Як зазначалося вище, у композицію також можуть додаватись еліситори захисних білків фітоалексину або метаболітів.

Як приклад, LCF може вироблятися у вигляді 1% (мас./мас.) покриття на гранулах добрива, призначеного для дернової трави або для овочів і дерев. 2%-ове (мас./мас.) покриття на діатомовій землі є придатним порошком для обробки дрібного насіння, такого як насіння салату, помідора, капусти і баклажана; вищий процентний вміст LCF, який наноситься як покриття на діатомову землю, застосовується для більшого насіння. Наприклад, 6,5% покриття придатне для кукурудзи, квасолі, сої, гороху і огірків. На розсаді з оголеним коренем, цибулини, розетку листків ананаса та інший вегетативний осадковий матеріал для підвищення темпів його росту може розпилюватися такий порошок.

Традиційним способом нанесення є додавання приблизно ½ чайної ложки порошку на унцію насіння у пластиковому пакеті. Після закривання пакета його струшують для того, щоб насіння покритись порошком, надлишок порошку видаляють, а одержане насіння покрито тонким шаром порошку.

Загалом LCF слід зберігати при кімнатній температурі, поза прямим сонячним промінням і в сухому місці. Незважаючи на те, що LCF нешкідливий для навколишнього середовища, його не можна вживати в їжу і не слід залишати на шкірі протягом тривалого проміжку часу.

Наведені далі приклади ілюструють винахід, не обмежуючи об'єм його правової охорони.

Приклад 1

Одержання пастеризованого LCF

Середовище одержували з:

20 галонів ретентату ананасового соку з високим вмістом клітковини, отриманого ультрафільтрацією,

1 галону ананасового сиропу,

20 галонів мелясової води (5 галонів меляси, змішаної з 40 галонами води), і

5 галонів пюре з м'якої стиглої папайї, необов'язково зі шкіркою, насінням і м'якоттю.

Після цього загальний об'єм доводили до 50 галонів додаванням додаткової кількості ретентату і/або мелясової води. Компоненти перемішували у відкритому пластмасовому циліндрі і перекладали у посудину із нержавіючої сталі, доводили до кипіння і витримували при 100°C протягом принаймні 30 хвилин. Гарячу суспензію перекладали у стерилізований, білий і прозорий пластмасовий барабан для біообробки об'ємом 55 галонів і охолоджували до кімнатної температури. Охолодження займає декілька днів.

Охолоджене середовище інокують вихідною грибною культурою (див. нижче) під витяжною шафою з ламінарним потоком, і у 55-галонний барабан вставляють одну або дві бавовняних корки. Після цього такі барабани інкубують у світлій кімнаті з кондиціонованим повітрям протягом 60 днів у стані спокою. Освітлення забезпечувалося з допомогою Agrolights або обігрівальною лампою

делюкс денного освітлення. Холодне денне освітлення не задовольняє потреб.

Через 60 днів рідку частину культури видаляли і фільтрували для видалення твердих речовин. Відфільтровану рідину нагрівали до 100°C протягом 10 хвилин для денатурування розчинних білків. Нагріте середовище після цього фільтрували, і повторно нагрівали до 100°C протягом 30 хвилин до пастеризації. Одержаним пастеризованим продуктом наповнювали стерилізовані пляшки і ставили на зберігання при кімнатній температурі. Рівень pH в LCF, одержаному у цьому прикладі становить 2,5.

Стартову грибну культуру, яку використовували у цьому прикладі, отримували від Kukui Spawn Co., у минулому Maui Shiitake Trading Company, Гаваї. Цілий літр рідкого міцелію асептичним способом додають у барабан для біообробки з охолодженим живильним розчином. Зазвичай додають дві пляшки рідкої культури міцелію на 50-галонний барабан для біообробки.

Приклад 2

Нанесення на рослини

Одну унцію LCF, одержану у Прикладі 1, розводили у 5 галонах води. Одержану суміш наносили на ґрунт довкола кавових дерев.

Одну унцію LCF розводили у 5 галонах води і використовували для обробки кукурудзи, початки якої були на 60% більш повними, ніж у контрольних рослин. Кращі результати були встановлені при розведенні 1 унції LCF в 10 галонах води.

Подібне розведення 1 унції LCF в 5 галонах води застосовували для обприскування салату Манго, внаслідок чого отримували на 50% більшу масу листя порівняно з контрольними рослинами.

Насіння огірка обробляли 6,5% порошком LCF перед висіванням, і маса одержаних рослин на 39% перевищувала контрольні рослини.

Одну унцію LCF, розведену у 5 галонах води, наносили на розетки листя ананаса, внаслідок чого ананаси росли швидше; кращі показники росту також спостерігались, коли на листя доросліших рослин розприскували цим розчином або коли 3-річні рослини ананаса занурювали у цей розчин.

Розведення 1 унції LCF в 1 галоні води застосовували як розчин для занурювання цибулин для сухого земляного таро, батату і ямс.

Ростки таро були на 160% важчими, ніж контрольні рослини через шість тижнів.

У випадку застосування на цукровій тростині, необхідне розведення залежало від сорту рослини. У деяких випадках 1 унція LCF і 2½ галони води були достатніми для забезпечення збільшення діаметру стебла на 50%.

Дернова трава починала рости швидше завдяки її обприскуванню розчином з 1 унцією LCF, розведеною в 5 галонах води.

LCF також використовують як змочувальну рідину для ґрунту у вигляді 29мл розчину у співвідношенні 1:500 на посудину з рослиною для обробки лжетуги тисолистної, внаслідок чого ріст пришвидшується на 10% - 20% протягом 4 тижнів.

LCF може змішуватись з полімерами для обробки сухого насіння злакових, овочів та інших

культур. Відсоток LCF підбирається залежно від культури.

LCF може застосовуватись для усунення симптом зараження нематодами. Застосовують розведення 1:500 у 5 галонах на одне інфіковане кавове дерево. Така обробка через 5 місяців зумовить збільшення кореневої системи, листяний покрив і гілки, збільшить однорідність плодів і підвищить врожайність.

LCF може застосовуватись для зменшення випадків захворювання рослин, таких як плямистість листя, зумовлена грибковим ураженням, і бактеріальної гнилі. Загнивання цибулі може бути знижене завдяки застосуванню розчину з розведенням у відношенні 1:1600 LCF, який наноситься на листя раз у кожні три тижні.

Слабкий розчин LCF (0,1%) може застосовуватись для продовження строку стояння квітів, листя і різдвяних дерев після зрізу.

LCF може застосовуватись для послаблення уражень від морозу, комах і хімічних речовин, при цьому його застосовують при розведенні 1:500 і наносять на листя або використовують як засіб для змочування ґрунту.

Тестування пагонів ананаса проводилось їх зануренням у розчин, що містить 800, 1000 або 2000 частин на мільйон стерилізованого фільтрату LCF на 10 хвилин перед висаджуванням у ґрунт з

гранульованим добривом. Ці пагони також одночасно занурювали у поверхнево-активну суміш нематициду у вигляді мікроемульсії. Хоча контрольні рослини мали середню масу кореня 6,9 грам і його середню довжину 29,4 дюйми, рослини, які оброблялись 800ч/млн LCF, мали корені масою 8.2 грам, а їх довжина сягала 33.35 дюймів; рослини, які оброблялись 1000ч/млн LCF, мали корені масою 7,4 грами і завдовжки 41,4 дюйми, тобто збільшення росту на 41% порівняно з контрольними рослинами. Однак, при застосуванні 2000ч/млн, проявились токсичні ефекти, а маса та довжина коренів були меншими, ніж у контрольних рослин.

Квасоллю гарбанзо замочували у стерилізованому фільтраті культури LCF, розведеному у відношенні 1 унція на 1/2 галона або на 1 галон води. Квасоллю обробляли у співвідношенні 1мл розведеного матеріалу на 100 грамів квасолі. Після цього квасоллю сушили і висаджували. Вона давала на 22% більше квасолин в урожаї порівняно з необроблюваними контрольними рослинами.

У випадку інших застосувань обробка композицією з LCF згідно з винаходом поєднувалась з обробкою стимуляторами цвітіння, гербіцидами і інгібіторами росту дернової трави.

У випадку використання LCF на помідорах маса плодів зростала на 56%.