



УКРАЇНА

(19) UA (11) 17558 (13) A

(51)6 A 01 N 65/00

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РЕГУЛЯТОРА РОСТУ РОСЛИН

1

2

(21) 96072690

(22) 08.07.96

(24) 06.05.97

(46) 31.10.97. Бюл. № 5

(47) 06.05.97

(72) Пономаренко Сергій Платонович, Боровікова Галина Семенівна, Блізнюк Світлана Тимофіївна, Ізжеурова Валентина Василівна

(73) Акціонерне товариство закритого типу "Високий врожай" (UA)

(57) Способ получения регулятора роста растений, включающий культивирование мик-

роорганизма на жидкой питательной среде с последующим выделением продуктов метаболизма, отличающийся тем, что культивируют штамм микроскопического гриба *Cylindrocarpum magnusianum* IMB F-100004 на жидкой питательной среде в условиях ограниченной аэрации при $t\ 22-28^{\circ}\text{C}$ в течение 30 суток с последующим адсорбированием продуктов метаболизма активированным углем в течение 6-8 часов и экстрагированием 70% этиловым спиртом при объемном соотношении компонентов культуральная жидкость: спирт 2,5:1, определяют активность препарата

Изобретение относится к биотехнологии и сельскохозяйственной микробиологии, а именно к способу получения препарата, регулирующего развитие широкого круга растений.

Неблагоприятная экологическая обстановка, сложившаяся в мире, способствует поиску новых экологически чистых и дешевых биотехнологий, в частности, разработке способов получения новых дешевых и удобных в применении биопрепаратов для культивирования растений как альтернативы химическим средствам.

Получение регуляторов роста путем микробиологического синтеза имеет преимущество перед химическими способами, т.к. позволяет получать природные соедине-

ния мягкого действия. Продукты жизнедеятельности микроорганизмов-продуцентов имеют значительные преимущества перед синтетическими регуляторами и очищенными микробными веществами. Неочищенные и малоочищенные микробные препараты, содержащие кроме основного действующего начала - фитогормонов смесь биологически активных веществ, зачастую в оптимальных сочетаниях, хорошо сбалансированных для проявления желаемого биологического эффекта, более экономичны и полифункциональны. Однако известные методы их получения включают многоступенчатую систему фракционирования и очистки препаратов, что усложняет процесс, ведет к его удорожанию и снижает выход препарата из-за потерь.

(19) UA (11) 17558 (13) A

Применение регуляторов роста в сельскохозяйственной практике, особенно в повышении устойчивости растений к экстремальным условиям, регулировании процессов вегетативного роста, корнеобразования, прорастания семян и клубней и т.д. не соответствует реальным потребностям, сфера их практического применения довольно ограничена, в частности, из-за недостаточного количества доступных дешевых отечественных препаратов, способов их получения, транспортировки, хранения.

Известны способы, в которых получение биопрепаратов достигается культивированием различных микроорганизмов с последующим выделением и использованием определенных веществ в качестве препарата (Япония: з. N62-20163, з. N1-79101, РСТ N87/06796).

Однако этот путь сложен, многоступенчат и ведет к получению узконаправленных препаратов.

Известны регуляторы роста растений, обладающие широким спектром действия (гибберелин, гибберсиб) для широкого круга растений и повышающие урожай на 15–20%. Однако эти препараты нерастворимы в воде, а в 0,5% водном растворе аммиака плохо сохраняются. (Микробные фитогормоны в растениеводстве. Рига. "Зенитне", 1988).

Известны способы получения биопрепаратов, в основе которых положено культивирование микроорганизмов с последующим суспендированием их биомассы в воде либо физиологическом растворе (Авт.св. СССР № 1423550, № 1555320, № 1698242, № 1699990, № 1712348, ГДР з.п. N272986, ЧССР а.с. N 256150, США п. N4818530, п. N4718935).

Однако эти способы, использующие монокультуры, ведут к получению препаратов регулирующих развитие одного вида растений и на определенном этапе.

Известен способ получения регулятора роста растений из фильтрата культуральной жидкости микроорганизмов, однако, он характеризуется многоступенчатостью, использованием разнообразных экстрагентов и растворителей (Stowe B.B., Yamaki T., Ann&Reu& Plant Physiol., 8, 181-216, 1956).

В основу изобретения поставлена задача создания способа получения регулятора роста растений, в котором за счет выращивания штамма микроскопического гриба в оптимальных для него условиях и последующего выделения продуктов метаболизма, обеспечивается простота получения биологически активного препарата широкого

спектра действия, недорогого и удобного в применении.

Поставленная задача решается тем, что в способе получения регулятора роста растений, включающем культивирование микроорганизма на жидкой питательной среде с последующим выделением продуктов метаболизма, согласно изобретению культивируют штамм микроскопического гриба *Cylindrocarpum magnusianum* IMB F-100004 на жидкой питательной среде в условиях аэрации при t 22–28°C в течение 30 суток с последующим экстрагированием продуктов метаболизма 70% этиловым спиртом при объемном соотношении компонентов культуральной жидкости: спирт 2,5:1, причем перед экстрагированием проводят адсорбцию с помощью активированного угля в течение 6–8 ч, добавляя его в количестве 0,5 г на 250 мл культуральной среды.

Способ осуществляют следующим образом:

Культивируют штамм *Cylindrocarpum magnusianum* IMB F-100004, имеющий такие характеристики:

Штамм выделен из корневой системы облепихи. Идентифицирован по Кириленко Т.С. Атлас родов почвенных грибов (Ascomycetes и Fungi Imperfecti) К., Наукова думка, 1977, с. 127. Пидопличко Н.М. Грибная флора грубых кормов. К., изд-во АН УССР, 1953, с. 485.

Штамм депонирован в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины под N IMB F-100004.

Морфологическая характеристика штамма.

При микроскопировании культуры, выращенной на агаризованной среде сусло, среде Чапека, картофельном агаре, гифы 2,0–3,0 мкм толщиной, неокрашены, часто в тяжевидных пучках, разветвленные. Конидиеносцы одиночные, простые, слабо разветвленные, суживающиеся к верхушке, размеры 10,0–20,0x2,9–3,5 мкм. Конидии цилиндрические, прямые, реже слегка согнутые, закругленные на концах или тупоконусовидные с сосочком у основания, с 0–3 перегородками, чаще с 1 перегородкой, размеры 10,0–42,5x5,3 мкм. Хламидоспоры 5,0–12,0 мкм в диаметре, сначала неокрашенные, затем коричневые, гладкие, шаровидные или грушевидные, интерколярные или верхушечные, одиночные или в коротких цепочках.

На жидкой глюкозо-аспарагиновой среде, не сбалансированной по углероду и азоту, в гифах находится большое количество включений жировой природы сферической либо овальной формы. На картофельном от-

варе включения встречаются в меньшем количестве и мельче по размеру.

Культуральные свойства штамма.

Штамм хорошо растет на агаризованных питательных средах: пивном сусле, картофельном агаре, среде Чапека, жидкой глюкозо-аспарагиновой среде.

На агаризованном пивном сусле при 25–28°C колонии пушисто-войлочные, белые до кремоватых или телесных. На обратной стороне – светло-коричневые, радиально лучистые.

На агаризованной среде Сабуро (пивное сусло + МПА в равных соотношениях (в возрасте 15 суток) колонии 2-х типов: 1) Диаметр колоний 80 мм. На расстоянии 25 мм от центра слабо-войлочная, затем (20 мм) пушистая белого цвета. На обратной стороне бесцветная или слабо соломенного оттенка. 2) Диаметр колонии 62 мм, в центре (20 мм) выпуклая, пушистая, слегка кремового оттенка, затем (по кольцам) войлочная светло-оливкового цвета, войлочная пушистая желтовато-кремового оттенка, слабо-войлочная слегка фиолетового оттенка, край колонии фиолетово-белого оттенка. Обратная сторона – темно-красно-коричневого цвета.

При выращивании в стационарных условиях на жидкой глюкозо-аспарагиновой и сахарозо-аспарагиновой средах рост слизистый, желеобразный, бесцветный. На среде с сахарозой при добавлении К – На лимоннокислого либо аммония лимоннокислого культура растет в виде опущенных пеллет или слизистых сгустков. Культуральная жидкость при этом окрашивается в слегка коричневатый цвет. При выращивании на качалках в колбах емкостью 250 мл с 50 мл питательной среды культура растет в виде пеллет либо слизистых тяжей, окрашенных в слегка соломенный или коричневый цвет.

На жидких средах с добавлением органических источников азотного питания (смеси аминокислот, пептона), на средах сложного состава (растительные отвары) рост культуры и пигментообразование усиливаются.

Физиологические свойства штамма.

Штамм растет на дефицитной по азоту среде и является олигонитротолерантным микроорганизмом. На среде с низким содержанием азота синтезирует небольшое количество соединений белковой природы.

Развитие штамма улучшается и ускоряется при добавлении в среду легкодоступных связанных форм азотного питания: нитратного, аммонийного, органического.

Из источников питания усваивает глюкозу, сахарозу, крахмал, маннит. Не растет на среде с целлюлозой.

В процессе роста в зависимости от состава питательной среды в большей или меньшей степени подкисляет последние (до pH 5,8–3,5). Реакция среды остается без изменений (pH 7,0) при выращивании штамма на глюкозо-аспарагиновой среде. На этой среде культура синтезирует биологически активные вещества – комплекс, состоящий из углеводов, жирных кислот, аминокислот, веществ цитокининовой природы, обладающие ростактивирующими свойствами по отношению к сельскохозяйственным растениям.

Штамм является микроаэрофильным и мезофильным микроорганизмом. Не требователен к источникам питания. Растет на жидкой глюкозо-аспарагиновой среде в колбах на 0,75 л с 0,25 л питательной среды при t 22–25°C в стационарных условиях. Культура сохраняется без пересевов в течение 6 и более месяцев.

Состав среды (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 0,02; KH_2PO_4 – 0,9; K_2HPO_4 – 0,3; MgSO_4 – 0,1; K_2SO_4 – 0,1; MnSO_4 – 0,02; FeSO_4 – 0,02; CuSO_4 – 0,02; вода водопроводная – 1 л, pH 7,0.

При росте культуры на минеральной среде дефицитной по азоту, pH культуральной жидкости 7,0–7,3. На азотсодержащих средах pH снижается до 6,5–3,2.

Долгосрочное хранение штамма с периодическими пересевами через 6 месяцев и сохранением биологических свойств осуществляется на жидкой питательной среде следующего состава: г/л: глюкоза – 10,0, аспарагин – 0,02, KH_2PO_4 – 0,9; K_2HPO_4 – 0,3; MgSO_4 – 0,02; FeSO_4 – 0,02; CuSO_4 – 0,02, pH 7, t 5–7°C. Возможно хранение на этой же среде с добавлением агара (20 г/л).

Микромицет *Cylindrocarpum magnusianum* IMB F-100004 для получения комплекса биологически активных веществ – регуляторов роста растений выращивают на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0; аспарагин – 0,02; KH_2PO_4 – 0,9; K_2HPO_4 – 0,3; MgSO_4 – 0,1; FeSO_4 – 0,02; CuSO_4 – 0,02; K_2SO_4 – 0,1; MnSO_4 – 0,02; вода водопроводная – 1 л, pH 7,0.

Культивирование проводят в стационарных условиях в колбах емкостью 750 мл с 250 мл питательной среды при t 22–28°C в течение 30 суток в условиях аэрации. Культура по окончании инкубирования слизистая, бесцветная либо слегка кремового оттенка, медузовидная.

Адсорбцию продуктов жизнедеятельности осуществляют, добавляя в колбу с биомассой и культуральной жидкостью 0,5 г активированного угля. Жидкость перемешивают в течение 6–8 часов, после чего содержимое колбы фильтруют на воронке Бюхнера с бумажным фильтром в колбу Бунзена.

Для экстракции продуктов метаболизма в колбу добавляют 50 мл 70% спирта, перемешивают 6–8 часов, затем содержимое колбы фильтруют в воронке Бюхнера. Общий выход водно-спиртового элюата-регулятора роста растений составляет 90% за счет потерь при операции фильтрования.

Водно-спиртовой раствор регулятора роста хранят в темном месте при комнатной температуре и проверяют его эффективность биологическим методом по способности стимулировать физиологические процессы у высших растений.

Определение биологической активности регулятора роста проводят по измерению длины проростков пшеницы в присутствии препарата по сравнению с контролем.

Семена пшеницы предварительно стерилизуют в растворе перекиси водорода в течение 5 минут с последующим промыванием в стерильной дистиллированной воде.

5 Препарат для испытаний разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:10000. В 8 стерильных чашек Петри раскладывают по 5 штук семян, затем в 4 опытные чашки наливают по 15 см³ раствора препарата, в 4 контрольные – по 15 см³ воды. Чашки инкубируют в термостате при 24°C. Через 7 суток измеряют длину проростков и определяют среднее значение. Биологическую активность выражают в процентах по отношению к контролю. Увеличение длины проростков пшеницы на 15–20%.

10 Влияние полученного таким способом регулятора роста растений приведено в таблице.

15 Как видно из приведенного выше, способ прост, дешев, доступен и приводит к получению эффективного регулятора роста растений.

25

Применение гриба

Культура	Норма затрат препарата, мл/т семян, мл/га	Способ и сроки обработки	Прибавка урожая (на 1 га)
1	2	3	4
Пшеница озимая	3–5 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в начале выхода в трубку	4–9 ц.
Ячмень яровой	3–5 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в начале выхода в трубку	4–8 ц.
Гречка	10 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в фазу бутонизации, повторно – в фазу массового цветения	3–5 ц.
Рис	10 мл/т	Инкрустация семян	4–6 ц.

Продолжение таблицы

1	2	3	4
Кукуруза	10-15 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в фазе 8-10 настоящих листьев	7-8 ц зерна 18-35 ц зеленой массы
Сахарная свекла	5 мл/т	Инкрустация семян Опрыскивание в фазе соединения листьев в рядах	25-75 ц
Соя	5 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в стадии бутонизации - в начале цветения	3-4 ц
Горох	5 мл/га	Опрыскивание в стадии бутонизации - в начале цветения	4-6 ц
Подсолнух	10-15 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в фазе 4-5 листьев	2-3,5 ц
Рапс	10 мл/га	Опрыскивание в фазе начала цветения	1,5-2,0 ц
Люцерна	5-10 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в фазе бутонизации - в начале цветения, повторно - через неделю	0,6-1,2 ц
Клевер	5-10 мл/т 5 мл/га	Инкрустация семян Опрыскивание в фазе бутонизации - в начале цветения	0,5-0,8 ц

Продолжение таблицы

1	2	3	4
Картофель	2 мл/т	Опрыскивание бульб перед высадкой в грунт	25-40 ц
	5 мл/га	Опрыскивание в фазе бутонизации	
Огурцы	1 мл/кг	Инкрустация или предпосевное замачивание семян на 4-6 часов	3-5 кг/м ² закрытого грунта, 30-40 кг - в полевом грунте
	3-5 мл/га	Опрыскивание в фазе 3-4 настоящих листьев	
Томаты	1 мл/кг	Инкрустация или предпосевное замачивание семян на 4-6 часов	3-4 кг/м ² закрытого грунта
		Опрыскивание в фазе 3-4 настоящих листьев	30-40 кг - полевого грунта
Лук	1 мл/кг	Инкрустация или замачивание семян на 4-6 часов	35-40 ц
	5 мл/га	Опрыскивание в фазе 3-4 настоящих листьев, повторно - в фазу массового стрелкования	

Упорядник

Техред М.Калемеш

Коректор Л. Лукач

Замовлення 4239

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101