



УКРАЇНА

(19) UA (11) 43366 (13) C2

(51) 7 A01N63/00, A01N63/02,  
C12N1/20//  
(C12N1/20, C12R1:38)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* АБО ЙОГО БІОЛОГІЧНО ЧИСТІ КУЛЬТУРИ, ЗДАТНІ ПРОДУКУВАТИ АКТИВНІ АНТИПАТОГЕННІ МЕТАБОЛІТИ, КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ РОСЛИН, СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ РОСЛИН

(21) 96114349

(22) 13 04 1995

(24) 17 12 2001

(31) 9401307-5

(32) 18 04 1994

(33) SE

(86) PCT/SE95/00408, 13 04 1995

(46) 17 12 2001, Бюл. № 11, 2001 р

(72) Йергардсон Берндт, SE, Густафсон Анніка, SE, Інгстрем Брітт Маріє, SE, Еркман Тілі, SE, Йонсон Леннарт, SE, Гекеберг Маргарета, SE

(73) СВЕНСКА ЛАНТМЕННЕН, РІКСФЕРБУНД ЕК ФЕР, SE

(56) 1 STN International, Fila CA, Chemical Abstracts, volume 98, no 3, 17 January 1983 (Columbus, Ohio, US), Dai, Xiangpeng et al "Study on the pigment from *Pseudomonas chlororaphis*", abstract no 14103, & Weishengwuxue Tongbao (1982), 9(4), 159-61

2 STN International, File CABA, CAB Abstracts, volume 94, Raaska, L et al "The antagonistic activity of *Pseudomonas chlororaphis* and *Pseudomonas fluorescens* against shiitake (*Lentinula edodes*) mycelia", abstract no 1076, & Material und Organismen, (1991) 26(4) 287-302

3 STN International, File WPIDS, STN accession no 93-410750, Derwent accession no C93-183039, NORINSHO KK "Plant disease prevention caused by Gram positive bacteria - by treating with *Pseudomonas chlororaphis* etc", & JP 05310521 A 931122 (9351)

4 STN International, File WPIDS, STN accession no 91-255505, Derwent accession no C91-110716, FUJISAWA PHARM CO LTD "Substance FR901375 with antibiotic and antitumour activity - obtd by culturing *Pseudomonas* i aerobic conditions", & JP 03141296 A 910617 (9135)

(57) 1 Штамм бактерій *Pseudomonas chlororaphis* NCIMB 40616 или его біологічески чистые культури, способные продуцировать активные антипатогенные метаболиты, или его мутанты, имеющие по существу такие же характеристики, как и штамм NCIMB 40616

2 Композиция для профилактики заболеваний растений, вызываемых патогенными грибами, отличающаяся тем, что она содержит в качестве активного антипатогенного ингредиента штамм бактерий по п 1 или его культуральную жидкость,

содержащую его активные антипатогенные метаболиты

3 Композиция по п 2, отличающаяся тем, что патогеном является гриб *Drechslera teres*

4 Композиция по п 2, отличающаяся тем, что патогеном является грибок *Drechslera graminea*

5 Композиция по п 2, отличающаяся тем, что патогеном является гриб *Drechslera avenae*

6 Композиция по п 2, отличающаяся тем, что патогеном является гриб *Microdochium nivale*

7 Композиция по п 2, отличающаяся тем, что патогеном является гриб *Tilletia caries*

8 Композиция по п 2, отличающаяся тем, что патогеном является гриб *Ustilago avenae*

9 Композиция по пп 2 - 8, отличающаяся тем, что активный антипатогенный ингредиент находится в смеси с композицией-носителем, приемлемым для сельскохозяйственной практики

10 Композиция по п 9, отличающаяся тем, что активный антипатогенный ингредиент находится в смеси с жидким носителем

11 Композиция по п 9, отличающаяся тем, что активным антипатогенным ингредиентом насыщен твердый пористый материал

12 Композиция по п 9, отличающаяся тем, что дополнительно содержит клейкие добавки

13 Композиция по п 9, отличающаяся тем, что дополнительно содержит источник питательного вещества

14 Способ профилактики заболеваний растений, вызываемых патогенными грибами, включающий введение эффективной дозы активного антипатогенного ингредиента в окружающую среду, где возбудитель заболевания должен быть подавлен, отличающийся тем, что в качестве активного антипатогенного ингредиента используют штамм бактерий по п 1 или его культуральную жидкость, содержащую его активные антипатогенные метаболиты

15 Способ по п 14, отличающийся тем, что активный антипатогенный ингредиент применяют на семенах

16 Способ по п 14, отличающийся тем, что активный антипатогенный ингредиент применяют на частях растений, выполняющих функции их распространения и вегетации

17 Способ по п 14, отличающийся тем, что активный антипатогенный ингредиент применяют на растениях

18 Способ по п 14, отличающийся тем, что активный антипатогенный ингредиент применяют на

среде для выращивания растения или на среде, где оно растет

Изобретение относится к средствам защиты растений, а более конкретно - к новому штамму бактерий *Pseudomonas chlororaphis* и к использованию в растениеводстве композиций, содержащих этот штамм или продуцированные им антибиотики, для защиты растений от поражения фитопатогенными микроорганизмами

Некоторые микробы, способные вызывать болезни растений, приносят значительный вред культурным растениям и соответственно экономические потери. Многие из них поражают листья и/или другие надземные части растений, а затем обычно переносятся спорами по воздуху на новые неинфицированные культуры. Другие передаются от одного поколения к поколению культур через семена, а некоторые, вызывающие заболевания и причиняющие экономический ущерб микроорганизмы, передаются через почву, оставаясь в ней более или менее пассивными до появления восприимчивой к ним культуры

Многие методы борьбы с вызывающими заболевания микроорганизмами в растениеводстве требуют значительных финансовых затрат, но их использование для большинства растениеводческих хозяйств экономически необходимо. Один из широкоиспользуемых методов - обработка биостатическими или бицидными химикатами. Их в большинстве случаев наносят опрыскиванием на посевы, обрабатывают ими семена или корни, или дезинфицируют почву. Другие общепринятые методы включают селекцию культур, стойких к патогенам, и агротехнические мероприятия

Все эти общепринятые методы профилактики имеют некоторые недостатки. Агротехнические мероприятия эффективны или приемлемы только для решения некоторых проблем, связанных с заболеваниями растений. Селекция стойких к болезням культурных растений также возможна или приемлема только в определенных случаях, на нее может потребоваться много времени, а достигнутая стойкость может быть утрачена через некоторое время с появлением новых штаммов патогена. Часто высокоэффективны химические соединения, но они могут приводить к нежелательным последствиям для окружающей среды, требуют осторожности в обращении из-за риска для здоровья человека, и, кроме того, они могут стать неэффективными при появлении стойких патогенных штаммов

Использование средств биологической борьбы или биопестицидов может быть более эффективным и предпочтительным, чем использование других методов и поэтому такие средства испытывают в широких масштабах. Известно, что некоторые штаммы бактерий или грибов подавляют рост различных фитопатогенных микроорганизмов. Для эффективного использования такие штаммы должны обладать стабильностью, давать воспроизводимые результаты в полевых условиях и пользователи должны иметь возможности применять их в полевых условиях. До настоящего

времени немногие штаммы отвечали этим требованиям и поэтому их использовали как коммерческие продукты

Согласно изобретению предложено средство биологической борьбы, пригодное и эффективное против поражений растений патогенами в растениеводческих хозяйствах. Предложен новый штамм (MA 342) бактерий *Pseudomonas chlororaphis* с желаемыми характеристиками. Полученный штамм депонирован в Национальных Коллекциях промышленных и морских бактерий (National collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB)), Абердин, Шотландия, 14 февраля 1994 г., согласно Будапештскому Договору, и ему присвоен регистрационный № 40816

Согласно изобретению также предложена композиция для профилактики заболеваний растений, содержащая в качестве активного ингредиента новый штамм MA 342 или его мутанты с по существу такими же характеристиками, или антипатогенно активные метаболиты или их производные. Кроме того, согласно изобретению предложен способ защиты растений от болезней, используя новый штамм MA 342 или его мутанты с по существу такими же характеристиками, или антипатогенно активные метаболиты или их производные

На чертеже показан жирнокислотный профиль выделенного штамма MA 342, полученный с помощью Системы Распознавания Патогенных Микроорганизмов (Microbial Identification System) (MIDI, Newark Ltd, USA)

Ниже приведена характеристика нового штамма бактерий и описание предпочтительных способов репродукции штамма, приготовления состава и применения на полях или в теплицах. Несколько неограничивающих примеров, приведены для более подробной иллюстрации способа и состава согласно изобретению

Характеристика нового бактериального штамма MA 342

Морфологические характеристики. Морфология колоний на TSA 10 (10 г триптон-соевого бульона (Oxoid Ltd) в 1000 мл дистиллированной воды). Образует круглые белые, умеренно выпуклые колонии, в виде хорошо видимых прозрачных кристаллов в агаре при высокой плотности клеток. Клетки представляют собой грамположительные палочки, флуоресцирующие ярко-желтым светом в Kings среде B (1,5 г  $K_2HPO_4$ , 1,5 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 20 г протеолитического пептона (Difco Ltd), 10 мл глицерина, 15 г агар Bacto (Difco Ltd) в 1000 мл дистиллированной воды)

Жирнокислотный анализ. Жирнокислотный профиль бактерии показан на фиг. 1. Этот анализ был произведен с использованием Системы Распознавания Патогенных Микроорганизмов (Microbial Identification System) (MIDI, Newark Ltd, USA), версия 3.7. Согласно этой программе испытания MA 342 наиболее подобен *Pseudomonas chlororaphis* с индексом подобия 0,705

## Биохимические характеристики

Характеристики, полученные при экспресс-анализе по API 20 NE*	Реакция изолята МА 342
Восстановление нитратов	-
Продуцирование индола	-
Превращение глюкозы в кислоту	-
Аргининдигидролаза	+
Уреаза	-
Гидролиз эскулина	-
Гидролиз желатина	+
$\beta$ -галактозидаза	-
Усвоение глюкозы	+
Усвоение арабинозы	-
Усвоение маннозы	-?
Усвоение маннитола	+
Усвоение N-ацетил-глюкозамина	-
Усвоение мальтозы	-
Усвоение глюконата	+
Усвоение капрата	-
Усвоение адипата	-
Усвоение малата	+
Усвоение цитрата	+
Усвоение фенилацетата	-
Цитохромоксидаза	+

API System Ltd , Франция

Характеристики, полученные в результате дополнительных анализов	
Продуцирование	-
Усвоение ксилозы	-?
Усвоение сорбита	+?

Предпочтительные способы репродукции штамма, приготовления составов и их применения в долевых условиях и теплицах

Активные штаммы лучше всего получать во включающем инокуляцию образца процессе ферментации чистой жидкой культуры штамма, выращенной при встряхивании, или в ферментере, заполненном подходящей ферментационной средой. Штамм может быть также выращен на стерильной, в частности, на агаризованной поверхности, и когда клетки дадут рост, их можно суспендировать в воде или другой известной жидкой среде. В качестве среды для выращивания в принципе пригодны любые известные среды для выращивания бактерий. Ферментацию ведут до получения достаточной концентрации клеток, например, примерно  $5 \cdot 10^9$  ед/мл (колониеобразующих единиц)/мл для жидких культуральных сред. Полученная таким образом культуральная жидкость или суспензия бактерий может быть использована в таком виде для защиты растений, ее также до использования можно обработать и приготовить состав в соответствии с рецептурой.

В одном способе обработки клетки бактерий в культуральной жидкости можно убить, например, нагревом, или их можно центрифугировать в осадок, а оставшуюся или надосадочную жидкость, содержащую бактериальные метаболиты, можно использовать для защиты растений как с предварительной очисткой и/или концентрированием, так и без них. Суспензии бактерий и культуральные жидкости можно также гомогенизировать в смеси с одним или несколькими известными соединениями или группами соединений, при том, что такие

соединения совместимы со штаммами бактерий или их антипатогенно активными метаболитами или их производными. Подходящими соединениями могут быть порошкообразные добавки или твердые носители, такие, как тальк, каолин, бентонит или монтмориллонит, известные увлажняемые порошки, питательные вещества-источники углерода (глюкоза, сахароза и фруктоза) или комплексные бактериальные питательные вещества (дрожжевой экстракт, бактериологический пептон или триптон), соли металлов, соли жирных кислот, эфиры жирных кислот, ионо- или неионогенные ПАВ, растительные питательные вещества, регуляторы роста растений, фунгициды, инсектициды, бактерициды и им подобные. Суспензии бактерий и культуральные жидкости могут быть высушены или лиофилизированы до или после смешивания с подходящими соединениями, а полученный продукт - использован для защиты растения. Подходящий способ сушки - например, сушка на воздухе вермикулита, присутствующего в бактериальной культуральной жидкости.

Препараты бактерий и метаболитов могут быть применены любым способом, известным для обработки семян, частей растений, выполняющих функции их распространения и вегетации, растений и почвы штаммами бактерий разбрызгиванием, опрыскиванием, распылением, опылением, рассеиванием, осаждением, погружением или поливом в соответствии с целями и преобладающими обстоятельствами. Обычный расход препарата для обработки семян преимущественно составляет от  $10^{11}$  до  $10^{12}$  ед/га, а при опрыскивании от  $10^{12}$  до  $10^{14}$

ед/га, или соответствующее количество бактериальных метаболитов

#### Пример 1.

##### Выделение микроорганизма MA 342

Выкопанные корни растения *Eriopetrum nigrum* промыли в стерильной водопроводной воде для удаления налипшей почвы. От молодого корня отрезали кусок длиной 2-3 см, соблюдая стерильность. Этот кусок отрезали выше конца корня. В этом куске корня сделали маленькие надрезы разогретым скальпелем. Затем кусок корня натерли на поверхность агара TSA 10. После прорастания бактерий, микроорганизм MA 342 собрали и на TSA 10 вырастили чистую культуру.

#### Пример 2.

##### Сохранение микроорганизма MA 342

Чистую культуру в небольшой ампуле подвергли глубокому замораживанию при  $-70^{\circ}\text{C}$ . В качестве вещества-протектора замороженной культуры использовали 10%-й раствор глицерина в водопроводной воде с pH 7,15 после автоклавирования. После замораживания при  $-70^{\circ}\text{C}$  ампулы хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для длительного хранения образец подвергли лиофилизации. После прорастания в течение 48 часов на агаре TSA 10 бактериальный газон соскребли с агаризованной поверхности, смешали с протектором лиофилизированной культуры (50 г Dextran T 70 (Pharmacia Fine Chemicals Ltd), 50 г Na-L-glutamate (Kebo DB) в 1000 мл дистиллированной воды), разлили в небольшие ампулы (20 мл) и поставили в лиофильную сушку Hetosicc (Heto Ltd, Denmark) на 24 часа. После лиофилизации ампулы закрыли газонепроницаемыми резиновыми пробками и оставили на хранение при  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### Пример 3.

Действие MA 342 против *Microdochium nivale* при первичном отборе в теплице

Бактерии использовали для обработки семян пшеницы следующим образом: 24-часовые культуры на TSA 10, выращенные при  $15^{\circ}\text{C}$ , соскребли с агаризованной поверхности 9-сантиметровой чашки Петри и смешали с 40 мл питательного бульона (SNB: 18 г сахарозы, 5 г бактериального пептона (Oxoid Ltd), 2 г дрожжевого экстракта (Oxoid Ltd), 0,5 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и 0,25 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  в

1000 мл дистиллированной воды с pH 7,2-7,4) и 40 мл 2% в отношении массы к объему раствора натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (СМЦ) в стерильной дистиллированной воде. Этой смесью полили семена, через 20 мин излишек смеси слили, а семена высушили под вентилятором в течение ночи.

Для обработки семян в этом тепличном анализе взяли две банки и засеяли в каждую по 50 семян. Банки 18 см диаметром и 4 см высотой были заполнены на 2/3 нестерилизованной коммерческой торфяной смесью (Enhetsjord K Normal), с добавлением 20% по объему песка.

До обработки бактериями семена озимой пшеницы (культурный сорт "Kosack") искусственно заразили патогеном *Microdochium nivale*. Патоген культивировали в течение 7 дней в бульоне картофельной декстрозы (24 г бульона картофельной декстрозы (Difco Ltd) в 1000 мл дистиллированной воды) при комнатной температуре на роторной качалке. Полученную кашку гомогенизировали в кухонном смесителе и вылили на семена. Через 30 мин жидкость слили, а семена оставили сушиться под вентилятором на ночь. Таким образом инвазированные семена затем обработали штаммом MA 342 и высеяли в банки, как было описано выше.

После высевания банки накрыли стеклянными крышками и поставили в темное место при  $6^{\circ}\text{C}$ . Через 5 дней крышки сняли, каждую банку полили 100 мл воды и поместили пятилитровый пластиковый мешок, который поддерживали две деревянные палки. Затем банки поместили в теплицу при  $12-15^{\circ}\text{C}$  на 8 дней.

Опыт на семенах заключался в следующем:

1 Штаммом MA 342 бактерии *P. chlorocephalus*, смешанным с SNB/CMC, обработали семена, инвазированные патогеном *M. nivale*.

2 Семена, инвазированные патогеном *M. nivale*, составляли контрольную группу больных.

3 Необработанные семена составляли контрольную группу здоровых.

Эффект подавления заболевания зафиксировали в процентах появления всходов здоровых (т.е. без мицелий) растений среди посеянных. Результаты типичного первичного анализа с патогеном *M. nivale* представлены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние штамма MA 342 на всхожесть и проявление заболевания озимой пшеницы, выращенной из семян, инвазированных патогеном *M. nivale*

Вид обработки	Всхожесть, %	Здоровые растения среди посеянных, %
1 MA 342	87	81
2 Контроль (зараженные)	13	1
3 Контроль (необработанные)	90	89

#### Пример 4.

Действие MA 342 против *Drechslera teres* при вторичном отборе в теплице

При этом отборе штамм MA 342 выращивали в течение 46 часов в полуконцентрирован-

ном (15 г/л) триптон-соевом бульоне (Difco Ltd) на роторной качалке в темноте при  $18-20^{\circ}\text{C}$ . Затем естественно зараженные патогеном *D. teres* семена ячменя культурного сорта "Golg" смешали в пластиковом мешке с полученной суспензией бак-

терий из расчета 300 мл на 1 кг семян, и после перемешивания мешок встряхивали около 4 мин. Обработанные таким образом семена сушили под вентилятором при комнатной температуре в течение одного дня, а затем высеяли в банки, как описано в Примере 3.

Три засеянные банки на обработку поместили сначала в темное помещение при 6°C на 7 дней, а затем в теплицу при около 20°C, как описано в Примере 3.

но в Примере 3. Для выявления эффекта от обработки подсчитали количество появившихся ростков растений и количество растений с пораженной первой листвой. Бактериальное действие сравнивали с необработанными контрольными образцами и семенами, обработанными фунгицидом Panocrine Plus 400 (гуазатин 150 г/л + имазалил 10 г/л), Rhone-Poulenc Ltd, при дозе 4 мл на килограмм семян.

Таблица 2

Действие штамма MA 342 и фунгицида Panocrine Plus 400 на ячмень, зараженный *D. teres*, при обычном вторичном тепличном отборе

Вид обработки	Появившиеся ростки, %	Растения с пораженной первой листвой, %
Контроль	92,5	13,0
Panocrine Plus 400, 4 мл/кг	95,5	0,0
MA 342, 300 мл/кг	96,1	0,0

#### Пример 5.

Действие MA 342 на патогены растений в полевых условиях

Полевые испытания проводили в виде рандомизированных блоков с повторением от трех до восьми раз на участках с размерами от 0,15 м<sup>2</sup> (один эксперимент с *T. caries*) до примерно 15 м<sup>2</sup> (большинство экспериментов). Эти участки находились в разных местностях Швеции и в большинстве случаев на супесчаных почвах с содержанием гумуса примерно 3 %.

Обработку семян бактериями и препаратом Panocrine Plus 400 проводили так, как описано в Примере 4. После того, как обработанные семена высушили вентилятором, их оставили при комнатной температуре на различное время перед вы-

севанием на полевые участки. Все семена, за исключением инвазированных патогеном *N. caries*, были естественно инвазированы или заражены различными болезнями. Семена озимой пшеницы (культурный сорт "Kosack") были искусственно инвазированы спорами *N. caries* путем смешивания 2 г зараженных *N. caries* колосков с 1 кг семян пшеницы.

Действие MA 342 на *Tilletia caries*

Это действие определяли по частоте появления зараженных колосков во время созревания. Результаты, полученные во время двух испытаний в 1991/92 г и двух испытаний в 1992/93 г, представлены в Таблице 3. Разница между бактериальной обработкой и фунгицидной существенна в 1992/93 г.

Таблица 3

Действие суспензии штамма MA 342 на *Tilletia caries*, поражающую зерно

Вид обработки	Инфицированные колоски, %	
	1991/92	1992/93
Контроль	23	65
Panocr 400*, 4 мл/кг	2	24
MA 342, 300 мг/кг	0	9

\* Panocrine 400 (гуазатин 150 г/л), Rhone-Poulenc Ltd

Действие MA 342 на *Drechslera teres*, *D. Gzaminia*, *D. avenae* и *Ustilago avenae*

В полевых экспериментах с этими патогенами измеряли число проросших и число инфицированных растений на м<sup>2</sup>, а также в большинстве

ве экспериментов - урожайность зпакнов, вес тысячи зерен и вес гектолитра зерен.

Действие на *Drechslera teres*. Результаты полевых испытаний в 1991-1993гг и действие *D. teres* на ячмене в тех случаях, где проводили испытания, показаны в таблицах 4, 5 и 6.

Таблица 4

Результаты четырех полевых экспериментов на ячмене, зараженном *Drechslera teres* в 1991 г., приведены средние показатели экспериментов, проведенных в Алнарпе, Ланне, Стренгнесе и Ультуне

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во растений на м <sup>2</sup>	Кол-во инфици. растений на м <sup>2</sup>	Вес гектолитра, кг	Вес 1000 зерен, г
Контрольная	4970	361	47	64,7	41,5
Ran Plus 400, 4 мл	5390	353	1	66,3	43,8
MA 342, 300 мл/кг	5480	353	1	66,0	43,7

Таблица 5

Результаты пяти полевых экспериментов на ячмене, зараженном *Drechslera teres* в 1992 г., приведены средние показатели экспериментов, проведенных в Сваалёфе, Нигорде, Келбеке, Ультуне и Ребексдалене

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во растений на м <sup>2</sup>	Кол-во инфици. растений на м <sup>2</sup>	Вес гектолитра, кг	Вес 1000 зерен, г
Контрольная	4290	358	48	67,9	51,7
Ran Plus 400, 4 мл	4380	378	1	67,8	50,5
MA 342, 300 мл/кг	4300	380	1	68,3	52,6

Таблица 6

Результаты двух полевых экспериментов на ячмене, зараженном *Drechslera teres* в 1993 г., приведены средние показатели экспериментов, проведенных в Келбеке и Ультуне

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во инфицированных растений на м <sup>2</sup>
Контроль	6310	74
Ran Plus 400, 4 мл	6730	1
MA 342, 200 мл/кг	6720	5

Действие на *Drechslera graminea* Результаты экспериментов с семенами, зараженными

*D. graminea*, проведенных в 1991-1993 гг., приведены в таблицах 7, 8 и 9

Таблица 7

Результаты одного полевого эксперимента с ячменем, зараженным *D. graminea* (1991 г., Уппсала)

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во инфицированных растений на м <sup>2</sup>
Контроль	3440	31
Ran Plus 400, 4 мл	4160	2
MA 342, 200 мл/кг	4390	1

Таблица 8

Результаты пяти полевых экспериментов с ячменем, зараженным *D. graminea* в 1992 г, приведены средние показатели экспериментов, проведенных в Свалеве, Нигорде, Келбеке, Ультуне и Ребексдалене

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во растений на м <sup>2</sup>	Кол-во инфици. растений на м <sup>2</sup>	Вес гектолитра, кг	Вес 1000 зерен, г
Контроль	2590	383	101	66,2	40,2
Ran Plus 400, 4 мл	3470	381	5	66,6	39,9
MA 342, 300 мл/кг	3460	368	7	66,2	39,8

Таблица 9

Результаты двух полевых экспериментов в 1993 г с ячменем, зараженным *D. graminea*, приведены средние показатели экспериментов, проведенных в Келбеке и Ультуне

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во инфицированных растений на м <sup>2</sup>
Контроль	2810	46
Ran Plus 400, 4 мл	4160	1
MA 342, 200 мл/кг	3990	8

Действие на *Drechslera avenae* Результаты экспериментов с семенами овса, зараженного

*D. avenae*, проведенных в 1991-1993 гг, приведены в таблицах 10, 11 и 12

Таблица 10

Результаты экспериментов с одного участка овса ("Puhti"), зараженного *D. avenae* 1991 г, Уппсала

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во инфицированных растений на м <sup>2</sup>
Контроль	4940	74
Ran Plus 400, 4 мл	4860	32
MA 342, 200 мл/кг	5090	17

Таблица 11

Результаты четырех полевых экспериментов в 1992 г с овсом ("Puhti" и "Vital"), зараженным *D. avenae*, приведены средние показатели экспериментов, проведенных в Свалеве и Ультуне

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во растений на м <sup>2</sup>	Кол-во инфици. растений на м <sup>2</sup>	Вес гектолитра, кг	Вес 1000 зерен, г
Контроль	3990	428	22	57,5	35,4
Ran Plus 400, 4 мл	4080	456	13	57,8	35,5
MA 342, 300 мл/кг	4000	445	3	57,4	35,0

Таблица 12

Результаты эксперимента с участка овса ("Vital"), зараженного *D. avenae* (1993 г, Уппсала)

Вид обработки	Урожайность, кг/га	Кол-во инфицированных растений на м <sup>2</sup>
Контроль	7570	79
Ran Plus 400, 4 мл	7870	14
MA 342, 200 мл/кг	7680	27

Действие на *Ustilago avenae* В полевых экспериментах с колосьями овсянки, зараженной *U. avenae*, было подсчитано число колосков овсянки или их процентное содержание на м<sup>2</sup> или их %

В период созревания урожайность не определяли. Результаты трех экспериментов в 1991-1993 гг приведены в Табл 13

Таблица 13

Результаты трех экспериментов с овсом, зараженным *Ustilago avenae* (1991-1993 гг., Уппсала)

Вид обработки	1991 г., кол-во колосков на м <sup>2</sup>	1992 г., инфицированные растения, %	1993 г., кол-во колосков на м <sup>2</sup>
Контроль	7	10,6	95
Ran Plus 400, 4 мл	3	8,7	не испыт
MA 342, 300*, мл/кг	1	1,7	15

\* 300 мл в 1991 и 1992 гг., 200 мл в 1993 г

#### Пример 6.

Применение MA 342 для обработки семян и других участков растения

Обработка семян водным составом, содержащим MA 342

Бактериальные суспензии, полученные как описано в Примерах 3 и 4, смешали с каждым из следующих веществ или соединений

Порошок талька (Kebo Lab AB), 48 г/л бактериальной суспензии

Tween 20 (Merck Ltd), 20 мл/л бактериальной суспензии

Metocel (сложный эфир целлюлозы, Sveola Kem AB), 12 г на литр бактериальной суспензии

Lissapol (ICI Agrochemicals Ltd), 1 г на литр бактериальной суспензии

Bond (Newman Agrochemicals Ltd), 1 г на литр бактериальной суспензии

В других экспериментах бактериальную суспензию центрифугировали при 10000 g в течение примерно 10 мин, а полученные гранулы ресуспендировали в 0,1 M MgSO<sub>4</sub> или в пептонной воде (5 г бактериологического пептона (Oxoid Ltd) на литр водопроводной воды)

После тщательного перемешивания полученными суспензиями обрабатывали семена (см. Пример 4 для несмешанных бактериальных суспензий)

Обработка семян лиофилизированными бактериями

Бактерии MA 342, выращенные на культуре, выращиваемой при встряхивании (см. Пример 4), центрифугировали и полученные гранулы ресуспендировали в растворе молочных сливок (200 г порошка молочных сливок фирмы Sempur AB, Швейцария, на литр стерильной дистиллированной воды), используемом в качестве протектора модифицированных бактерий. Смесь заморозили в закрытых стеклянных банках, а затем лиофилизировали в этих банках в течение примерно 48 часов в лиофильной сушке Hetosicc (Heto Ltd, Дания). Полученный порошок оставили до применения при 4°C в пластиковых мешках или в пластиковых бутылках с завинчивающимися крышками. Для обработки семян порошок перемешали в воде, или в других водных растворах, а затем обра-

ботали семена (см. Пример 4 для бактериальной суспензии), или его смешивали в пластиковом контейнере с семенами всухую, тщательно встряхивая смесь (примерно 10 г порошка на кг семян).

Гранулирование семян, обработанных MA 342

Бактерии MA 342, выращенные на культуре, выращиваемой при встряхивании, (см. Пример 4) перемещали в пропорции 1:1 по объему с клейким веществом (2 % в отношении массы к объему водного раствора натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы или 50 % в отношении массы к объему водного раствора гуммиарабика). Этой смесью обрабатывали семена (см. Пример 4). Затем в пластиковый мешок добавили избыточное количество бентонита (Dresser Minerals Inc) или порошка талька (Kebo Lab AB), мешок надули и сильно потрясли в течение нескольких минут. После этого семена разложили на большие подносы под вентилятором и оставили сохнуть при комнатной температуре.

Опрыскивание побегов растений бактериальной суспензией

Бактериями MA 342, выращенных на культуре, выращиваемой при встряхивании, (см. Пример 4) заполнили пластиковые ручные опрыскиватели или опрыскиватели с приводом, затем опрыскивали листья и побеги растений. В другом случае бактерии сначала центрифугировали при 10000 g в течение десяти минут, осадок ресуспендировали в водопроводной воде и полученную бактериальную суспензию использовали для опрыскивания листьев и побегов растений.

#### Пример 7.

Действие очищенных метаболитов из MA 342 против заболеваний, вызванных *Drechslera* spp., при экспериментах в теплицах

Штамм MA 342 вырастили за 48 часов в полуконцентрированном (15 г/л) триптон-соевом бульоне (Difco Ltd) на роторной качалке в темноте при 18-20°C. Полученную суспензию бактерий центрифугировали при 48000 g в течение 30 мин, а затем метаболиты в надосадочной жидкости подвергли дальнейшей очистке в патронах Sep-pak C 18 (Waters Associates) следующим образом:

1. 80 мл надосадочной жидкости влили в Sep-pak, активированному 10 мл метанола



2 Sep-pak промыли сначала 5 мл 30 % этанола, а затем 5 мл 40 % этанола

3 Метаболиты элюировали 5 мл 70 % этанола

4 70 % этанол-элюата выпарили в роторном испарителе, оставив примерно 1,5 мл водного раствора. Затем его разбавили водопроводной водой до объема 6,5 мл

Семена ячменя культурного сорта "Golf", естественно зараженные *D. teres*, погрузили в эти 6,5 мл водного раствора метаболитов на 30 мин, а

затем посеяли в банки по 50 семян. Банки накрыли стеклянными крышками и поместили в темное место при 6°C. Через 9 дней крышки сняли и банки поместили в теплицу при 15-22°C на примерно 2 недели. Число проросших и число пораженных болезнью растений подсчитали (см. Пример 4). Для контроля использовали необработанные семена и семена, обработанные надосадочной жидкостью, не очищенной в патроне Sep-pak и не содержащей клетки MA 342.

Таблица 14

Действие очищенных метаболитов из MA 342 и надосадочной жидкости, содержащей клетки MA 342, на *D. teres* на ячмене при обычных испытаниях в теплице

Вид обработки	% проросших растений	% растений с поражением первой листовой
Контроль (необработанные семена)	97, 0	21, 6
Надосадочная жидкость с клетками MA 342	99, 0	1, 0
Выпаренный элюат без клеток	99, 0	0, 0

#### Пример 8

Результаты сравнительных испытаний штамма MA 342 и 11 других изолятов бактерий *Pseudomonas chlororaphis*, полученных из разных коллекций культур

Одиннадцать разных не шведских изолятов *Pseudomonas chlororaphis* (см. Табл. 1) испытали вместе со штаммом MA 342 на действие против пятнистости листьев ячменя и на индукцию ответа в биохимических тестах согласно системе тестирования API 20 NE. Дополнительно, образцы сравнивали по появлению колоний и кристаллических образований на чашках агар. Эти одиннадцать не шведских изолятов были из различных стран и де-

понированы в четырех разных признанных коллекциях культур (Табл. 1).

Тест на способность подавлять заболевания при испытаниях в теплице

Тесты были проведены с ячменем, зараженным *Drechslera teres* (см. Пример 4) и для обеспечения адекватного сравнения все изоляты были испытаны одновременно. Как видно из Таблицы 1, результаты показывают, что MA 342 уникален в том смысле, что ни один из других испытанных изолятов не обладает таким свойством как MA 342 при таком тестировании, а именно - способность подавлять инфекцию, вызванную *Drechslera teres*.

Таблица 1

Названия образцов, страны происхождения и действие MA 342 и 11 других изолятов *P. chlororaphis* на ячмень, зараженный *D. teres* при испытаниях в теплице

Название образцов	Страна происхождения	Действие на пятнистость листьев при испытаниях в теплице. Зараженные растения после обработки конкретным изолятом, %
MA 342	Швеция	9
USDA B2075	Чехословакия	53
USDA B1869	Новая Зеландия	60
USDA B14874	США, Колорадо	56
USDA B14869	США, Иллинойс	58
USDA B1854	США, Луизиана	43
NCTC 10686	Англия	54
NCTC 7357	Англия	58
DSM 6508	Германия	56
ATCC 9446	США	61
ATCC 17414	США	50
ATCC 17811	США	58
Контроль (необработанные растения)		71

Индукция ответа при биохимических тестах согласно системе тестирования API 20 NE

Тесты проводились как описано выше. Результаты приведены в Табл. 2. Они показывают, что MA 342 и в этом отношении уникален и отли-

чается от остальных 11 испытанных изолятов. Некоторые из испытанных изолятов нельзя считать согласно этому тесту главными среди видов *Pseudomonas chlororaphis*.

Таблица 2

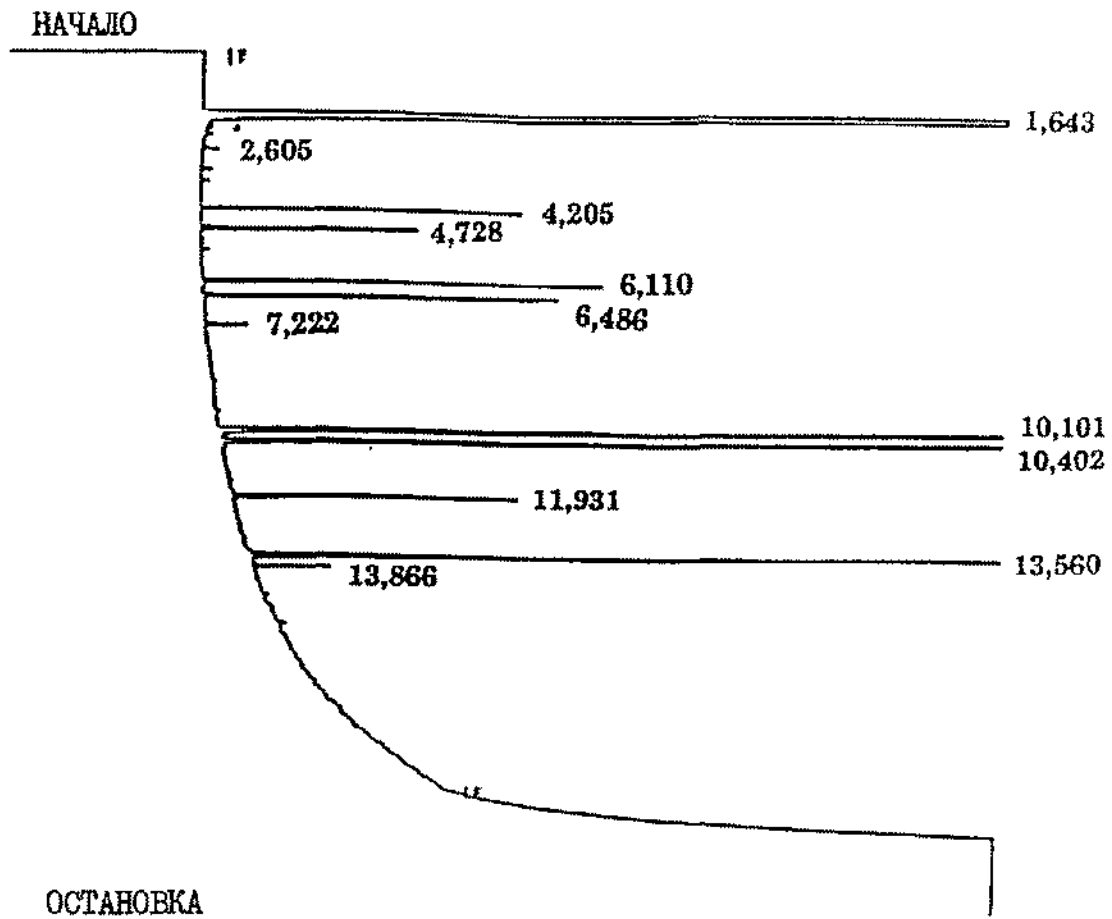
Ответ, индуцированный различными изолятами, использованными в нескольких биохимических тестах согласно системе тестирования API 20 NE "+" означает положительный ответ, "-" -нет/отрицательный ответ

Свойства в тестах по API 20 NE	Испытанный изолят											
	MA	B	B	B	B	B	NCTC	NCTC	DSM	ATCC	ATCC	ATCC
	342	2075	1869	14874	14869	1854	10686	7357	6508	9446	17414	17811
Восстановление нитратов	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Продукция индола	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Превращение глюкозы в кислоту	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Аргининдигидролаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Уреаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Гидролиз эскулина	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Гидролиз желатина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-галактозидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение глюкозы	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение арабинозы	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение маннозы	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение маннитола	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение глюкозамина	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение мальтозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение глюконата	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение капрата	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение адината	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение малата	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение цитрата	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Усвоение фенилацетата	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Цитохромоксидаза	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Сравнение появления колоний и образования кристаллов на чашках агар

Изоляты культивировали в чашках Петри на TSA 10, как описано выше. Наблюдали небольшую разницу в появлении колоний различных

изолятов, но по этому признаку все изоляты различить нельзя. Однако, изолят MA 342 был единственным, который образовывал типичные прозрачные кристаллы в агаре и по этому свойству его можно было отличить от всех других изолятов.



Тираж 50 экз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»  
 Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101  
 (03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03