

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392491** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.10.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.03.08**

(51) Int. Cl. *A01N 31/02* (2006.01)  
*A01N 37/12* (2006.01)  
*A01P 1/00* (2006.01)  
*A01P 3/00* (2006.01)  
*A01P 21/00* (2006.01)

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ СМЕСЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГЛИЦЕРИН И ГЛИЦЕРИДЫ  
ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ, В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ЛЕСОВОДСТВЕ**

---

(31) **102021000005360**  
(32) **2021.03.08**  
(33) **IT**  
(86) **PCT/IB2022/052023**  
(87) **WO 2022/189950 2022.09.15**

(71)(72) Заявитель и изобретатель:  
**ПАОЛИ АЛЕССИО; КАНТИНИ  
ФЕРНАНДО (IT)**

(74) Представитель:  
**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение описывает применение в сельском хозяйстве и/или лесоводстве смеси, содержащей: глицерин - 5-90%, и глицериды одной или нескольких органических кислот - 10-95%, где проценты являются массовыми процентами по отношению к общей массе смеси; причем указанную смесь используют в качестве фитостимулирующего средства для стимуляции прорастания семян и/или в качестве фунгицида/пестицида для защиты семян и/или культур от патогенных микроорганизмов.

**202392491**  
**A1**

**202392491**

**A1**

## ПРИМЕНЕНИЕ СМЕСЕЙ, СОДЕРЖАЩИХ ГЛИЦЕРИН И ГЛИЦЕРИДЫ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ, В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ЛЕСОВОДСТВЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к применению смесей глицерина и глицеридов органических кислот в сельском хозяйстве и лесоводстве, в частности для повышения всхожести семян и/или для защиты семян и/или культур от патогенных микроорганизмов.

Уровень техники

В сельскохозяйственной и лесной промышленности всегда существовала потребность в нетоксичных средствах для облегчения прорастания и/или защиты семян и/или культур от патогенных микроорганизмов.

Согласно современному уровню техники, наиболее широко используемыми и эффективными фунгицидами являются фунгициды на основе меди (например, Kocide®, Curzate®, Cuproxat®).

Ауксиновые агенты относятся к числу известных на сегодняшний день продуктов, способствующих прорастанию семян.

В WO/2010/106488 описана композиция, содержащая моноглицериды органических кислот C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> 10-90 масс.% и глицерин 10-90 масс.% для использования в качестве антибактериальных средств, и их применение в качестве кормовых добавок/жидкостей, предназначенных для кормления сельскохозяйственных животных, а также в качестве средств против плесени для консервирования зерновых.

Задачей настоящего изобретения является обеспечение нового способа для облегчения прорастания семян и/или защиты семян и/или культур от патогенных микроорганизмов.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является применение в сельском хозяйстве и/или лесоводстве смеси, содержащей или состоящей из:

глицерина - 5-90%, и

глицеридов одной или нескольких органических кислот - 10-95%,

где проценты являются массовыми процентами по отношению к общей массе смеси;

в частности, в качестве фитостимулирующих средств для стимуляции прорастания семян и/или в качестве фунгицидов/пестицидов для защиты семян и/или культур от патогенных микроорганизмов.

Неожиданно было замечено, что:

- обработка семян водными растворами указанных смесей увеличивает показатель всхожести, а также длину корешков;

- указанные смеси эффективны против патогенных грибов при предпосевной обработке инфицированных семян;

- указанные смеси были эффективны как *in vitro*, так и в полевых испытаниях в подавлении роста мицелия патогенных грибов, представляющих интерес для сельского хозяйства и лесоводства;

- указанные смеси продемонстрировали свою эффективность *in vitro* в отношении патогенных бактерий, представляющих интерес для сельского хозяйства, которые являются возбудителями тяжелых бактериальных заболеваний садоводческих и других видов растений;

- было продемонстрировано, что указанные смеси не оказывают неблагоприятного воздействия на азотфиксирующие бактерии, продуцирующие индолуксусную кислоту (IAA), стимулирующую рост корней;

- указанные смеси проявляют синергетический эффект при использовании в сочетании с фунгицидами на основе меди.

Объектом настоящего изобретения является фитостимулирующая композиция для стимуляции прорастания семян и увеличения длины корешков, где указанная композиция включает смесь, описанную выше.

Объектом изобретения также является способ увеличения всхожести семян и/или длины корешков, где указанный способ включает обработку семян путем пропитывания композицией как таковой или водным раствором смеси, как описано выше.

Объектом настоящего изобретения также является фунгицидно-пестицидная композиция, включающая смесь, описанную выше, и при необходимости фунгицид на основе меди.

Объектом изобретения также является фунгицидно-пестицидный способ, в котором сельскохозяйственную культуру обрабатывают композицией, описанной выше.

Объектом настоящего изобретения также является композиция для предпосевной обработки инфицированных семян или семян, восприимчивых к инфекции, причем указанная композиция содержит смесь, описанную выше.

Объектом настоящего изобретения также является способ предпосевной обработки инфицированного семени или семени, восприимчивого к инфекции, где указанный способ включает обеспечение контакта семени с композицией для предпосевной обработки, описанной выше.

### Раскрытие изобретения

Для целей настоящего изобретения применение в сельском и лесном хозяйстве понимается в буквальном смысле этого слова, т.е. использование при выращивании разных видов растений (от прорастания до сбора урожая). Для целей настоящего изобретения глицериды означают моно-, ди- и/или триглицериды и их смеси с органическими кислотами. Смеси согласно настоящему изобретению могут быть не только смесями моно-, ди- и/или триглицеридов одной органической кислоты, но также могут быть смесями, содержащими смешанные ди- и триглицериды 2 или более органических кислот.

Предпочтительно смеси для применения в соответствии с настоящим изобретением содержат 10-90% моноглицеридов, более предпочтительно 40-90%.

Предпочтительно содержание глицерина, смешанного с глицеридами, составляет 10-60%.

Предпочтительно в соответствии с настоящим изобретением органические кислоты выбирают из  $C_1$ - $C_{12}$  и  $C_{16}$ - $C_{20}$ .

Согласно настоящему изобретению органические кислоты предпочтительно выбраны из муравьиной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, масляной кислоты, изомасляной кислоты, валериановой кислоты, капроновой кислоты, гептановой кислоты, каприловой кислоты, нонановой кислоты, каприновой кислоты, ундекановой кислоты, лауриновой кислоты, жирных кислот из соевого масла (т.е. пальмитиновой кислоты; стеариновой кислоты; олеиновой кислоты; линолевой кислоты; линоленовой кислоты; арахионовой кислоты), щавелевой кислоты, адипиновой кислоты, янтарной кислоты, лимонной кислоты, винной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, салициловой кислоты, фумаровой кислоты, глюконовой кислоты, азелаиновой кислоты и их смесей.

Для целей настоящего изобретения предпочтительны смеси, содержащие глицерин и глицериды пропионовой кислоты, масляной кислоты, изомасляной кислоты, валериановой кислоты, капроновой кислоты, гептановой кислоты, каприловой кислоты, нонановой кислоты, каприновой кислоты, ундекановой кислоты, лауриновой кислоты, жирных кислот соевого масла и их смесей; более предпочтительно пропионовой кислоты, масляной кислоты, пропионовой кислоты + масляной кислоты, гептановой кислоты, лауриновой кислоты и жирных кислот сои.

Применение смесей в соответствии с настоящим изобретением оказалось особенно эффективным в повышении показателя всхожести и/или длины корешков семян базилика, помидоров, салата, редиса и кабачков.

Применение смесей согласно настоящему изобретению оказалось особенно эффективным при предпосевной обработке (протравливание, дражирование) семян пшеницы, инфицированных *Tilletia caries*.

Применение смесей согласно настоящему изобретению оказалось особенно эффективным в противодействии росту патогенных бактерий, таких как *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (DC 3000), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (СММ), *Pseudomonas savastanoi*.

Было продемонстрировано, что применение смесей в соответствии с настоящим изобретением не оказывает неблагоприятного воздействия на рост *Azospirillum brasilense* (азотфиксирующей бактерии).

Показано, что применение смесей согласно настоящему изобретению особенно эффективно для противодействия росту мицелия *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phytophthora cinnamoni*, *Phytophthora ramorum*, *Colletotrichum coccodes*, *Botryosphaeria dothidea* и *Colletotrichum lupini*.

В полевых испытаниях на виноградных культурах было показано, что использование смесей согласно настоящему изобретению эффективно в борьбе с *Plasmopara viticola*, и неожиданно было показано, что смеси по изобретению обладают синергетическим действием с продуктами на основе меди (такими как Curzate® или Cuproxat®), так что их дозы можно уменьшить вдвое для достижения той же эффективности.

Настоящее изобретение может быть лучше понято в свете следующих вариантов осуществления.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана схема приготовления продуктов, протестированных в данном описании.

На фиг. 2 показан способ подготовки чашек Петри, используемых для тестирования всхожести семян.

На фиг. 3 показано: (А) количество пророщенных семян базилика, обработанных продуктами из настоящего описания, по сравнению с контрольной группой, обработанной водой; (В) средняя величина корешков пророщенных семян в сантиметрах.

На фиг. 4 показано: (А) количество пророщенных семян томатов, обработанных продуктами из настоящего описания, по сравнению с контрольной группой, обработанной водой; (В) средняя величина корешков пророщенных семян в сантиметрах.

На фиг. 5 показано: (А) количество пророщенных семян салата, обработанных продуктами из настоящего описания, по сравнению с контрольной группой, обработанной водой. (В) средняя величина корешков пророщенных семян в сантиметрах.

На фиг. 6 показано: (А) количество пророщенных семян редиса, обработанных продуктами из настоящего описания, по сравнению с контрольной группой, обработанной водой; (В) средняя величина корешков пророщенных семян в сантиметрах.

На фиг. 7: показано: (А) количество пророщенных семян кабачков, обработанных продуктами из настоящего описания, по сравнению с контрольной группой, обработанной водой; (В) средняя величина корешков пророщенных семян в сантиметрах.

На фиг. 8 показаны микроскопические изображения спор *Tilletia caries*, обработанных (А) водой, (В) PR2, (С) PR3 и (D) PR4.

На фиг. 9 показана чашка Петри, использованная для теста на *Colletotrichum lupini*.

На фиг. 10 показаны результаты теста на виноградных лозах в теплице, зараженных искусственным инокулятом и обработанных продуктами по настоящему изобретению.

#### Экспериментальная часть

##### Пример 1. Общая процедура получения испытуемых смесей

Каждую реакцию этерификации проводили партиями по 10 000 кг в реакторе, оснащем вертикальным обратным холодильником.

Исходный глицерин и жирные/органические кислоты загружали в реактор при комнатной температуре, как показано в таблице 1.

Смесь нагревали до 110°C путем введения исходных материалов в реактор через вертикальный обратный холодильник.

Как только была достигнута температура 110°C, реакционную смесь нагревали до 150°C, постепенно повышая температуру на 2°C, поддерживая давление под контролем таким образом, чтобы оно не превышало 0,5 бар. Когда температура смеси достигла 150°C, температуру в верхней части вертикального конденсатора установили на 110°C, чтобы обеспечить испарение воды в результате реакции этерификации, и температуру реактора повысили до 235°C (235°C достигали путем постепенного повышения температуры на 1°C, всегда поддерживая давление <0,5 бар). Как только реакционная смесь достигала температуры 235°C, ее термостабилизировали до тех пор, пока значение свободной кислотности (определенное по методу ISO 660:2009) не становилось равным 2% или менее. При достижении этого значения, как только температура вертикального холодильника была установлена на уровне 140°C, создавался вакуум, который позволял

перегонять непрореагировавшую исходную кислоту и, следовательно, достигать значения свободной кислотности, равного 0,1% или менее.

Затем продукт сливали в охладитель и охлаждали до комнатной температуры.

Вышеупомянутая процедура также проиллюстрирована на блок-схеме на фиг. 1.

Таблица 1. Полученные смеси

№ продукта	Глицерин (кг)	Кислота (кислоты) (кг)	Кислота (кислоты)
PR 1	6875	Пропионовая кислота: 2250 Масляная кислота: 875	Пропионовая кислота Масляная кислота
PR 2	3000	7000	Пропионовая кислота
PR 3	6000	Валериановая кислота: 116 Капроновая кислота: 1004 Гептановая кислота: 360 Каприловая кислота: 1332 Нонановая кислота: 1188	Валериановая кислота Капроновая кислота Гептановая кислота Каприловая кислота Нонановая кислота
PR 4	6000	4000	Нонановая кислота
PR 5	3500	6500	Масляная кислота
PR 6	3000	7000	Лимонная кислота
PR 7	3000	7000	Адипиновая кислота
PR 8	3000	7000	Бензойная кислота
PR 9	7000	3000	Лауриновая кислота
PR 10	6000	Каприловая кислота: 2200 Каприновая кислота: 1800	Каприловая кислота Каприновая кислота
PR 11	3200	6800	Валериановая кислота
PR 12	3000	7000	Уксусная кислота
PR 13	3000	7000	Салициловая кислота
PR 14	2500	7500	Фумаровая кислота
PR 15	3000	7000	Глюконовая кислота
PR 16	6500	3500	Ундекановая кислота
PR 17	3000	7000	Изомасляная кислота
PR 18	3500	6500	Янтарная кислота
PR 19	7300	2700	Жирные кислоты из соевого масла <sup>1</sup>
PR 20	6000	4000	Каприловая кислота
PR 21	3500	6500	Щавелевая кислота
PR 22	3000	7000	Муравьиная кислота
PR 23	4000	6000	Масляная кислота
PR 24	7300	2700	Масляная кислота
PR 25	6500	3500	Масляная кислота
PR 26	8100	1900	Масляная кислота
PR 27	3000	7000	Гептановая кислота
PR 28	4000	6000	Гептановая кислота
PR 29	5000	5000	Гептановая кислота
PR 30	6000	4000	Гептановая кислота
PR 31	3500	6500	Азелаиновая кислота
PR 32	6000	4000	Азелаиновая кислота
PR 33	6500	3500	Масляная кислота
PR 34	3000	7000	Пропионовая кислота
PR 35	3000	7000	Винная кислота
PR 36	3000	7000	Коричная кислота
PR 37	4000	6000	Коричная кислота
PR 38	5500	4500	Коричная кислота
PR 39	6000	4000	Коричная кислота

PR 40	7000	3000	Пропионовая кислота
-------	------	------	---------------------

<sup>1</sup> пальмитиновая кислота 8-13,5%; стеариновая кислота 2-5,4%; олеиновая кислота 17-30%; линолевая кислота 48-59%;  $\alpha$ -линоленовая кислота 4,5-11; арахидоновая кислота 0,1-0,6%, где масс.% относятся к общей массе жирных кислот из соевого масла.

Пример 2. Характеристика продуктов, полученных из Примера 1.

Все продукты, полученные в соответствии с Примером 1, характеризовали и анализировали с использованием следующих аналитических методов, приведенных в таблице 2.

Таблица 2. Аналитические методы, используемые для определения химических характеристик продуктов

Аналитический параметр	Метод анализа
Свободный глицерин	Пример 2.1
Глицериды из жирных/органических кислот	Пример 2.2
Влажность	ISO 8534:2017
Свободная кислотность (F.F.A.)/ Кислотное число	ISO 660:2009
Зольный остаток	ISO 6884:2008
Число омыления	ISO 3657:2013

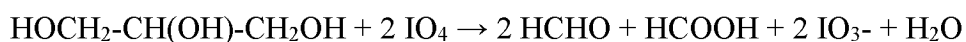
Пример 2.1. Определение содержания свободного глицерина

2.1.1. Предмет исследования

Эта методика описывает процесс титрования для определения содержания глицерина в продуктах, включающих моно- и триглицериды жирных/органических кислот и глицерин. Методика применима как к жидким, так и к порошковым продуктам.

2.1.2. Принцип действия метода

При холодном окислении глицерина метапериодатом натрия в кислой среде образуется муравьиная кислота в соответствии со следующей реакцией:



После удаления избытка периодата 1,2-этанジオлом муравьиную кислоту, полученную в результате реакции, титруют стандартным титровальным раствором гидроксида калия с использованием индикатора бромтимолового синего.

2.1.3. Процедура

Добавляют навеску 0,30-0,40 г пробы для анализа в мерный стакан вместимостью 600 мл.

Добавляют к образцу 50 мл дистиллированной воды, используя мерный цилиндр объемом 50 мл. После добавления воды добавляют 0,15-0,20 г индикатора бромтимолового синего (0,4% спиртовой раствор) с помощью пастеровской пипетки и подкисляют 0,01 н раствором соляной кислоты до тех пор, пока раствор не станет желто-зеленым (этот этап подкисления следует проводить только в том случае, если раствор еще не стал желтым).



Добавляют 0,1 н гидроксид калия по каплям, пока цвет раствора не станет синим без какого-либо зеленого оттенка.

Добавляют 50 мл раствора метапериодата натрия (60 г/л), аккуратно перемешивают и накрывают стакан часовым стеклом. Выдерживают/проводят реакцию (30 минут) в темноте.

По истечении времени реакции добавляют 10 мл раствора этиленгликоля, осторожно перемешивают и накрывают стакан часовым стеклом на время реакции (20 минут) в темноте.

По истечении времени реакции добавляют дистиллированную воду до объема 300 мл, добавляют 0,15-0,20 г индикатора бромтимолового синего с помощью пастеровской пипетки и осторожно перемешивают.

Титруют раствор 0,1 н раствором гидроксида калия до тех пор, пока раствор не станет синим без зеленого оттенка.

Одновременно с вышеуказанным определением и в тех же условиях проводят пробный тест без образца, используя те же количества реагентов.

#### 2.1.4. Выражение результата

Титр глицерина определяют в процентах по массе по формуле:

$$\text{Содержание глицерина} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 9,209}{m},$$

где

$V_1$  = объем (мл) раствора гидроксида калия, используемого для титрования образца;

$V_0$  = объем (мл) раствора гидроксида калия, использованного для холостого теста;

$N$  = коэффициент нормальности стандартного титровального раствора гидроксида калия;

$m$  = масса (г) образца, взятого для определения.

#### Пример 2.2. Определение содержания глицеридов жирных/органических кислот

Эту методику расчета используют для определения общего содержания глицеридов в смесях, содержащих только свободный глицерин, воду, глицериды и свободные жирные/органические кислоты.

Эта методика может быть применена только после определения других параметров с использованием следующих методов:

- Содержание воды: ISO 8534:2017
- Свободный глицерин: метод из Примера 2.1
- Свободная кислотность: ISO 660:2009

Содержание глицеридов (GC) рассчитывают, как показано ниже:

$GC = 100 - (WC + FG + FFA)$ , где:

GC = содержание глицеридов в жирных/органических кислотах

WC = содержание воды

FG = Свободный глицерин

FFA = Свободная кислотность

Пример 2.3. Расчет содержания кислоты (% на 100 г продукта)

$$\% \text{ кислоты на } 100 \text{ г продукта} = \frac{\text{Число омыления} \times \text{PM}}{56,1} \times 10$$

где

PM = Молекулярная масса жирной/органической кислоты

56,1 = Молекулярная масса гидроксида калия (KOH 0,1 н)

В таблице 3 приведены химико-физические характеристики продуктов, полученных из исходных материалов, перечисленных в Таблице 1.

Таблица 3. Химические и физические характеристики продуктов

Код продукта	Свободный глицерин (%)	Глицериды (%)	Влажность (%)	Кислотное число (мгКОН/г)	Зольный остаток	Число омыления (мг КОН/г)	Количество кислоты в продукте (%)	Физическое состояние при комнатной температуре	Физическое состояние при +4°С	Физическое состояние при -8°С	Точка плавления (°С)
PR 1	39,4	48,9	9,32	13,34	1,4	178,3	нп	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 2	37,3	44,2	14,80	6,82	2,90	188,3	24,8	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 3	17,3	82,3	0,07	1,10	0,00	253,6	нп	Жидкость	Твердое вещество	Жидкость	--
PR 4	14,6	83,5	0,84	3,91	0,00	196,3	55,3	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	35
PR 5	41,3	58,5	0,10	0,64	0,00	241	37,8	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 6	43,9	54,3	0,18	3,51	0,00	222	76,0	Жидкость	Жидкость	Твердое вещество	--
PR 7	39,0	60,7	0,07	1,92	0,00	255,1	66,4	Жидкость	Жидкость	Твердое вещество	--
PR 8	51,1	48,1	0,31	2,30	0,00	148,5	32,3	Жидкость	Жидкость	Твердое вещество	--
PR 9	9,2	90,5	0,11	0,56	0,00	219,7	78,3	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	50
PR 10	15,1	84,7	0,12	0,51	0,00	231	нп	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	23
PR 11	39,2	55,8	4,1	4,95	0,00	208,6	37,9	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 12	40	58,7	1,08	1,87	0,00	280	29,9	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 13	62,7	33,9	0,79	10,6	0,00	57,2	14,1	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 14	28,7	69,7	1,17	2,18	0,00	284,2	58,8	Жидкость	Твердое вещество	Твердое вещество	--
PR 15	нп	нп	2,67	нп	0,00	81,9	28,6	Жидкость	Жидкость	Твердое вещество	--
PR 16	12,1	85,3	0,72	5,67	0,00	220,8	73,2	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	35
PR 17	49,9	49,7	0,2	1,28	0,00	220,1	34,5	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 18	26,8	70,0	2	5,56	0,00	338	71,1	Жидкость	Твердое вещество	Твердое вещество	--
PR 19	17,7	80,6	1,18	2,8	0,00	158,4	нп	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	37
PR 20	14,3	84,2	0,78	3,00	0,00	252,5	64,8	Жидкость	Твердое вещество	Твердое вещество	--

PR 21	72,9	14,2	8,3	28,7	0,00	178,7	28,7	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 22	78,1	19,0	1,38	18,8	0,00	281,4	23,1	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 23	32	67,6	0,17	1,28	0,00	275	43,1	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 24	0,7	99,1	0,12	0,64	0,00	507,2	79,6	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 25	2,7	96,7	0,45	1,28	0,00	452,4	71,0	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 26	0	99,7	0,04	1,91	0,00	543,4	85,2	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 27	53,5	44,7	0,68	4,96	0,00	134,1	31,1	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 28	39,4	56,9	1,97	7,12	0,00	179	41,5	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 29	26,1	73,7	0,06	0,73	0,00	228,1	52,9	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 30	12,5	84,1	1,62	7,64	0,00	277,5	64,3	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 31	39,6	56,9	1,27	6,56	0,00	220	73,7	Жидкость	Твердое вещество	Твердое вещество	--
PR 32	5,2	88,9	1,11	16,7	0,00	403,7	нп	Жидкость	Твердое вещество	Твердое вещество	--
PR 33	0,97	95,6	1,02	15,3	0,00	457,2	71,7	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 34	46,7	51,5	1,40	3,03	0,00	227	29,9	Жидкость	Жидкость	Жидкость	--
PR 35	58,4	39,5	1,79	1,05	0,00	231	61,8	Жидкость	Твердое вещество	Твердое вещество	--
PR 36	57,2	38,9	1,19	10,2	0,00	111,7	29,5	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	>95
PR 37	39,1	59,3	1,22	1,52	0,00	165,1	43,6	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	>95
PR 38	20,8	78,9	0,3	0,00	0,00	224,7	59,3	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	>95
PR 39	15,8	83,9	0,3	0,00	0,00	249,1	65,7	Твердое вещество	Твердое вещество	Твердое вещество	>95
PR 40	0,13	99,3	0,48	0,91	0,00	639	84,3	Жидкость	Жидкость	Жидкость	

Пример 2.4. Количественное определение моно-, ди- и три-глицеридов масляной кислоты

#### 2.4.1. Предмет исследования

Эта методика описывает процедуру количественного определения монобутирата глицерина, дибутирата глицерина, трибутирата глицерина как в жидких, так и в твердых образцах.

#### 2.4.2. Принцип действия метода

Жидкую пробу, содержащую смесь компонентов в различных соотношениях, смешивают с определенным внутренним стандартом. Добавляют реагент для ацетилирования и проводят реакцию ацетилирования свободных ОН-функциональных групп глицерина. После разбавления образец вводят в газовый хроматограф, оснащенный встроенным инжектором, неполярной капиллярной колонкой и детектором FID.

#### 2.4.3 Условия работы газового хроматографа

Расход газа-носителя (гелий): 1,5 мл/мин

Диапазон температур колонки: 50°C (1 мин) → 120°C (20°C/мин) → 230°C (7°C/мин) + (5 минут в изотермическом режиме)

Детектор FID: 300°C

Тип инжектора: встроенный

#### 2.4.4. Процедура

Добавляют навеску приблизительно 20 мг 1,2,4-бутантриола в пробирку вместимостью 10 мл с завинчивающейся крышкой (точность взвешивания  $\pm 0,0001$  г) и приблизительно 100 мг образца (точность взвешивания  $\pm 0,0001$  г). Используя пипетку, добавляют 5 мл ацетилирующего реагента (в мерную колбу вместимостью 100 мл добавляют 50 мл этилацетата, 23 мл (или 24,8 г) уксусного ангидрида, 1 мл дистиллированной воды и 2 мл 1-метилимидазола. Доводят до метки с помощью этилацетата). Аккуратно закрывают пробирку и нагревают ее в течение 15 минут на водяной бане, разогретой до 80°C. Охлаждают пробирку, открывают завинчивающуюся крышку и отбирают примерно 100 мкл реакционной смеси с помощью микрошприца. Переносят ее в новую пробирку, разбавляют 5 мл изооктана или н-гептана и вводят в газовый хроматограф.

#### 2.4.5. Выражение результатов

При расчете результатов необходимо учитывать несколько констант.

В таблице 4 приведены молекулярные массы компонентов, представляющих интерес.

Таблица 4. Молекулярные массы компонентов

Вещество	Молекулярная масса
Глицерин	92
Глицерина триацетат	218
Бутантриол	106
Бутантриола триацетат	232
Глицерина монобутират	162
Глицерина монобутират диацетат	246
Глицерина дибутират	232
Глицерина дибутират моноацетат	274
Глицерина трибутират	302

Отклик FID для различных сложных эфиров оказывает сильное влияние на результаты анализа. В таблице 5 приведены экспериментально рассчитанные коэффициенты отклика для всех компонентов.

Таблица 5. Коэффициенты отклика

Вещество	Коэффициент отклика (RRF)
Глицерина триацетат	1,08
Бутантриола триацетат	1,00
Глицерина монобутират диацетат	0,94
Глицерина дибутират моноацетат	0,80
Глицерина трибутират	0,67

Содержание отдельных компонентов в масс.% рассчитывали следующим образом:

Бутантриола триацетат (мг): масса 1,2,4-бутантриола  $\times$  (232/106)

Глицерина монобутират (масс.%) = (площадь глицерина монобутирата / площадь бутантриола триацетата)  $\times$  RRF  $\times$  (162/246)  $\times$  масса бутантриола триацетата  $\times$  (100/масса образца)

Глицерина дибутират (масс.%) = (площадь глицерина дибутирата/площадь бутантриола триацетата)  $\times$  RRF  $\times$  (232/274)  $\times$  масса бутантриола триацетата  $\times$  (100/масса образца)

Глицерина трибутират (масс.%) = (площадь глицерина трибутирата / площадь бутантриола триацетата)  $\times$  RRF  $\times$  масса бутантриола триацетата  $\times$  (100/масса образца)

Пример 2.5. Количественное определение моно-, ди- и три-глицеридов лауриновой кислоты

#### 2.5.1 Предмет исследования

Эта методика описывает процедуру количественного определения глицерина монолаурата, глицерина дилаурата, глицерина трилаурата как в жидких, так и в твердых образцах.

#### 2.5.2 Принцип метода

Образец, содержащий смесь компонентов в различных соотношениях, получают в виде триметилсилилового эфира (TMSE). К образцу добавляют силанизирующие агенты и проводят реакцию со свободными OH-группами глицерина при комнатной температуре с

использованием пиридина в качестве катализатора. После разбавления образец вводят в газовый хроматограф, оснащенный встроенным инжектором, неполярной капиллярной колонкой и детектором FID.

Все количественные измерения проводят путем сравнения результатов, полученных методом газовой хроматографии, с числом омыления образца, выраженным в мг КОН/г и определенным в соответствии с методом ISO 3657:2013.

#### 2.5.3. Условия работы газового хроматографа

Расход газа-носителя (гелий): 1,5 мл/мин

Диапазон температур колонки: 50°C (1 мин) →120°C (20°C/мин) →230°C (7°C/мин) →360°C (10°C/мин) + (5 минут в изотерме)

Детектор FID: 300°C

Тип инжектора: встроенный

#### 2.5.4. Процедура

Добавляют навеску приблизительно 5-10 мг типичного образца в пробирку объемом 10 мл с завинчивающейся крышкой (точность взвешивания  $\pm 0,0001$  г). Растворяют образец в 50 мкл пиридина и добавляют 50 мкл реагента для силанизации (99 частей бис-триметилсилилтрифторацетамида + 1 часть триметилхлорсилана). Аккуратно закрывают пробирку и выдерживают при комнатной температуре в течение 20 минут.

По истечении времени реакции разбавляют пробу 6 мл н-гептана или изооктана, вводят 1 мкл в газовый хроматограф, используя один микрошприц.

#### 2.5.5. Выражение результатов

При расчете результатов необходимо учитывать несколько констант.

В Таблице 6 приведены молекулярные массы веществ, представляющих интерес.

Таблица 6. Молекулярные массы компонентов

Вещество	Молекулярная масса
Глицерина монолаурат	274
Глицерина дилаурат	456
Глицерина трилаурат	638

Отклики FID для различных сложных эфиров оказывают сильное влияние на результаты анализа. В таблице 7 приведены экспериментально рассчитанные коэффициенты отклика для всех компонентов.

Таблица 7. Коэффициенты отклика

Вещество	Коэффициент отклика (RRF)
Глицерина монолаурат	1,00
Глицерина дилаурат	0,82
Глицерина трилаурат	0,73

Скорректированные площади пиков каждого компонента рассчитывают следующим образом:

Глицерина монолаурат (МО): Площадь глицерина монолаурата / RRF

Глицерина дилаурат (ДИ): Площадь глицерина дилаурата / RRF

Глицерина трилаурат (ТРИ): Площадь глицерина трилаурата / RRF

Содержание отдельных компонентов в масс.% рассчитывают следующим образом:

Глицерина монолаурат (масс.%):  $100 \times \text{МО} / (\text{МО} + \text{ДИ} + \text{ТРИ})$

Глицерина дилаурат (масс.%):  $100 \times \text{ДИ} / (\text{МО} + \text{ДИ} + \text{ТРИ})$

Глицерина трилаурат (масс.%):  $100 \times \text{ТРИ} / (\text{МО} + \text{ДИ} + \text{ТРИ})$

В таблице 8 приведены количества моноглицеридов, диглицеридов и триглицеридов в некоторых продуктах.

Таблица 8. Количественная характеристика продуктов

Продукт	Моноглицериды (%)	Диглицериды (%)	Триглицериды (%)
PR 5	47,00	13,00	1,00
PR 9	42,00	39,00	8,00
PR 23	50	18	1
PR 24	9	44	44
PR 25	26	50	19
PR 26	0	0	99
PR 33	21	50	23

Пример 3. Испытания на всхожесть

Для расчета индекса всхожести (GI) ряда сортов семян (см. таблицу 9) после обработки одним из продуктов PR1-PR40, описанных выше, был проведен следующий тест:

Каждый тестируемый продукт разбавляли до 2-3 различных концентраций (используя стерильную деионизированную воду и эмульгатор E433).

Эксперимент проводили на чашке Петри: каждую чашку, содержащую 15 семян, помещали между двумя дисками промокательной бумаги, тщательно пропитанными тестируемым продуктом (фиг. 2) в концентрациях, указанных выше (например, для продукта № 1 была подготовлена чашка Петри с 15 семенами, помещенными между двумя дисками промокательной бумаги, пропитанной водой, чашка с 15 семенами, помещенными между двумя дисками промокательной бумаги, пропитанной 0,1% продукта, чашка с 15 семенами, помещенными между двумя дисками промокательной бумаги, пропитанной 0,5% продукта, и чашка с 15 семенами, помещенными между двумя дисками промокательной бумаги, пропитанной 10% раствором продукта). Чашки, содержащие семена, инкубировали в течение времени и при температурах, указанных в таблице 9. После инкубации отмечали общее количество проросших семян на каждой чашке и длину каких-либо корешков в сантиметрах



Таблица 9. Экспериментальные условия испытания на всхожесть

Семена	Концентрация тестируемого продукта (масс.%)	Условия инкубации	Результаты
Семена <i>Ocimum basilicum</i> L., неаполитанского сорта салата-латука листового, по нормам ЕС чистота 97%, всхожесть 65%	0,1; 0,5; 10	7 дней при 37°C	Фиг. 3
Семена <i>Solanum lycopersicum</i> L., сорт ромэн	0,1; 0,5; 10	12 дней при 30°C	Фиг. 4
Семена латука сорта с чехлом	1,25; 5	8 дней при 30°C	Фиг. 5
Семена редиса	1,25; 5	4 дня при 30°C	Фиг. 6
Семена кабачка	1,25; 5	4 дня при 30°C	Фиг. 7

Результаты и обсуждение для базилика (фиг. 3):

Было показано, что несколько продуктов по настоящему изобретению демонстрируют эффект увеличения количества проросших семян по сравнению с контролем. Это увеличение было очевидным и значительным для продуктов №№ 2, 6 и 9 (увеличение составило от 120% до 140% по сравнению с контрольной группой), которые оказались наиболее активными из продуктов даже при самой низкой концентрации (0,1%).

Продукт № 9 также обладал превосходной активностью при самой высокой концентрации (0,5%).

Ни один из вышеперечисленных продуктов не продемонстрировал своей эффективности в увеличении длины корешков пророщенных семян.

Единственным продуктом, который показал себя более эффективным, чем контроль, был продукт № 28. Фактически, значительное увеличение длины корешков также наблюдается при использовании продукта № 28 в самой низкой концентрации (0,1%).

Результаты и обсуждение для томатов (фиг. 4):

Что касается прорастания семян томатов, то почти все протестированные продукты показали свою активность.

Среди них продукты №№ 21, 22, 34, 35 и 39 продемонстрировали значительный эффект даже при самой низкой концентрации (0,1%), значительно увеличивая количество проросших семян по сравнению с контрольной группой, обработанной только водой.

Однако, что касается длины корешков, то ни один из протестированных продуктов не продемонстрировал большей эффективности, чем вода.

Из протестированных продуктов наибольшей эффективностью обладали продукты № 35 и № 36.

Результаты и обсуждение для салата (фиг. 5):

Продукты №№ 6, 7 и 19 проявляют эффективность даже при самой низкой концентрации (1,25%). В то же время продукты 9 и 19 показали эффективность даже при более высоких концентрациях, равных 5%.

Остальные протестированные продукты менее эффективны для прорастания семян томатов, чем вышеупомянутые продукты, но все же более эффективны, чем вода.

Что касается длины корешков, то продукты №№ 6, 7, 9 и 19, так же как и в отношении всхожести семян продемонстрировали хорошую эффективность роста.

Результаты и обсуждение для редиса (фиг. 6):

Продукты 9 и 19 даже при самой низкой протестированной концентрации (1,25%) продемонстрировали значительную эффективность в отношении прорастания семян редиса.

С другой стороны, на длину корешков, по-видимому, влияет только продукт 9, в то время как другие протестированные продукты, увеличивая количество проросших семян, не доказали своей эффективности в удлинении корешков.

Результаты и обсуждение для кабачка (фиг. 7):

Продукты № 6, 9, 37, 38 и 40 положительно влияют на прорастание семян кабачков, в то же время ни один из протестированных продуктов не способствует росту корешков по сравнению с водой.

Таким образом, можно сделать вывод, что двумя продуктами, которые обладают наилучшей активностью как в отношении прорастания семян, так и в отношении увеличения длины корешков, являются продукты № 9 и № 19.

В любом случае ясно, что многое зависит как от семян, обрабатываемых продуктами, охватываемыми настоящим изобретением, так и от исследуемой фазы. На самом деле результаты демонстрируют, что некоторые продукты можно использовать для увеличения всхожести семян, в то время как другие являются отличными стимуляторами роста корней.

Пример 4. Предпосевная обработка семян пшеницы, зараженных *Tilletia caries*

Анализ эффективности обработки семян продуктами №№ 2, 3 и 4 был проведен на пшенице, естественным образом инфицированной *Tilletia caries*. Предпосевную обработку (дражирование) проводили методом погружения (100 мл на 30 г семян) с использованием водного раствора продуктов в концентрации 0,1%.

Только пребывание в растворе в течение 24 часов полностью подавляло прорастание *Tilletia caries*, что приводило к полному опорожнению клеточного

содержимого спор, тогда как пребывание в течение 1 и 3 часов не оказывало никакого влияния на прорастание спор.

При этом не было зафиксировано никакого неблагоприятного влияния на всхожесть семян.

На фиг. 8 показаны результаты микроскопического анализа спор *Tilletia caries*, обработанных (A) водой (контроль), (B) PR2, (C) PR3 и (D) PR4.

#### Пример 5. Испытания на грибки

Была протестирована эффективность *in vitro* некоторых продуктов по настоящему изобретению в ингибировании роста мицелия патогенных грибов, представляющих интерес для сельского хозяйства и лесоводства.

В качестве субстрата для выращивания использовали мальто-агар, 3 повторности для контроля без добавления продуктов и 3 повторности для каждого из продуктов в различных концентрациях.

Увеличение диаметра измеряли ежедневно для каждой повторности. Продукты, добавленные в субстрат для выращивания, были протестированы в концентрациях 1, 2 и 10%.

В следующих таблицах значение, выраженное в сантиметрах (см), относится к среднему росту из 3 повторностей.

Таблица 10. *Botrytis cinerea*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 1 день	Рост (см) спустя 2 дня	Рост (см) спустя 3 дня	Рост (см) спустя 4 дня	Рост (см) спустя 5 дней
Контроль		0,9	3,5	5,4	6,9	8,5
PR1	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR2	1%	0	0	0,3	0,3	0,3
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR3	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0,6	1,1	1,5	1,5
	2%	0	0,4	1	1,3	1,3
	10%	0	0	0	0	0

Таблица 11. *Fusarium graminearum*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 1 день	Рост (см) спустя 2 дня	Рост (см) спустя 3 дня	Рост (см) спустя 4 дня	Рост (см) спустя 5 дней	Рост (см) спустя 6 дней	Рост (см) спустя 7 дней
Контроль		0	0,4	2,2	3,9	6,2	7,1	8,5

PR1	1%	0	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0	0
PR2	1%	0	0	0	0,5	1,3	1,9	3,1
	2%	0	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0	0
PR3	1%	0	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0	0	0,7	1,4	2,2	3,2
	2%	0	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 12a. *Fomitiporia mediterranea*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 1 день	Рост (см) спустя 2 дня	Рост (см) спустя 3 дня	Рост (см) спустя 4 дня	Рост (см) спустя 5 дней
Контроль		0	0	0,5	0,9	1,3
PR1	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR2	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR3	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0

Таблица 12b. *Fomitiporia mediterranea*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 6 дней	Рост (см) спустя 7 дней	Рост (см) спустя 8 дней	Рост (см) спустя 9 дней	Рост (см) спустя 10 дней
Контроль		1,7	2,2	2,7	3,2	3,6
PR1	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR2	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR3	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0

	10%	0	0	0	0	0
--	-----	---	---	---	---	---

Таблица 13а. *Phaeomoniella chlamydospora*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 1 день	Рост (см) спустя 2 дня	Рост (см) спустя 3 дня	Рост (см) спустя 4 дня	Рост (см) спустя 5 дней
Контроль		0	0	0	0,3	0,4
PR1	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR2	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR3	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0

Таблица 13б. *Phaeomoniella chlamydospora*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 6 дней	Рост (см) спустя 7 дней	Рост (см) спустя 8 дней	Рост (см) спустя 9 дней	Рост (см) спустя 10 дней
Контроль		0,6	0,6	0,9	1,1	1,1
PR1	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR2	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR3	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0

Таблица 14. *Phytophthora cinnamoni*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 1 день	Рост (см) спустя 2 дня	Рост (см) спустя 3 дня	Рост (см) спустя 4 дня	Рост (см) спустя 5 дней	Рост (см) спустя 6 дней
Контроль		0,7	2,2	3,8	5,4	7	8,5
PR1	1%	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0
PR2	1%	0,2	1,1	2,2	3,3	4,4	5,5
	2%	0	0,2	0,7	1,3	1,9	2,5
	10%	0	0	0	0	0	0

PR3	1%	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0	0,5	1,3	1,9	2,4
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0

Таблица 15. *Phytophthora ramorum*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 1 день	Рост (см) спустя 2 дня	Рост (см) спустя 3 дня	Рост (см) спустя 4 дня	Рост (см) спустя 5 дней	Рост (см) спустя 6 дней
Контроль		0	0	0,7	1,2	1,7	2,3
PR1	1%	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0
PR2	1%	0	0	0	0,6	1,1	1,6
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0
PR3	1%	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0
PR4	1%	0	0	0	0	0	0
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0
PR5	1%	0	0	0	0,3	0,7	1,1
	2%	0	0	0	0	0	0
	10%	0	0	0	0	0	0

В следующих тестах в качестве субстрата для выращивания использовали PDA (картофельный декстрозный агар), 3 повторности для контроля без добавления продуктов и по 3 повторности для каждого из продуктов в концентрациях 0,1% и 0,2%.

В следующих таблицах значение, выраженное в сантиметрах (см), относится к среднему росту в 3 повторностях.

Таблица 16. *Botrytis cinerea*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 5 дней	Рост (см) спустя 6 дней	Рост (см) спустя 7 дней
Контроль		4,95	5,73	6,20
PR1	0,5 %	3,25	4,08	4,95
PR2	0,5 %	3,07	4,08	4,82
PR3	0,5 %	0	0	0,15
PR4	0,5 %	0,18	0,18	0,42
PR5	0,5 %	3,23	3,72	3,90

Таблица 17. *Colletotrichum coccodes*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 5 дней	Рост (см) спустя 6 дней	Рост (см) спустя 7 дней
Контроль		2,88	3,58	4,25

PR1	0,5 %	0,52	0,92	1,45
PR2	0,5 %	1,03	1,12	1,55
PR3	0,5 %	0,30	0,47	0,61
PR4	0,5 %	0,67	0,92	1,35
PR5	0,5 %	0,48	0,75	0,97

В следующих тестах в качестве субстрата для выращивания использовали PDA (картофельный декстрозный агар), 3 повторности для контроля без добавления продуктов и по 3 повторности для каждого из продуктов в концентрациях 0,1% и 0,2%.

В следующих таблицах значение, выраженное в сантиметрах (см), относится к среднему росту в 3 повторностях.

Таблица 18. *Botryosphaeria dothidea*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 4 дня
Контроль		4,68
PR2	0,1%	4,76
PR2	0,2%	4,33
PR3	0,1%	2,66
PR3	0,2%	1,68
PR4	0,1%	2,80
PR4	0,2%	2,30

Таблица 19. *Botrytis cinerea*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 4 дня
Контроль		7,85
PR2	0,1%	6,21
PR2	0,2%	5,58
PR3	0,1%	1,60
PR3	0,2%	1,30
PR4	0,1%	1,26
PR4	0,2%	0

Таблица 20. *Fomitiporia Mediterranea*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 4 дня
Контроль		1,33
PR2	0,1%	1,20
PR2	0,2%	0,90
PR3	0,1%	0
PR3	0,2%	0
PR4	0,1%	0
PR4	0,2%	0

Таблица 21. *Fusarium Graminearum*

Продукт	Предпосевная обработка (масс.%)	Рост (см) спустя 4 дня
Контроль		5,73
PR2	0,1%	5,43
PR2	0,2%	4,83
PR3	0,1%	2,78
PR3	0,2%	1,80
PR4	0,1%	3,25
PR4	0,2%	1,91

В таблицах 22а и 22b вместо этого приведены результаты испытаний, проведенных для другого гриба, представляющего сельскохозяйственный интерес, такого как *Colletotrichum lupini*, возбудителя тяжелого антракноза. Для проведения скрининга веществ на чашке с агаром для испытуемого гриба продукты разбавляли до концентраций 1,25% и 5%. Гриб культивировали на чашке, а затем использовали для инокуляции новых чашек с различными тестируемыми продуктами. Были протестированы все продукты от № 1 до № 40. В таблице приведены только те продукты, где наблюдалось подавление роста грибов.

4 различных продукта (по 1 капле по 10 мкл на продукт, по 2 повторности на каждый) помещали на каждую чашку, как показано на фиг. 9. Затем чашки инкубировали в течение 24 часов при температуре 26°C. Через 24 часа «свободную зону», образовавшуюся вокруг каждой капли, измеряли в сантиметрах (измеряли радиус от центра капли). Были показаны только те продукты, которые продемонстрировали эффективность.

Таблица 22а. *Colletotrichum lupini* (продукты разбавляли до 5%)

Продукт	Концентрация	Свободная зона (см)
Продукт 9	5%	0,6
Продукт 20	5%	0,8
Продукт 24	5%	0,6
Продукт 25	5%	0,2
Продукт 26	5%	0,3
Продукт 27	5%	0,3
Продукт 28	5%	0,4
Продукт 29	5%	0,5
Продукт 30	5%	0,4
Продукт 38	5%	0,3
Продукт 39	5%	0,3
Продукт 40	5%	0,4

Таблица 22b. *Colletotrichum lupini* (Продукты разбавляли до 1,25%)

Продукт	Концентрация	Свободная зона (см)
Продукт 20	1,25%	0,6
Продукт 27	1,25%	0,2
Продукт 28	1,25%	0,3
Продукт 29	1,25%	0,5

Результаты и обсуждение:

Продукт 3 и продукт 4 оказались наиболее эффективными в противодействии росту мицелия *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phytophthora cinnamoni*, *Phytophthora ramorum*, *Colletotrichum coccodes* и *Botryosphaeria dothidea* даже при очень низких концентрациях (0,1 и 0,2%). Что касается патогенного гриба *Colletotrichum lupini*, то наиболее эффективными оказались продукты № 20 и № 29 (в концентрации 1,25%) и № 9 и № 20 (в концентрации 5%).



### Пример 6. Тесты на бактерии

Была протестирована эффективность *in vitro* некоторых продуктов по настоящему изобретению в ингибировании роста патогенных бактерий, представляющих интерес для сельского хозяйства, возбудителей тяжелых бактериальных заболеваний садоводческих и других видов. Испытуемыми бактериями были *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (DC 3000), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (СММ) и *Pseudomonas savastanoi*.

В то же время был оценен возможный ингибирующий эффект в отношении азотфиксирующих бактерий, таких как *Azospirillum brasilense*.

Для всех бактерий, за исключением *Pseudomonas savastanoi*, была применена специальная процедура для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС).

Способ включает использование 96-луночных планшетов для микротитрования и следующую методику анализа:

а) Приготовление исходного раствора продуктов, подлежащих тестированию:

Исходя из продукта как такового, готовят 5% исходный раствор (2,5 мл продукта + 47,5 мл дистиллированной воды).

б) Приготовление бактериального посевного материала:

Колонии видов бактерий, на которых должны быть протестированы продукты, отбирают из 24-часовой культуры на чашку с агаром.

Верхушку одной или нескольких колоний переносят в колбу Эрленмейера, содержащую 50 мл ВНИ (сердечно-мозгового экстракта), которую инкубируют при  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  в аэробносе до достижения необходимой концентрации.

После титрования раствор разбавляют до концентрации  $2 \times 10^6$  КОЕ/мл.

с) Установка планшетов для микротитрования

Планшеты готовят так, как описано ниже и показано в таблице 23:

Таблица 23. Подготовка планшетов для микротитрования для определения МИС

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,25%	1,25 %	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%	1,25%	Положительный контроль	Отрицательный контроль	Продукты
B	0,62%	0,62%	0,62%	0,62%	0,62%	0,62%	0,62%	0,62%	0,62%			
C	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%			
D	0,16%	0,16%	0,16%	0,16%	0,16%	0,16%	0,16%	0,16%	0,16%			
E	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%			
F	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%			
G	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%	0,02%			
H	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%			

Во все лунки первых 9 столбцов добавляют по 50 мкл ВНИ.

В лунки A1, A2 и A3 добавляют по 50 мкл исходного раствора продукта 1.

В лунки A4, A5 и A6 добавляют по 50 мкл исходного раствора продукта 2.

В лунки A7, A8 и A9 добавляют по 50 мкл исходного раствора продукта 3.

Из каждой лунки ряда А отбирают по 50 мкл и смешивают в соответствующей лунке ряда В. Эти последовательные разведения повторяются вплоть до ряда Н, в результате чего получают концентрации, приведенные в таблице 23.

На этом этапе в каждую лунку планшета добавляют по 50 мкл бактериальной суспензии в конечной концентрации  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл.

Столбец № 10 используют в качестве положительного контроля (50 мкл ВНИ + 50 мкл бактериальной суспензии).

Столбец № 11 используют в качестве отрицательного контроля (100 мкл ВНИ).

Столбец № 12 используют для проверки отсутствия бактериальной контаминации в продуктах путем добавления в лунки по 100 мкл каждого исходного раствора тестируемых продуктов.

После установки планшет инкубируют в течение ночи при оптимальной температуре для роста бактерий. Ридеры оптической плотности используют для контроля роста бактерий в лунках.

Результаты для *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (DC3000), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (СММ) и *Azospirillum brasilense* приведены в таблицах 24, 25 и 26.

Таблица 24. МИС для *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (DC3000) и *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (СММ) - Температура инкубации = 37°C

Продукт	DC3000 (%)	СММ (%)
Продукт 1	1,25	1,25
Продукт 2	1,25	1,25
Продукт 3	0,62	0,31
Продукт 4	>1,25	0,31
Продукт 5	1,25	1,25
Продукт 6	1,25	>1,25
Продукт 7	>1,25	>1,25
Продукт 8	1,25	>1,25
Продукт 9	0,62	0,07
Продукт 10	1,25	0,31
Продукт 11	1,25	1,25
Продукт 12	1,25	>1,25
Продукт 13	1,25	>1,25
Продукт 14	1,25	1,25
Продукт 15	>1,25	>1,25
Продукт 16	>1,25	0,31
Продукт 17	>1,25	>1,25
Продукт 18	>1,25	>1,25
Продукт 19	>1,25	1,25
Продукт 20	>1,25	0,62
Продукт 21	>1,25	>1,25
Продукт 22	>1,25	>1,25
Продукт 23	1,25	>1,25
Продукт 24	1,25	1,25
Продукт 25	1,25	>1,25
Продукт 26	>1,25	>1,25

Продукт 27	1,25	1,25
Продукт 28	1,25	1,25
Продукт 29	1,25	1,25
Продукт 30	>1,25	>1,25
Продукт 31	>1,25	1,25
Продукт 32	>1,25	>1,25
Продукт 33	1,25	1,25
Продукт 34	>1,25	>1,25
Продукт 35	>1,25	>1,25
Продукт 36	1,25	1,25
Продукт 37	1,25	>1,25
Продукт 38	>1,25	>1,25
Продукт 39	>1,25	1,25
Продукт 40	>1,25	1,25

Таблица 25. МИС для *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (DC3000) и *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (СММ) – Температура инкубации = 26°C

Продукт	DC3000 (%)	СММ (%)
Продукт 1	>1,25	>1,25
Продукт 2	>1,25	>1,25
Продукт 3	0,62	0,62
Продукт 4	>1,25	0,31
Продукт 5	1,25	>1,25
Продукт 6	>1,25	>1,25
Продукт 7	>1,25	>1,25
Продукт 8	>1,25	>1,25
Продукт 9	>1,25	>1,25
Продукт 10	0,62	0,15
Продукт 11	>1,25	>1,25
Продукт 12	>1,25	>1,25
Продукт 13	1,25	>1,25
Продукт 14	>1,25	>1,25
Продукт 15	>1,25	>1,25
Продукт 16	>1,25	0,31
Продукт 17	>1,25	>1,25
Продукт 18	>1,25	>1,25
Продукт 19	>1,25	>1,25
Продукт 20	>1,25	0,62
Продукт 21	>1,25	>1,25
Продукт 22	>1,25	>1,25
Продукт 23	>1,25	>1,25
Продукт 24	>1,25	>1,25
Продукт 25	1,25	>1,25
Продукт 26	>1,25	>1,25
Продукт 27	1,25	1,25
Продукт 28	1,25	1,25
Продукт 29	1,25	1,25
Продукт 30	>1,25	>1,25
Продукт 31	>1,25	>1,25
Продукт 32	>1,25	>1,25
Продукт 33	>1,25	>1,25
Продукт 34	>1,25	>1,25
Продукт 35	>1,25	>1,25
Продукт 36	>1,25	>1,25
Продукт 37	>1,25	>1,25

Продукт 38	>1,25	>1,25
Продукт 39	>1,25	>1,25
Продукт 40	>1,25	>1,25

Результаты и обсуждение:

Было показано, что продукты №№ 3, 4, 9, 10, 16 и 20 являются очень эффективными в ингибировании бактериального роста испытуемых патогенных бактерий.

Таблица 26. МИС для *Azospirillum brasilense*, Температура инкубации = 35°C.

Продукт	<i>Azospirillum brasilense</i> (%)
Продукт 1	> 1,25
Продукт 2	> 1,25
Продукт 3	> 1,25
Продукт 4	> 1,25
Продукт 5	> 1,25
Продукт 6	> 1,25
Продукт 7	> 1,25
Продукт 8	> 1,25
Продукт 9	> 1,25
Продукт 10	> 1,25
Продукт 11	> 1,25
Продукт 12	> 1,25
Продукт 13	> 1,25
Продукт 14	> 1,25
Продукт 15	> 1,25
Продукт 16	> 1,25
Продукт 17	> 1,25
Продукт 18	> 1,25
Продукт 19	> 1,25
Продукт 20	> 1,25
Продукт 21	> 1,25
Продукт 22	> 1,25
Продукт 23	> 1,25
Продукт 24	> 1,25
Продукт 25	> 1,25
Продукт 26	> 1,25
Продукт 27	> 1,25
Продукт 28	> 1,25
Продукт 29	> 1,25
Продукт 30	> 1,25
Продукт 31	> 1,25
Продукт 32	> 1,25
Продукт 33	< 1,25
Продукт 34	> 1,25
Продукт 35	> 1,25
Продукт 36	> 1,25
Продукт 37	> 1,25
Продукт 38	< 1,25
Продукт 39	> 1,25
Продукт 40	> 1,25

Результаты и обсуждение:

Все продукты, за исключением продуктов № 33 и № 38, не оказывали ингибирующего действия на *Azospirillum brasilense*. Эти данные очень важны, поскольку

эта бактерия способна фиксировать азот в присутствии низкого уровня кислорода, что делает ее микроаэробным диазотропом, стимулирующим рост растений.

Таким образом, было продемонстрировано, что продукты, обладая значительной эффективностью в подавлении как мицелиального, так и бактериального роста грибов и патогенных бактерий, не оказывают неблагоприятного воздействия на бактерии, необходимые для физиологического роста растений.

Что касается теста на *Pseudomonas savastanoi*, грамотрицательную бактерию, ответственную за «паршу оливковых деревьев», все продукты по настоящему изобретению были протестированы с использованием режима «бумажный диск». Для проведения скрининга продукты были протестированы как таковые и в концентрациях 0,1 и 0,5% с использованием стерильной деионизированной воды для разведения.

Бактерию помещали в жидкую культуру на среде LB (лизогенном бульоне), а затем выращивали на чашке с агаровой средой TSA (триптический соевый агар). Затем на каждую чашку помещали по 3 диска из промокательной бумаги, которые тщательно пропитывали каждым продуктом в разной концентрации.

Затем чашки инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C. «Свободную зону», образовавшуюся вокруг каждого диска, измеряли в мм. Результаты испытаний приведены в таблице 27.

Таблица 27. *Pseudomonas savastanoi*

Продукт	Неразбавленные продукты как таковые	Концентрация продукта 0,5%	Концентрация продукта 0,1%
	Свободная зона (мм)	Свободная зона (мм)	Свободная зона (мм)
1	6	3	0
2	1	0,5	0
3	3	0,5	0
4	3	3	0
5	6	3	1
6	3	1	1
7	3	1	1,5
8	4	0	2
9	12	1	1
10	7	0,5	1
11	0	0	0
12	0	1	0,5
13	3,5	1,5	1,5
14	2	1	3
15	1	0	1
16	2,5	0	0,5
17	0	1	2
18	0	0	2
19	3	0	0
20	4	0	1,5
21	5	0	0
22	0	0	0

23	2	0	0
24	1,5	0	3
25	2	0	3
26	0,5	0	0
27	5	0	2
28	2	1	1
29	2	3	0
30	4	1	0
31	2	1	0
32	1	0	0
33	2	0	0
34	1	0,5	0
35	2	0	0
36	4	0	0
37	3	0	0
38	3	0	0
39	4	1	0
40	0	1,5	0,5

Результаты и обсуждение:

Продукт №9 в максимальной концентрации проявляет значительный антибактериальный эффект, подавляя рост на 12 мм.

При снижении концентрации отмечено множество продуктов, которые проявляют эффект ингибирования роста бактерий. Это продукты №№ 1, 4, 5, 14, 24, 25 и 29.

Пример 7. Полевые испытания

Были проведены три полевых испытания на виноградных лозах для оценки возможной эффективности продуктов из настоящего изобретения как таковых и/или в сочетании с фунгицидами в качестве противогрибковых средств.

Пример 7.1.

Первое испытание было проведено на виноградных лозах в теплице с искусственной инокуляцией возбудителя (*Plasmopara viticola*) на растениях, обработанных продуктами №№ 2, 3 и 4 в концентрациях 0,1 и 0,2%. Полученные данные сравнивали с данными, полученными при обработке другой группы растений Kocide® 3000 в номинальной дозе (150 г/100 л воды).

Результаты этого испытания показаны на фиг. 10.

Результаты и обсуждение:

Растения, обработанные Kocide® 3000, показали самый низкий процент листьев со спорообразованием (-96% по сравнению с контрольной группой), в то время как продукты № 2 и № 4 в концентрациях 0,1% и 0,2%, соответственно, оказались эффективными в снижении спорообразования листьев примерно на 66% и 63%, соответственно.

Пример 7.2.

Испытание было проведено в испытательном центре на лозе на виноградном поле для оценки эффективности продуктов по настоящему изобретению отдельно при

различных концентрациях (500 мл/г воды, 1000 мл/г воды и 1500 мл/г воды) и в сочетании с Сургохат (продуктом на основе металла меди 190 г/л в виде трехосновного медного купороса) и Сурзате (продуктом на основе цимоксанила, 4,2 г, и металла меди, 39,75 г, в виде оксихлорида меди).

В следующих таблицах приведены технические характеристики испытаний:

Таблица 28. Описание культуры

Вид	Vitis vinifera
Сорт	Aglianico
Расстояние между рядами виноградной лозы	2,00 м
Расстояние между растениями в ряду	1,50 м
Влажность почвы	Нормальная

Таблица 29. Описание грибка

1	Plasmopara viticola
2	Botryotinia fuckeliana

Таблица 30. Описание участка

Обработанная область	21 м <sup>2</sup>
Количество обработок	10
Повторности	4
Ширина обработанной области (на обработку)	2 м
Длина обработанной области (на обработку)	10,5 м

Таблица 31. Характеристики почвы

% песка	43,5
% ила	39
% глины	17,5
pH	6,4
% ОргВ (органические вещества)	2

Таблица 32. Способы нанесения продукта

Способ нанесения	Опрыскивание листьев
Оборудование для нанесения	Ранцевый опрыскиватель
Рабочее давление	2 бар
Тип форсунки	Плоскоструйная
Размер форсунки	N-КА-15R
Расстояние между форсунками	4 см
Ряды форсунок	2
Скорость потока через форсунку	2506,7 мл/мин
Носитель	Вода
Распыляемый объем	1000 л/га
pH распыляемого раствора	6,2

Таблица 33. Описание обработки

№ обработки	Название обработки	Концентрация продукта как такового	Дозировка	Итоговая концентрация	Распыляемый объем
1	Контроль	--			
2	Продукт 1	900 г/л	500 мл/100 л воды	4500 г/га	1000 л/га
3	Продукт 1	900 г/л	1000 мл/100 л воды	9000 г/га	1000 л/га
4	Продукт 1	900 г/л	1500 мл/100 л воды	13500 г/га	1000 л/га
5	Продукт 1 + Cuproxat S.D.I.	900 г/л 195 г/л	500 мл/100 л воды 300 мл/100 л воды	4500 г/га 585 г/га	1000 л/га 1000 л/га
6	Продукт 1 + Cuproxat S.D.I.	900 г/л 195 г/л	1000 мл/100 л воды 300 мл/100 л воды	9000 г/га 585 г/га	1000 л/га 1000 л/га
7	Продукт 1 + Cuproxat S.D.I.	900 г/л 195 г/л	1500 мл/100 л воды 300 мл/100 л воды	13500 г/га 585 г/га	1000 л/га 1000 л/га
8	Продукт 1 + Curzate	900 г/л 200 г/кг	500 мл/100 л воды 60г/100 л воды	4500 г/га 120 г/га	1000 л/га 1000 л/га
9	Продукт 1 + Curzate	900 г/л 200 г/кг	1000 мл/100 л воды 60 г/100 л воды	9000 г/га 120 г/га	1000 л/га 1000 л/га
10	Продукт 1 + Curzate	900 г/л 200 г/кг	1500 мл/100 л воды 60 г/100 л воды	13500 г/га 120 г/га	1000 л/га 1000 л/га

Таблица 34. Схема экспериментального участка (обработки)

10	8	5	3
9	7	4	2
8	6	3	1
7	5	2	10
6	4	1	9
5	3	10	8
4	2	9	7
3	1	8	6
2	10	7	5
1	9	6	4

Таблица 35. Расшифровка обозначений экспериментального участка

Обработка	Описание	Дозировка
1	Контроль	
2	Продукт 1	500 мл/гЛ
3	Продукт 1	1000 мл/гЛ
4	Продукт 1	1500 мл/гЛ
5	Продукт 1 & Cuproxat	500 мл/гЛ + 300 мл/гЛ
6	Продукт 1 & Cuproxat	1000 мл/гЛ + 300 мл/гЛ
7	Продукт 1 & Cuproxat	1500 мл/гЛ + 300 мл/гЛ
8	Продукт 1 & Curzate	500 мл/гЛ + 60 г/гЛ
9	Продукт 1 & Curzate	1000 мл/гЛ + 60 г/гЛ
10	Продукт 1 & Curzate	1500 мл/гЛ + 60 г/гЛ

В данном испытании оценивали следующие параметры:

- Фитотоксичность: PHYGEN
- Мощность: VIGOR
- Количество листьев, пораженных заболеванием, на 140 листьев на обработку:

СОРЛРА

- Процент поврежденных листьев: PESINC

Результаты показаны в таблицах ниже.



Таблица 36. Оценка фитотоксичности обработок

Дата обработки	10/06/2016	12/06/2016	14/06/2016	16/06/2016	17/06/2016	19/06/2016
Анализируемый параметр	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN
Единица измерения	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100
Контроль	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 2	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 3	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 4	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 5	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 6	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 7	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 8	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 9	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 10	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Таблица 37. Оценка фитотоксичности обработок

Дата обработки	21/06/2016	23/06/2016	24/06/2016	26/06/2016	28/06/2016	30/06/2016
Анализируемый параметр	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN
Единица измерения	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100
Контроль	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 2	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 3	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 4	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 5	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 6	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 7	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 8	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 9	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 10	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Таблица 38. Оценка фитотоксичности обработок

Дата обработки	01/07/2016	03/07/2016	05/07/2016	07/07/2016
Анализируемый параметр	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN
Единица измерения	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100
Контроль	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 2	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 3	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 4	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 5	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 6	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 7	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 8	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 9	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 10	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Таблица 39. Оценка мощности

Дата обработки	16/06/2016	23/06/2016	30/06/2016	14/07/2016
Анализируемый параметр	VIGOR	VIGOR	VIGOR	VIGOR
Единица измерения	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 10
Контроль	10,00a	10,00a	10,00a	9,63a
Обработка 2	10,00a	10,00a	10,00a	9,63a
Обработка 3	10,00a	10,00a	10,00a	9,75a
Обработка 4	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 5	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 6	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 7	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 8	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 9	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 10	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a

Таблица 40. Оценка количества поврежденных листьев

Дата обработки	16/06/2016	23/06/2016	30/06/2016	14/07/2016
Анализируемый параметр	COPLPA	COPLPA	COPLPA	COPLPA
Единица измерения	Количество	Количество	Количество	Количество
Контроль	36,50 a	42,00 a	50,00 a	59,50 a
Обработка 2	34,50 a	38,50 ab	44,50 b	52,25 b
Обработка 3	33,75 a	37,75 ab	45,50 b	48,75 b
Обработка 4	32,75 a	35,50 b	39,50 b	44,50 b
Обработка 5	21,25 b	22,25 c	25,50 c	25,25 c
Обработка 6	20,00 b	20,50 c	21,50 c	21,50 c
Обработка 7	19,50 b	19,50 c	21,00 c	20,50 c
Обработка 8	20,00 b	21,25 c	22,50 c	24,25 c
Обработка 9	19,25 b	18,75 c	19,25 c	18,00 c
Обработка 10	18,25 b	18,25 c	18,25 c	16,25 c

Таблица 41. Процент поврежденных листьев

Дата обработки	16/06/2016	23/06/2016	30/06/2016	14/07/2016
Анализируемый параметр	PESINC	PESINC	PESINC	PESINC
Единица измерения	%	%	%	%
Контроль	26,08 a	30,00 a	35,73 a	42,50 a
Обработка 2	24,63 a	27,50 ab	31,80 ab	37,33 b
Обработка 3	24,10 a	26,95 ab	30,35 b	34,85 b
Обработка 4	23,38 a	25,38 ab	28,23 b	31,78 b
Обработка 5	15,18 b	15,88 c	18,23 c	18,03 c
Обработка 6	14,30 b	14,65 c	15,35 c	15,35 c
Обработка 7	13,95 b	13,95 c	15,00 c	14,63 c
Обработка 8	14,30 b	15,20 c	16,08 c	17,33 c
Обработка 9	13,75 b	13,40 c	13,57 c	12,85 c
Обработка 10	13,05 b	13,05 c	13,05 c	11,63 c

#### Результаты и обсуждение

Продукт при использовании в различных дозах хорошо смешивается с водой и поэтому не вызывает никаких проблем с применением. Даже при использовании продуктов на основе меди продукт смешивается однородно, что позволяет равномерно распределять его по растениям.

Никаких фитотоксических эффектов, вызванных применением продукта, не наблюдалось во всех протестированных дозах. Таким образом, это позволяет использовать продукт в дозе до 1500 мл/100 л воды.

Обработка растений продуктом как таковым значительно облегчает тяжесть и частоту возникновения заболевания, вызываемого *Plasmopara viticola*. Фактически, что касается количества поврежденных листьев, то наблюдается снижение по сравнению с контрольной группой в пределах от 12 до 25% в группах, обработанных 500 мл, 1000 мл и 1500 мл препарата № 1 на 100 л воды.

Комбинации продукта № 1 и продуктов на основе меди (в номинальной дозировке) оказались успешными, и это может означать возможный синергизм между продуктами, позволяющий снизить дозировку продуктов на основе меди.

Эту проверку проводили с помощью теста, описанного в Примере 7.3, который был установлен именно для проверки того, является ли смесь Продукта 1 и продуктов на основе меди (в половинной номинальной дозе) такой же эффективной, как продукты на основе меди в полной номинальной дозе.

#### Пример 7.3

Испытание было проведено в испытательном центре на лозе на виноградном поле для оценки эффективности продуктов из настоящего изобретения в различных концентрациях (500 мл/гл воды, 1000 мл/гл воды и 1500 мл/гл воды) в комбинации с Curoxat (продуктом на основе металла меди 190 г/л в виде трехосновного сульфата меди) и Cuzate (продуктом на основе цимоксанила, 4,2 г, и металла меди, 39,75 г, в виде оксихлорида меди) по сравнению с продуктами на основе меди, используемыми как таковые в полной номинальной дозе.

В следующих таблицах приведены технические характеристики испытаний:

Таблица 42. Описание культуры

Вид	Vitis vinifera
Сорт	Aglianico
Расстояние между рядами виноградной лозы	2,00 м
Расстояние между растениями в ряду	1,50 м
Влажность почвы	Нормальная

Таблица 43. Описание грибка

1	<i>Plasmopara viticola</i>
2	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

Таблица 44. Описание участка

Обработанная область	21 м <sup>2</sup>
Количество обработок	10
Повторности	4
Ширина обработанной области (на обработку)	2 м
Длина обработанной области (на обработку)	10,5 м

Таблица 45. Характеристики почвы

% песка	43,5
% ила	39
% глины	17,5
pH	6,4
% ОргВ (органические вещества)	2

Таблица 46. Способы нанесения продукта

Способ нанесения	Опрыскивание листьев
Оборудование для нанесения	Ранцевый опрыскиватель
Рабочее давление	2 бар
Тип форсунки	Плоскоструйная
Размер форсунки	N-КА-15R
Расстояние между форсунками	4 см
Ряды форсунок 2	2
Скорость потока через форсунку	2506,7 мл/мин
Носитель	Вода
Распыляемый объем	1000 л/га
pH распыляемого раствора	6,2

Таблица 47. Описание обработки

№ обработки	Название обработки	Концентрация продукта как такового	Дозировка	Итоговая концентрация	Распыляемый объем
1	Контроль	--			
2	Супрохат S.D.I.	195 г/л	300 мл/100 л воды	585 г/га	1000 л/га
3	Сурзате	200 г/кг	60 г/100 л воды	120 г/га	1000 л/га
4	Продукт 1 + Супрохат S.D.I.	900 г/л 195 г/л	500 мл/100 л воды 150 мл/100 л воды	4500 г/га 293 г/га	1000 л/га 1000 л/га
5	Продукт 1 + Супрохат S.D.I.	900 г/л 195 г/л	1000 мл/100 л воды 150 мл/100 л воды	9000 г/га 293 г/га	1000 л/га 1000 л/га
6	Продукт 1 + Супрохат S.D.I.	900 г/л 195 г/л	1500 мл/100 л воды 150 мл/100 л воды	13500 г/га 293 г/га	1000 л/га 1000 л/га
7	Продукт 1 + Сурзате	900 г/л 200 г/кг	500 мл/100 л воды 30 г/100 л воды	4500 г/га 60 г/га	1000 л/га 1000 л/га
8	Продукт 1 + Сурзате	900 г/л 200 г/кг	1000 мл/100 л воды 30 г/100 л воды	9000 г/га 60 г/га	1000 л/га 1000 л/га
9	Продукт 1 + Сурзате	900 г/л 200 г/кг	1500 мл/100 л воды 30 г/100 л воды	13500 г/га 60 г/га	1000 л/га 1000 л/га

Таблица 48. Схема экспериментального участка (обработки)

9	7	5	3
8	6	4	2
7	5	3	1
6	4	2	9
5	3	1	8
4	2	9	7
3	1	8	6
2	9	7	5
1	8	6	4

Таблица 49. Расшифровка обозначений экспериментального участка

Обработка	Описание	Дозировка
1	Контроль	
2	Супрохат S.D.A	300 мл/г/л
3	Сурзате	60 г/г/л
4	Продукт 1 & Супрохат	500 мл/г/л + 150 мл/г/л
5	Продукт 1 & Супрохат	1000 мл/г/л + 150 мл/г/л
6	Продукт 1 & Супрохат	1500 мл/г/л + 150 мл/г/л

7	Продукт 1 & Curzate	500 мл/гЛ + 30 г/гЛ
8	Продукт 1 & Curzate	1000 мл/гЛ + 30 г/гЛ
9	Продукт 1 & Curzate	1500 мл/гЛ + 30 г/гЛ

В данном испытании оценивали следующие параметры:

- Фитотоксичность: PHYGEN
- Мощность: VIGOR
- Количество листьев, пораженных заболеванием, на 140 листьев на обработку:

СОЛРА

- Процент поврежденных листьев: PESINC

Результаты показаны в таблицах ниже.

Таблица 50. Оценка фитотоксичности обработок

Дата обработки	05/08/2016	07/08/2016	09/08/2016	11/08/2016	12/08/2016	14/08/2016
Анализируемый параметр	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN
Единица измерения	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100
Контроль	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 2	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 3	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 4	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 5	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 6	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 7	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 8	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 9	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Таблица 51. Оценка фитотоксичности обработок.

Дата обработки	16/08/2016	18/08/2016	19/08/2016	21/08/2016	23/08/2016	25/08/2016
Анализируемый параметр	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN
Единица измерения	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100
Контроль	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 2	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 3	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 4	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 5	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 6	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 7	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 8	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 9	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Таблица 52. Оценка фитотоксичности обработок

Дата обработки	26/08/2016	28/08/2016	30/08/2016	01/09/2016
Анализируемый параметр	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN	PHYGEN
Единица измерения	0 – 100	0 – 100	0 – 100	0 – 100
Контроль	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 2	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 3	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Обработка 4	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 5	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 6	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 7	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 8	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Обработка 9	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a

Таблица 53. Оценка мощности

Дата обработки	11/08/2016	18/08/2016	25/08/2016	08/09/2016
Анализируемый параметр	VIGOR	VIGOR	VIGOR	VIGOR
Единица измерения	0 – 10	0 – 10	0 – 10	0 – 10
Контроль	10,00a	10,00a	10,00a	9,25b
Обработка 2	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 3	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 4	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 5	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 6	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 7	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 8	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a
Обработка 9	10,00a	10,00a	10,00a	10,00a

Таблица 54. Оценка количества поврежденных листьев

Дата обработки	11/08/2016	18/08/2016	25/08/2016	08/09/2016
Анализируемый параметр	COPLPA	COPLPA	COPLPA	COPLPA
Единица измерения	Количество	Количество	Количество	Количество
Контроль	76,75a	88,00a	95,00a	106,75a
Обработка 2	51,75 b	56,50 b	56,50a	65,25 b
Обработка 3	50,00 b	54,00 b	53,50 b	61,25 b
Обработка 4	57,75 b	63,50 b	63,25 b	74,75 b
Обработка 5	56,00 b	61,75 b	62,25 b	72,00 b
Обработка 6	54,25 b	59,25 b	59,50 b	67,75 b
Обработка 7	54,75 b	60,75 b	61,25 b	70,75 b
Обработка 8	52,75 b	58,25 b	58,25 b	67,00 b
Обработка 9	51,00 b	56,00 b	54,50 b	62,25 b

Таблица 55. Процент поврежденных листьев

Дата обработки	11/08/2016	18/08/2016	25/08/2016	08/09/2016
Анализируемый параметр	PESINC	PESINC	PESINC	PESINC
Единица измерения	%	%	%	%
Контроль	54,83a	62,85a	67,88a	76,25a
Обработка 2	36,98 b	40,35 b	40,35 b	46,60 b
Обработка 3	35,73 b	38,55 b	38,23 b	43,75 b
Обработка 4	41,23 b	45,35 b	45,18 b	53,40 b
Обработка 5	39,98 b	44,13 b	44,48 b	51,43 b
Обработка 6	38,75 b	42,33 b	42,50 b	48,40 b
Обработка 7	39,13 b	43,38 b	43,75 b	50,53 b
Обработка 8	37,68 b	41,63 b	41,63 b	47,85 b
Обработка 9	36,43 b	39,98 b	38,93 b	44,48 b

#### Результаты и обсуждение

Продукт при использовании в различных дозах хорошо смешивается с продуктами на основе меди, обеспечивая однородное распределение на растениях.

Никаких фитотоксических эффектов, вызванных применением продукта, не наблюдалось во всех испытанных дозах. Таким образом, это позволяет использовать продукт в дозе до 1500 мл/100 л воды.

Два препарата на основе меди (в дозировке, указанной на этикетке) показали наивысшую эффективность при лечении заболевания, вызываемого *Plasmopara viticola*, снизив заболеваемость примерно на 38% для Сургохат и примерно на 43% для Curzate.

Смеси, приготовленные с использованием Продукта 1 в дозировке 1500 мл/гл воды в сочетании с продуктами на основе меди, используемыми в дозировке, вдвое меньшей номинальной, также показали высокую эффективность.

Фактически, при обработке № 9 (Продукт 1: 1500 мл/гл + Curzate: 30 г/гл воды) наблюдается снижение заболеваемости (количество поврежденных листьев) примерно на 42%.

Величина уменьшения количества поврежденных листьев практически такая же, как и при обработке № 3, что свидетельствует о мощном синергетическом эффекте между двумя продуктами.

Таким образом, смешивание Продукта 1 с продуктами на основе меди позволяет сократить использование продуктов на основе меди на 50%, что соответствует новым сельскохозяйственным нормам, требующим сокращения использования меди.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сельскохозяйственное и/или лесохозяйственное применение смеси, содержащей или состоящей из:

глицерина - 5-90% и

глицеридов одной или нескольких органических кислот - 10-95%,

где проценты являются массовыми процентами по отношению к общей массе смеси.

2. Применение по п. 1, где указанная одна или несколько органических кислот выбраны из группы, состоящей из  $C_1$ - $C_{12}$  и  $C_{16}$ - $C_{20}$  кислот и их смесей.

3. Применение по п. 2, где указанная одна или несколько органических кислот выбраны из группы, состоящей из муравьиной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, масляной кислоты, изомаляной кислоты, валериановой кислоты, капроновой кислоты, гептановой кислоты, каприловой, нонановой кислоты, каприновой кислоты, ундекановой кислоты, лауриновой кислоты, жирных кислот из соевого масла, щавелевой кислоты, адипиновой кислоты, янтарной кислоты, лимонной кислоты, винной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, салициловой кислоты, фумаровой кислоты, глюконовой кислоты, азелаиновой кислоты и их смесей.

4. Применение по п. 3, где указанная одна или несколько органических кислот выбраны из группы, состоящей из пропионовой кислоты, масляной кислоты, изомаляной кислоты, валериановой кислоты, капроновой кислоты, гептановой кислоты, каприловой кислоты, нонановой кислоты, каприновой кислоты, ундекановой кислоты, лауриновой кислоты, жирных кислот соевого масла, и их смесей.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где смесь содержит моноглицериды в количестве 10-90%, предпочтительно в количестве 40-90%.

6. Применение по любому из пп. 1-5, где содержание глицерина, смешанного с глицеридами, составляет 10-60%.

7. Применение по любому из пп. 1-6, где указанную смесь используют в качестве фитостимулирующего средства для стимуляции прорастания семян и/или в качестве фунгицида/пестицида для защиты семян и/или культур от патогенных микроорганизмов.

8. Фитостимулирующая композиция для стимуляции прорастания семян и/или увеличения длины корешков, содержащая смесь, определенную по любому из пп. 1-6.

9. Способ увеличения прорастания семян и/или длины корешков, включающий обработку семян путем пропитывания фитостимулирующей композицией по п. 8 как таковой и/или ее водным раствором.



10. Фунгицидная/пестицидная композиция, содержащая смесь, определенную по любому из пп. 1-6, и при необходимости фунгицид на основе меди.

11. Фунгицидный/пестицидный способ, включающий обработку культуры фунгицидной/пестицидной композицией по п. 10.

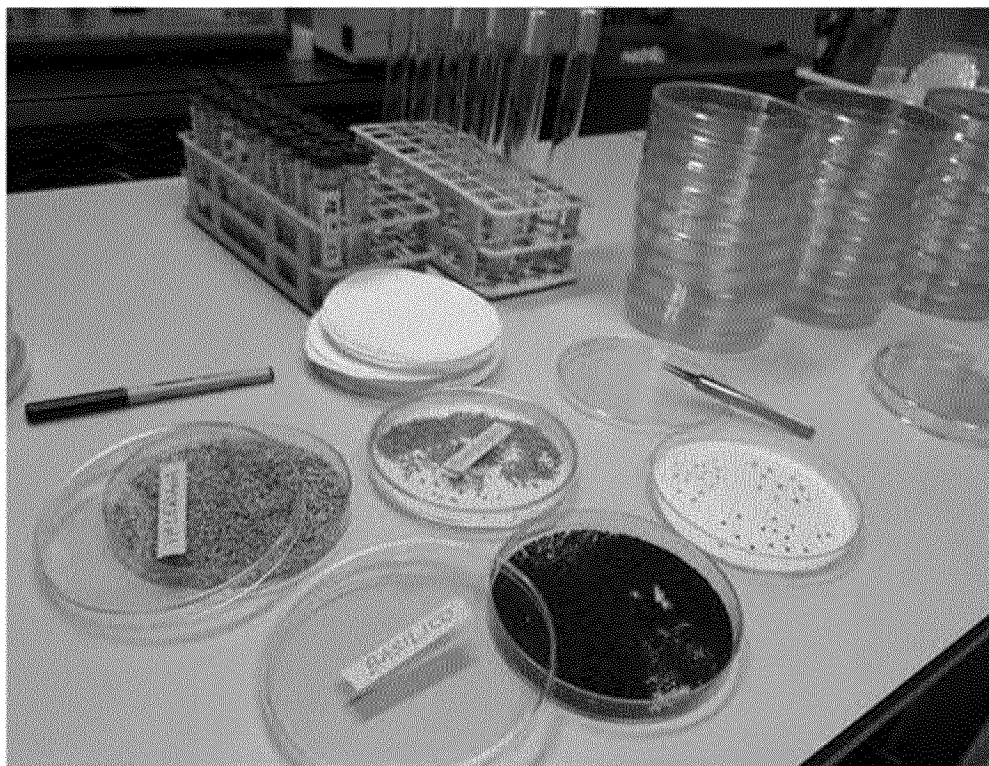
12. Композиция для предпосевной обработки семян, содержащая смесь по любому из пп. 1-6.

13. Способ предпосевной обработки семян, включающий обеспечение контакта семян с композицией для предпосевной обработки по п. 12.

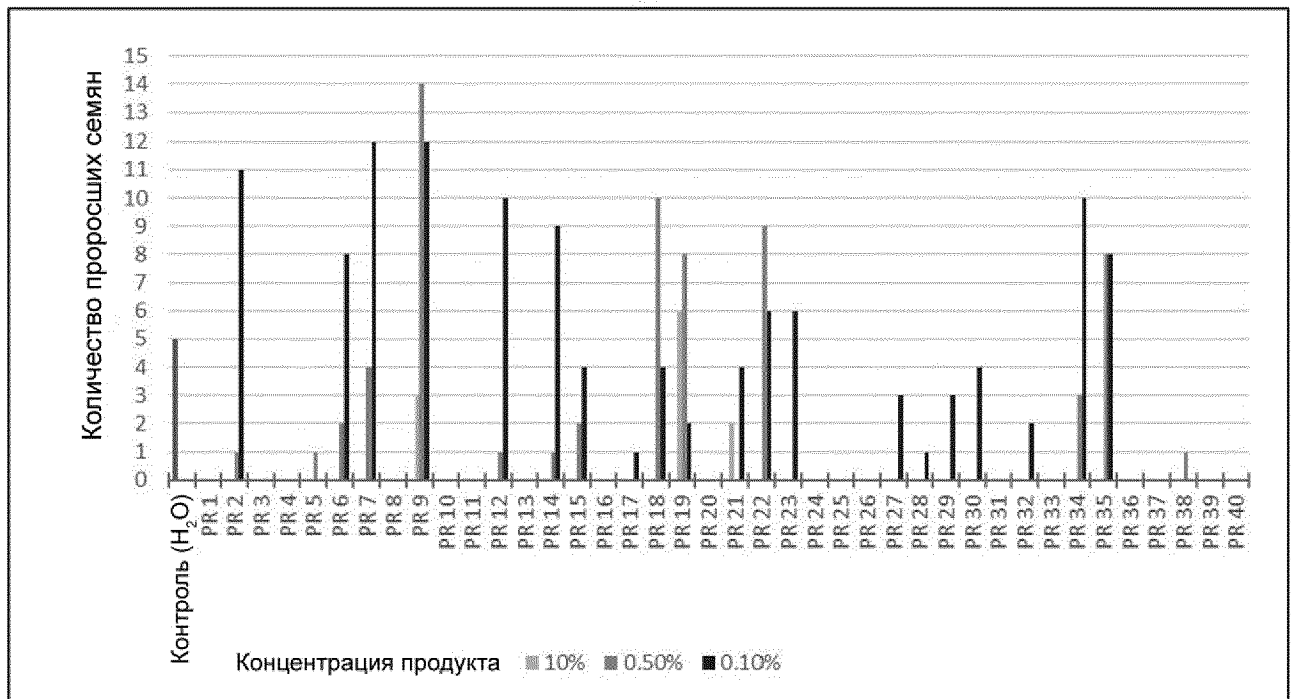
ФИГ. 1



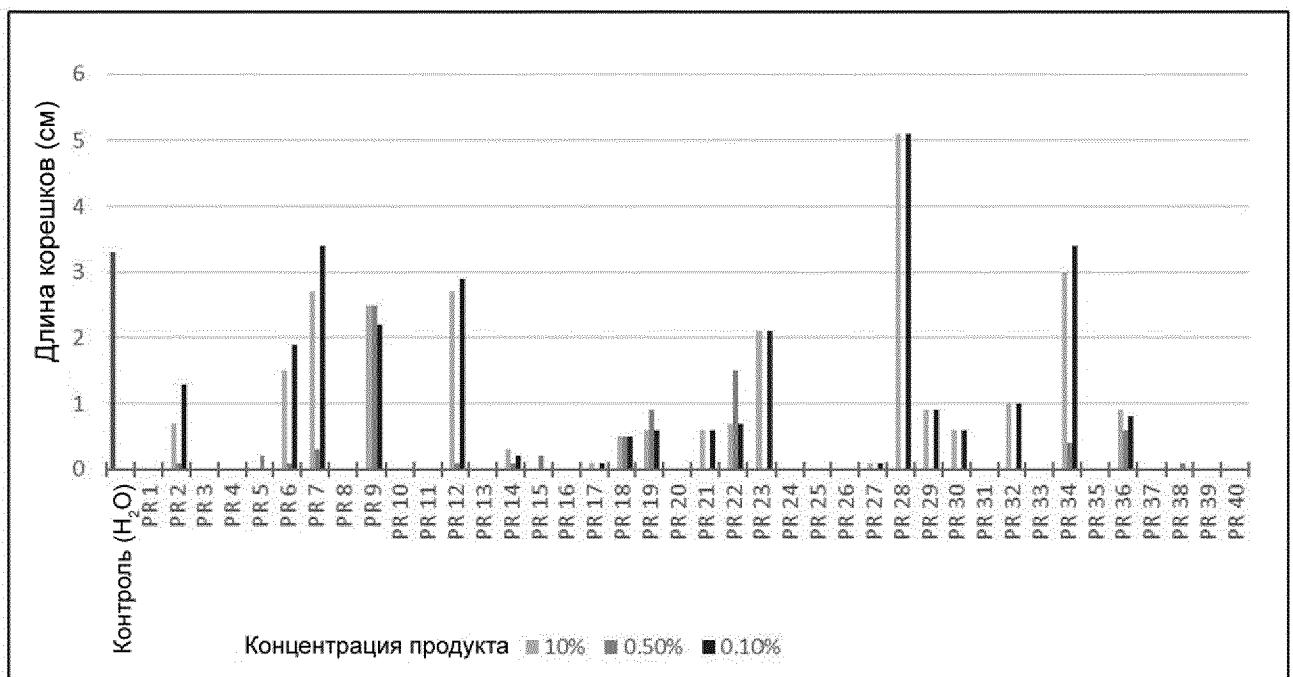
Подготовка чашек для тестирования прорастания семян



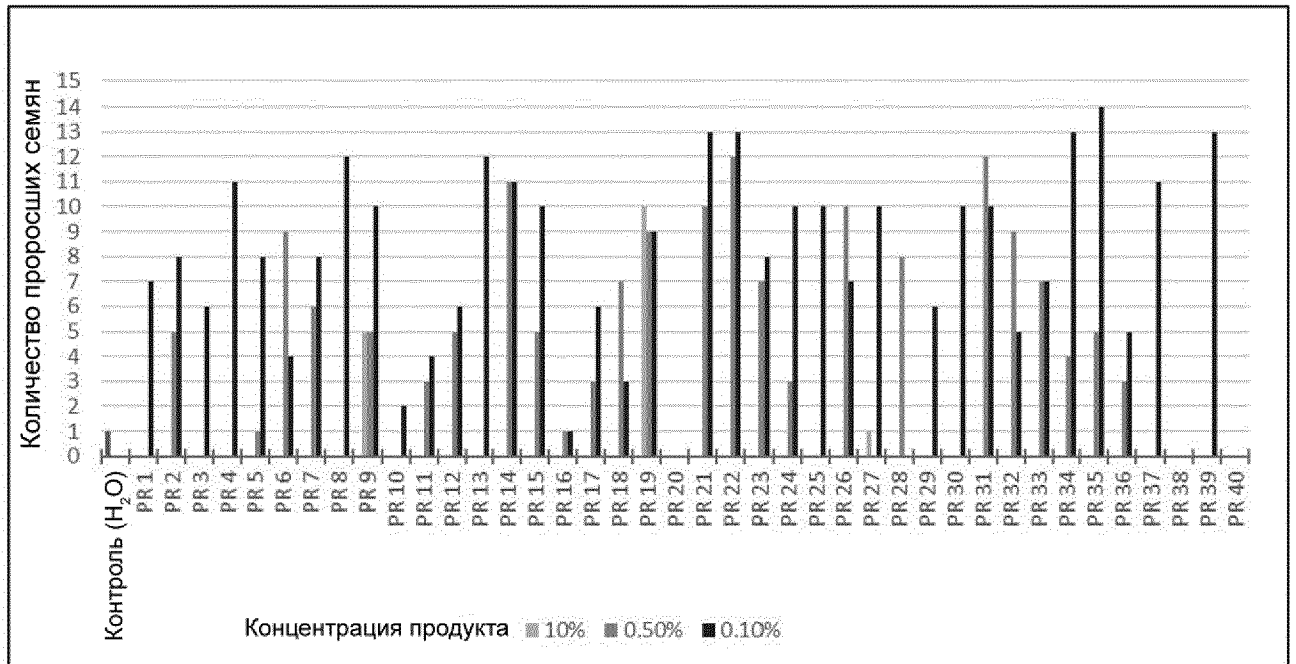
Фиг. 2

Испытания прорастания семян базилика (*Ocimum basilicum* L.)

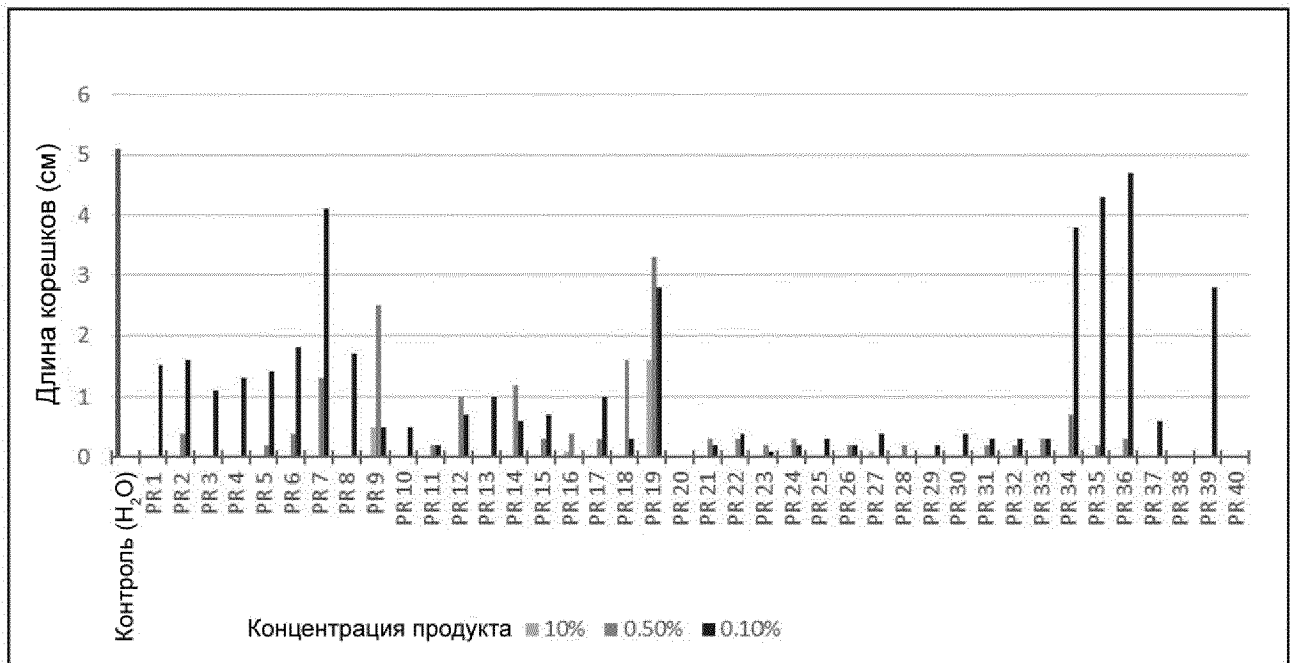
Фиг. 3А



Фиг. 3В

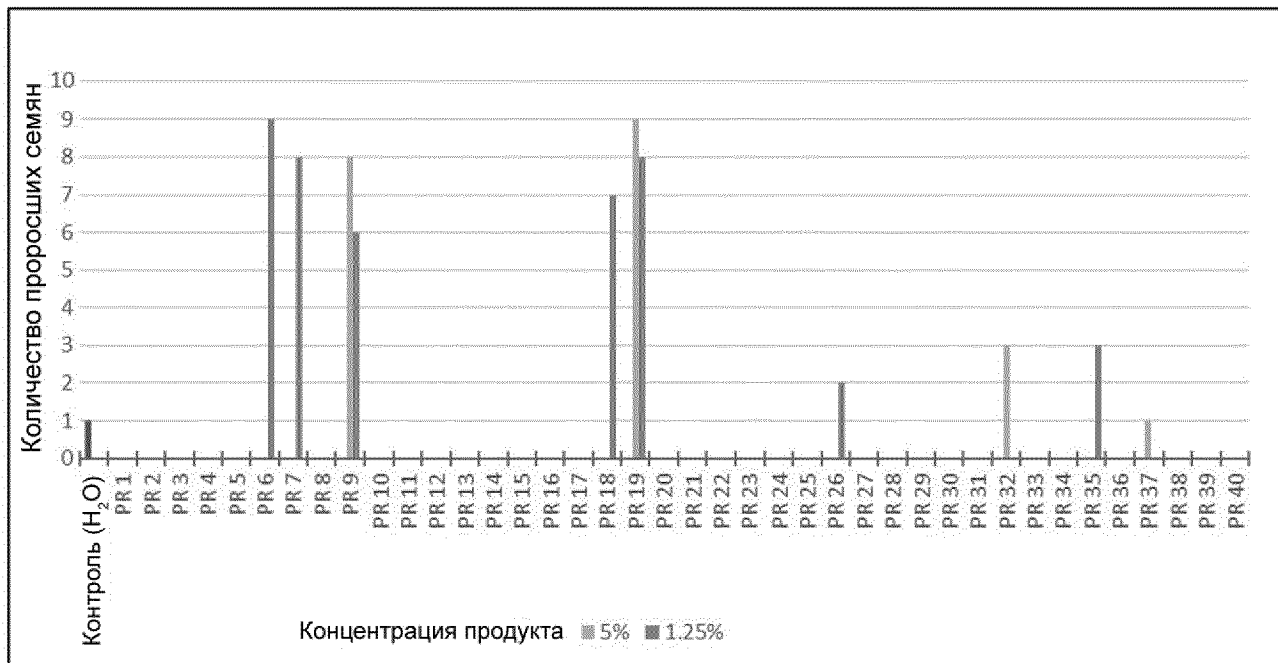
Испытания прорастания семян томата (*Solanum lycopersicum*)

Фиг. 4А

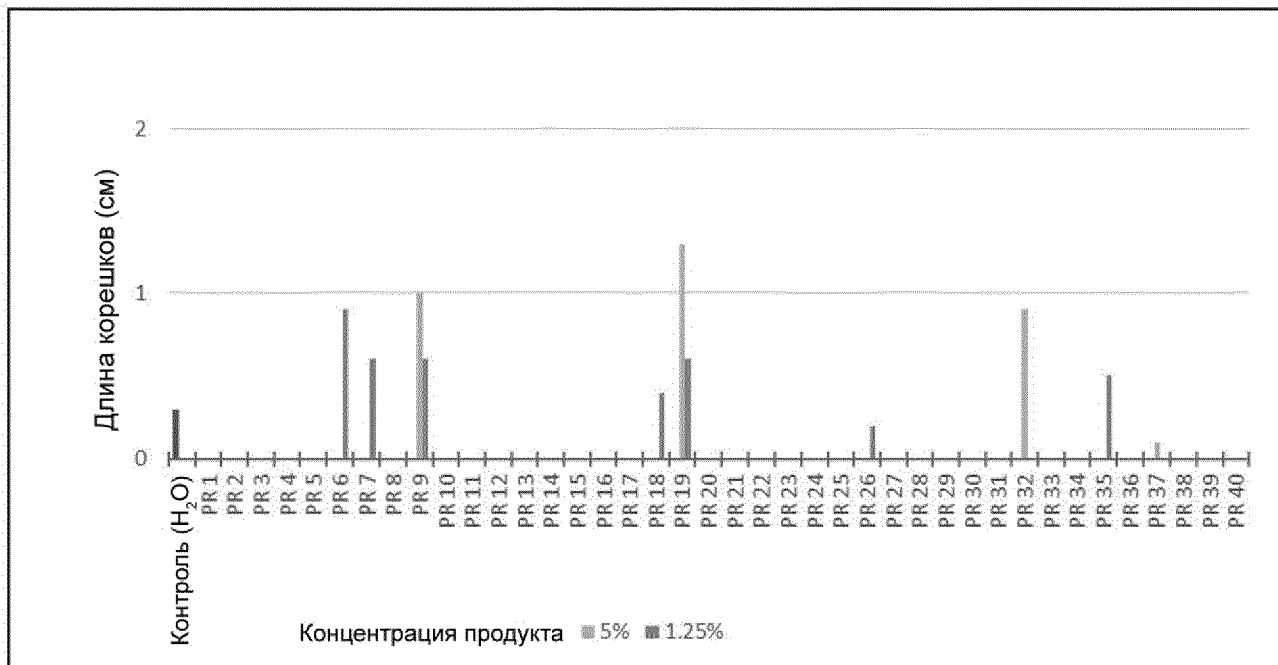


Фиг. 4В

## Испытания прорастания семян салата

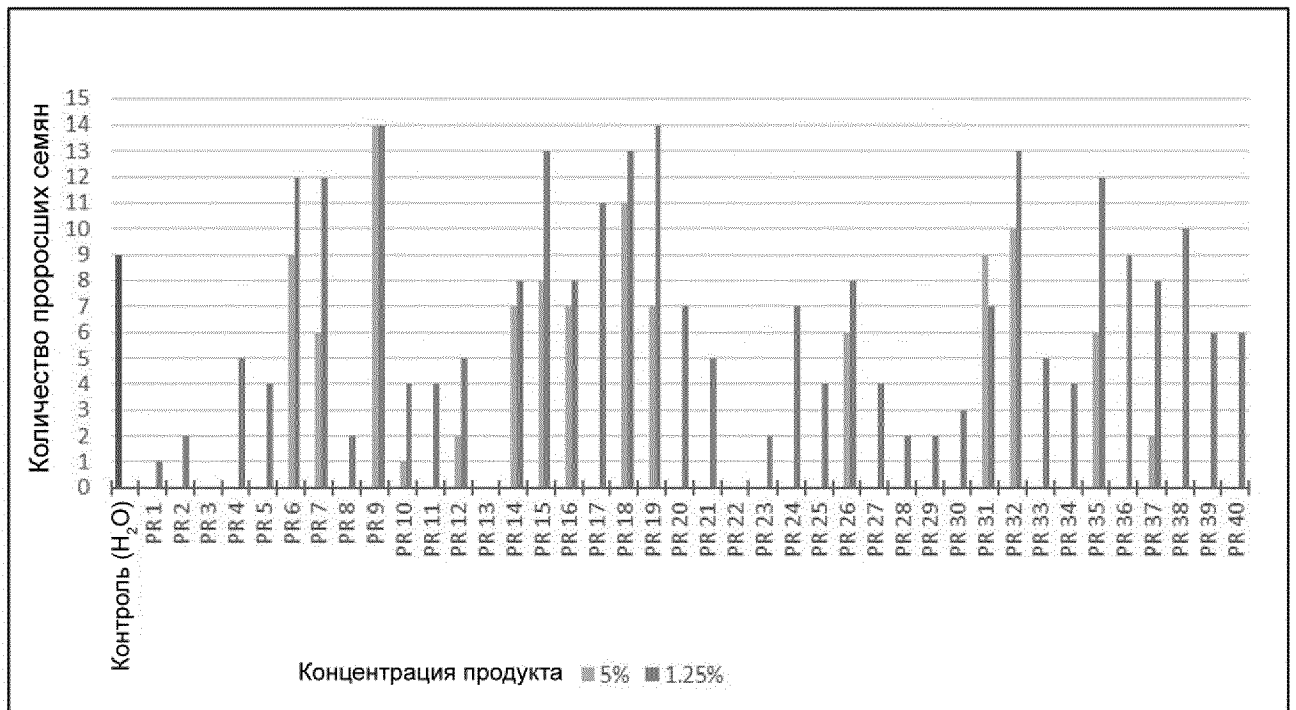


Фиг. 5А

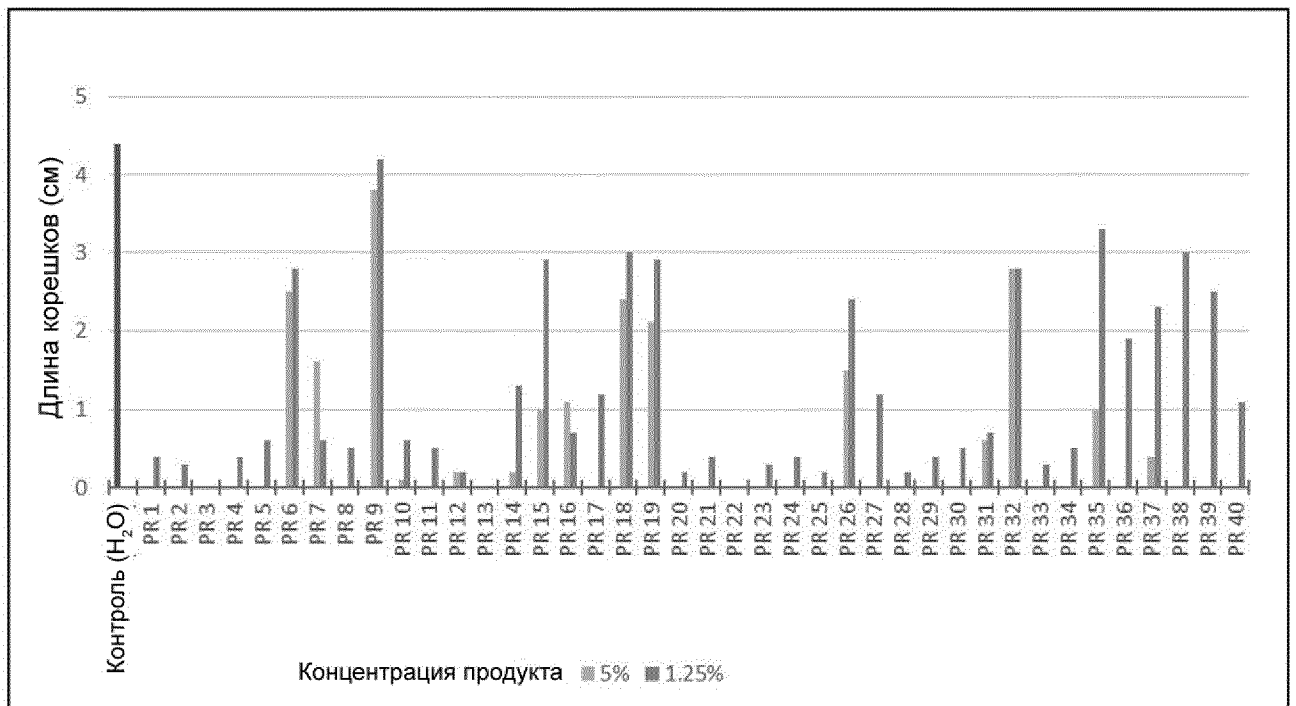


Фиг. 5В

## Испытания прорастания семян редиса

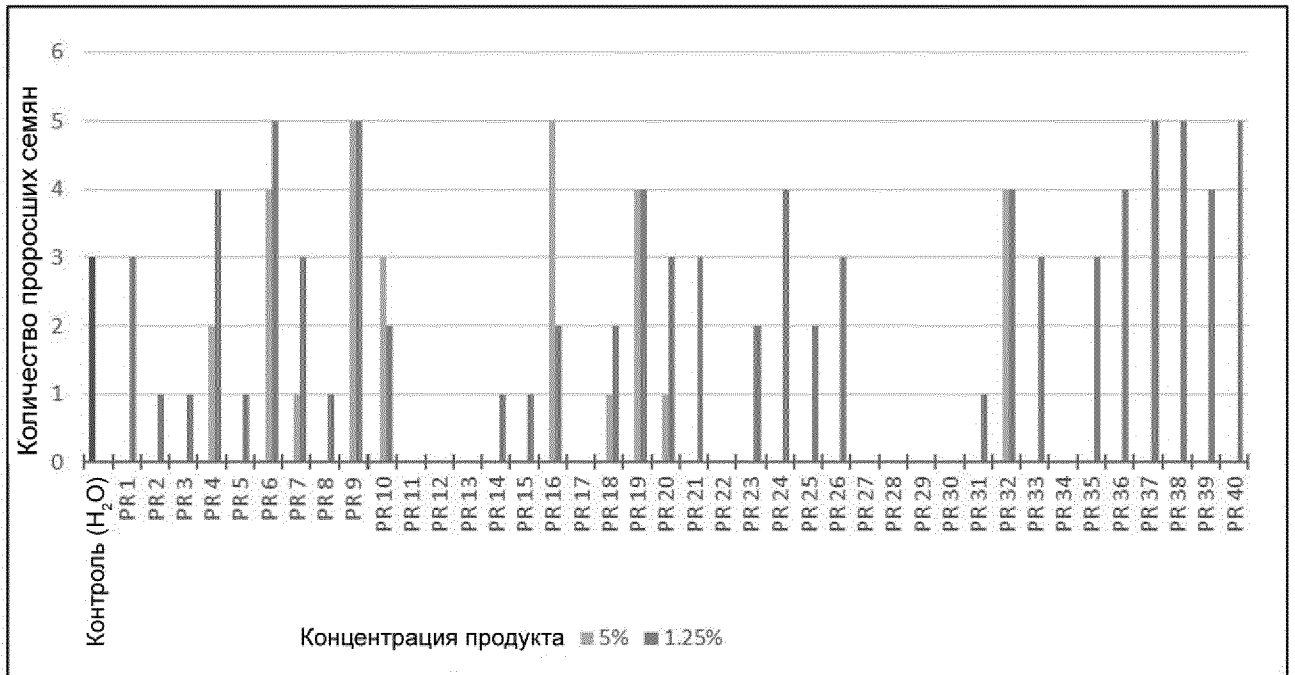


Фиг. 6А

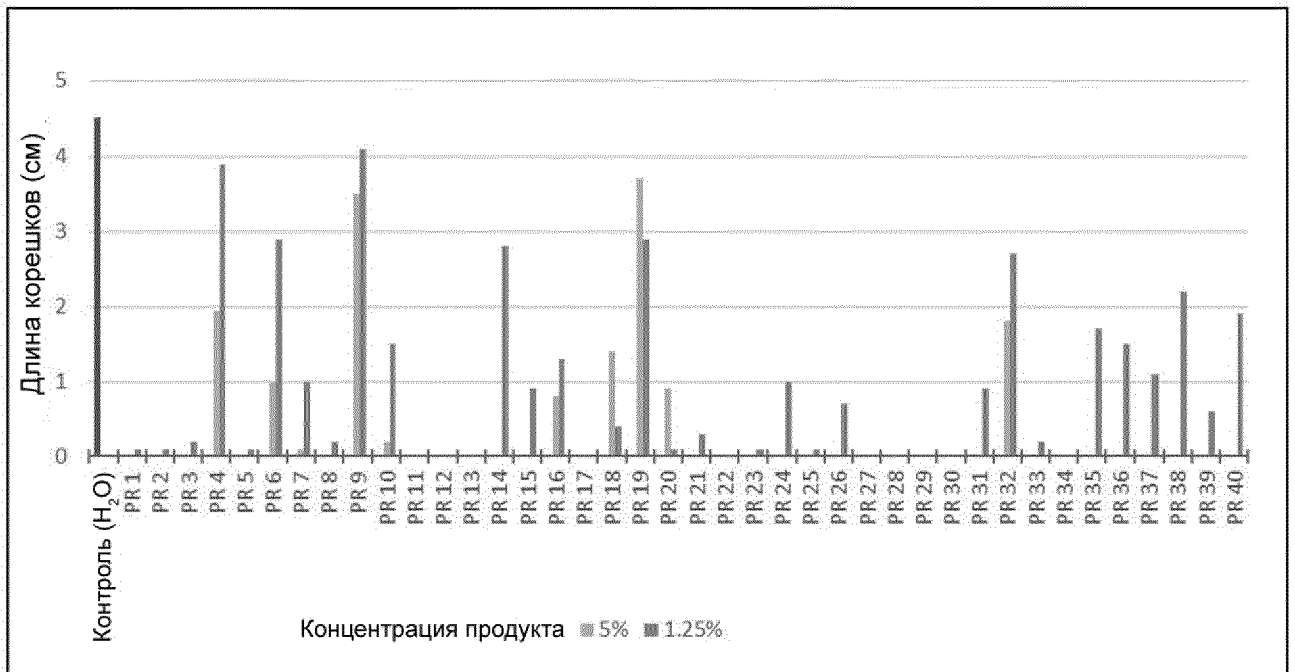


Фиг. 6В

## Испытания прорастания семян кабачка



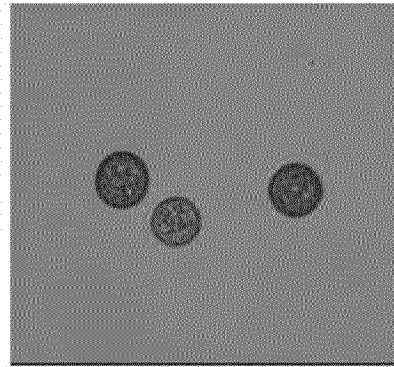
Фиг. 7А



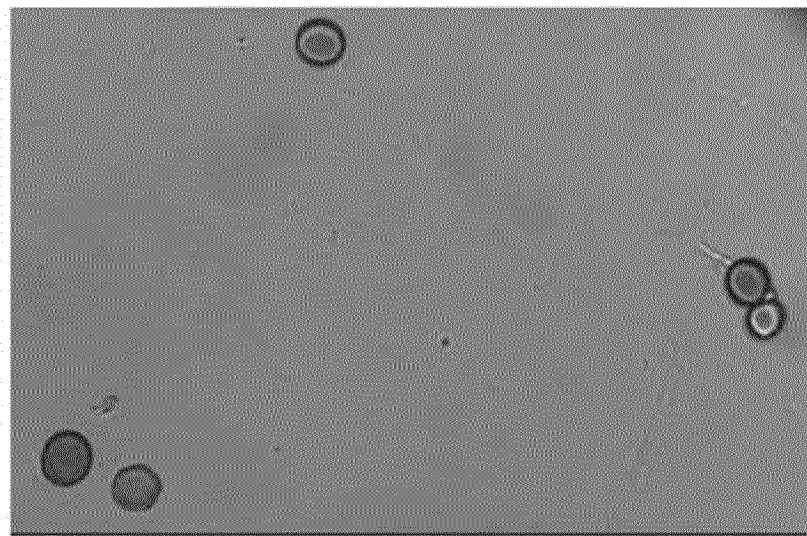
Фиг. 7В



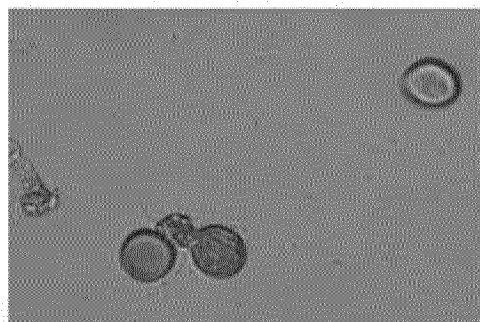
Испытания предпосевной обработки семян пшеницы,  
инфицированных *Tilletia caries*.



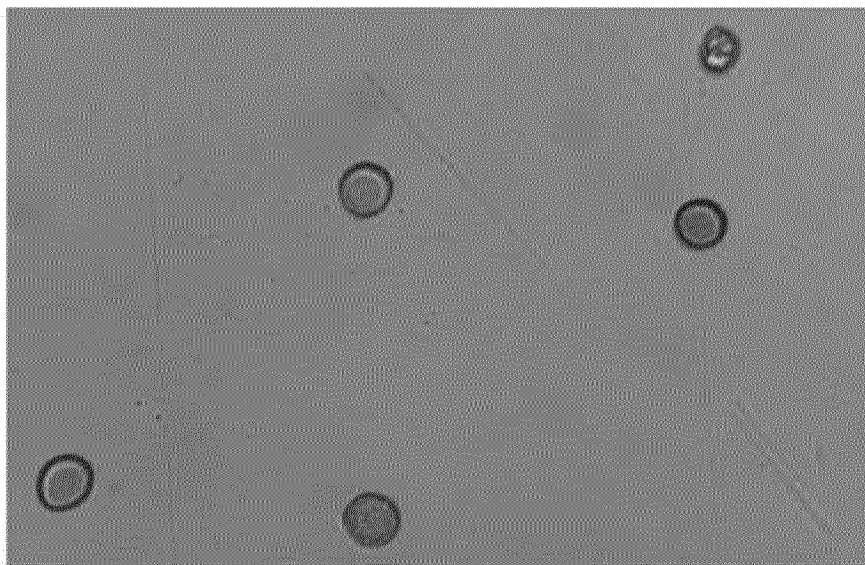
Фиг. 8А



Фиг. 8В

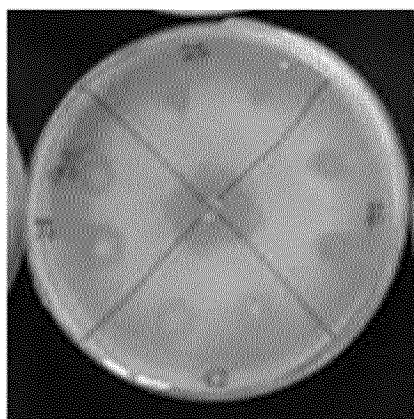


Фиг. 8С



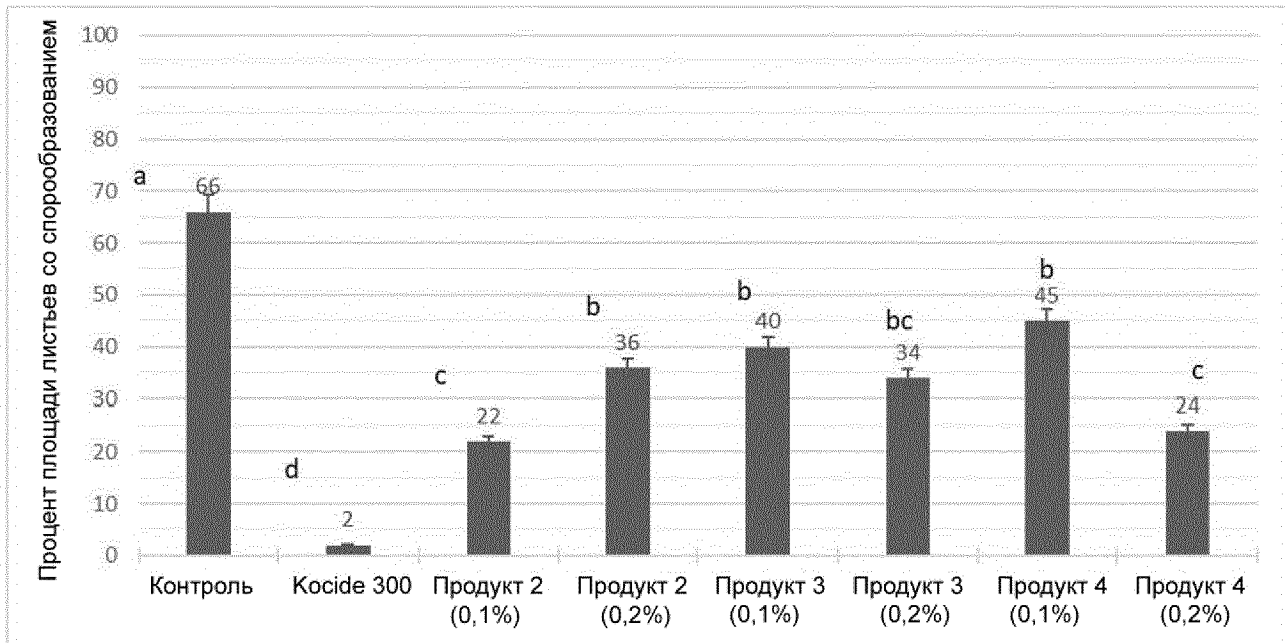
Фиг. 8D

Испытания на *Colletotrichum lupini*



Фиг. 9

## Испытания на виноградной лозе в теплице с искусственным инокулятом



Фиг. 10