

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033628**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.11

(21) Номер заявки
201692567

(22) Дата подачи заявки
2015.06.16

(51) Int. Cl. *A01P 1/00* (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A01N 37/46 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ У ПОЛЕЗНЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ, ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНО В ВИНОГРАДАРСТВЕ, А ТАКЖЕ У ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

(31) **10 2014 009 813.3**

(32) **2014.07.03**

(33) **DE**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/DE2015/000289**

(87) **WO 2016/000671 2016.01.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БИОПРАКТ ГМБХ (DE)

(56) JP-A-2011177105
JP-A-S5473182
CN-A-103461383
WO-A1-9102459
CN-A-101514331
JP-A-S5785307
WO-A1-0130161
DE-A1-102005048520

(72) Изобретатель:
**Герхардт Маттиас, Файффер Иоахим,
Кассемайер Ханс-Хайнц, Фукс Рене,
Якобс Зофи (DE)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу профилактики инфекций, вызванных грибами, в частности оомицетами, и бактериальных инфекций у полезных и декоративных растений. К областям применения относится выращивание винограда, плодов, овощей и декоративных растений. Целью настоящего изобретения является обеспечение способа профилактики инфекций, вызванных грибами, в частности оомицетами, и бактериальных инфекций, в частности ложной мучнистой росы (вызванной *Peronosporales*) и *Pseudomonas syringae*, при виноградарстве и овощеводстве. Неожиданно было обнаружено, что выбранные протеазы сами по себе и в комбинации с другими биологически активными ферментами эффективно предупреждают инфицирование растений определенными фитопатогенными организмами. Защищенное растение не инфицируется. Следовательно, предупреждается распространение патогена в культуре. Способ по настоящему изобретению отличается тем, что получают водный раствор протеазы сам по себе или в комбинации с β -глюканазами и/или хитиназами, смешивают со стабилизаторами, средствами, улучшающими адгезию, и смачивающими средствами и несколько раз наносят на растения с помощью традиционных методик в течение вегетационного периода, предпочтительно до наступления фаз высокого риска заражения, связанных с погодой.

B1**033628****033628****B1**

Настоящее изобретение относится к способу профилактики инфекций, вызванных грибами, в частности оомицетами, а также к профилактике бактериальных инфекций у полезных и декоративных растений. К областям применения относится овощеводство, плодоводство, виноградарство и выращивание декоративных растений, предпочтительно виноградарство и овощеводство.

Значимость, развитие и контроль инфекций, вызванных оомицетами

Заболевания у полезных и декоративных растений, а также у древесных растений ежегодно приводят к высоким экономическим потерям. Также при выращивании овощей и декоративных растений гидропонным способом в теплицах, грибы и оомицеты, такие как *Phytophthora*, *Pythium* и *Peronospora*, играют важную роль, поскольку вызывают заболевания растений (Malathrakis & Goumas, 1999; Paulitz & Berglinger, 2001). При овощеводстве (в частности, картофелеводстве и выращивании помидоров), плодоводстве, выращивании декоративных растений и виноградарстве, а также в лесоводстве они представляют особую значимость с экономической точки зрения. В 2013 г. в мировом масштабе картофель выращивали на землях сельскохозяйственного назначения, составляющих 19,3 млн га ("Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций", отдел статистики). В картофелеводстве наиболее важным патогеном, который приобрел еще большее значение при распространении культивирования на территории с более теплым климатом, является представитель оомицетов *Phytophthora infestans*, патоген, который вызывает фитофтороз (Oerke und Steiner, 1996). Его распространение подлежит контролю только благодаря постоянному применению фунгицидов (более чем 235 млн долларов США в год только для выращивания картофеля). Общая сумма денег только на фунгициды составляет 5,5 млрд долларов США в год (Powell & Jutsum, 1993).

В Германии ежегодно только на борьбу с вредителями в виноградарстве тратится примерно 100 млн евро (Ochßner, 2009). В экологическом виноградарстве применяются только медьсодержащие средства защиты растений. Однако такие средства являются экологически опасными и потенциально токсичными. В связи с этим вышеуказанное представляет большой интерес для создания альтернативных, усовершенствованных средств защиты, которые являются эффективными против патогенов и одновременно экологически чистыми.

В данном случае цикл размножения оомицетов будет описан с применением образца *Plasmopara viticola*, который вызывает ложную мучнистую росу виноградной лозы. Жизненный цикл разделен на две части по различному эпидемиологическому значению. Ооспора, которая имеет важное значение для выживаемости патогена во время зимы, формируется в фазе полового размножения. Во время летнего цикла бесполого размножения высвобождаются большие количества спорангиев. *Plasmopara viticola* зимует в виде ооспоры в почве в листовом опаде сильно зараженных листьев. В конце зимы ооспоры становятся всхожими и сохраняют свою способность всходить до раннего лета. Как только почва нагреется и выпадет достаточное количество осадков, они прорастают и формируют первичный спорангий. До середины июня ооспоры сохраняют всхожесть во время сильных дождей. Некоторые ооспоры также могут находиться в состоянии покоя в течение более года и прорасти в следующем году. Как правило, прорастание и высвобождение зооспор происходит из первичного спорангия, когда температура поднимается выше 10°C и выпадает более чем 8 мм осадков. В данных условиях, как правило, распускаются первые молодые листья виноградной лозы и, следовательно, может происходить первичное инфицирование. Для первичного инфицирования с помощью проросших зооспор листья должны быть достаточно смочены водой.

Только в данной фазе инфекцию можно предотвратить или подавить, если повреждение или ингибирование зооспор было успешным.

Первичное инфицирование является отправной точкой летнего цикла *Plasmopara viticola*, при котором патоген размножается бесполым способом с помощью спорангиев и может вызвать эпидемии, если условия размножения являются подходящими. Первичное инфицирование происходит после инкубационного периода, при котором патоген созревает внутри листа без видимых симптомов. Лечение инфекции в это время не представляется возможным. Рост и развитие патогена сильно зависят от температуры, так что при высоких температурах мицелий быстрее проникает в ткань листа и маслянистые пятна появляются раньше по сравнению с низкими температурами. В конце инкубационного периода так называемые маслянистые пятна появляются в качестве видимого симптома грибковой инфекции. Как только ночью относительная влажность поднимается выше 95%, а значения температуры сохраняются выше 12°C, спорангиофоры высовываются из устьиц инфицированной листовой пластинки. Спорангии распространяются с каплями воды или движением воздуха. Как только эти капли воды входят в контакт с зеленой частью своего растения-хозяина, зооспоры высвобождаются. Высвобождение зооспор и последующее инфицирование происходит в оптимальных условиях при 24°C в течение 4 ч. Если значения температуры ниже или выше, высвобождение зооспор задерживается и процесс инфицирования продлевается. *Plasmopara viticola* может инфицировать листья, соцветия, включая стебли, грозди винограда и верхушки побегов, если они имеют устьица и если они влажные. Маленьких капель воды уже достаточно для инфицирования, однако условия инфицирования являются более подходящими, если смачивание водой является обширным и сохраняется длительное время. После каждого инфицирования снова следует инкубационный период, а затем спорангии будут распространяться, как только ночью появится достаточная влажность. *Plasmopara viticola* принадлежит к полициклическим патогенам и может подвергаться нескольким

циклам размножения во время одного вегетационного периода. Если оптимальные условия для распространения спорангиев и для инфицирования сохраняются в течение длительных периодов, а инкубационные периоды сокращаются в связи с температурными условиями, эпидемия может развиваться стремительно. Засуха задерживает распространение *Plasmopara viticola* и препятствует прогрессированию эпидемий. Представляется возможным спрогнозировать локальные фазы высокого риска инфекции и, следовательно, принять определенные профилактические меры предупреждения.

В климатических условиях, преобладающих в центральной Европе, инфекций, вызванных такими патогенами, следует ожидать каждый год. В какой степени такие инфекции приводят к эпидемиям сильно зависит от ежегодных погодных условий и не поддается прогнозированию в начале вегетационного периода. Эпидемии, например ложной мучнистой росы виноградной лозы (*Plasmopara viticola*), могут становиться очень тяжелыми в случае высоковосприимчивых классических сортов винограда в течение нескольких дождливых дней. Следовательно, такая инфекция должна быть выявлена и контролироваться на ранней стадии. Если заражение уже находится на поздней стадии, более поздний контроль больше невозможен. По этой причине коммерческое выращивание растений является возможным только с применением мер предупреждения в отношении таких инфекций. Способ прогнозирования, который позволяет проводить специфические предупредительные меры борьбы, уже разработан для *Plasmopara viticola* в Федеральном исследовательском институте селекции винограда в Германии (Staatliches Weinbauinstitut) и был применен на практике.

На сегодняшний день предлагается множество фунгицидов для традиционного выращивания растений. Только в виноградарстве в настоящее время одобрено 29 фунгицидов для применения при ложной мучнистой росе виноградной лозы.

Для экологического виноградарства ложная мучнистая роса виноградной лозы представляет сложность, поскольку в данном случае предупредительная обработка является обязательной, а на сегодняшний день одобрены только медьсодержащие препараты (например, купрозин). В связи с известными экотоксикологическими вопросами, вызывающими озабоченность в отношении меди, существует острая необходимость найти альтернативные варианты данному средству. Такие альтернативные варианты, однако, должны иметь достаточную эффективность также при высоких темпах заражения. В течение многих лет в испытаниях демонстрировалось, что подавляющее большинство препаратов, которые одобрены в качестве укрепляющих средств для растений, не проявляют удовлетворительную эффективность против ложной мучнистой росы виноградной лозы. Некоторые укрепляющие средства для растений являются эффективными против ложной мучнистой росы виноградной лозы при низких темпах заражения, однако в данном случае мера по контролю не была бы здесь необходима. При более высоких темпах заражения, которые также оправдывают борьбу с коммерческой точки зрения, эффективность тестируемого препарата была недостаточной. Благодаря таким испытаниям очевидно, что биологический контроль в отношении ложной мучнистой росы виноградной лозы не применим при экологическом выращивании растений. Особенно в экологическом виноградарстве с ограниченной возможностью остановить эпидемию срочно необходимы эффективные и практически осуществимые подходы для биологического контроля эпидемий.

Значимость, развитие и контроль бактериальных инфекций

Хотя количество патогенных для растений бактерий меньше, чем количество патогенов, подобных грибам, степень повреждения полезных растений, вызванного бактериальными заболеваниями, очень высока. Бактерии рода *Xanthomonas* в мировом масштабе вызывают заболевания во всех главных группах высших растений, сопровождающиеся хлоротическими и некротическими поражениями, увяданием и гниением. Примером касательно высокой экономической значимости является черная гниль у сортов капусты, которая вызвана *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* является причиной побеления листьев/бактериального некроза риса при заражении растений риса, который является одним из наиболее серьезных заболеваний растений риса и, следовательно, причиной основных экономических и социальных проблем. Аналогичным образом следует упомянуть *Pathovar X. axonopodis* pv. *citri*, патоген, который вызывает рак цитрусовых, и *X. campestris* pv. *Vesicatoria*, патоген, который вызывает бактериальную пятнистость листьев на перцах и помидорах, что имеет экономическое значение, особенно в регионах с теплым и влажным климатом. Кроме того, следует упомянуть красную бактериальную гниль корней, вызванную патогеном *Erwinia amylovora*, которая является предметом обязательной отчетности. Растениями-хозяевами *E. amylovora* являются розоцветные, такие как яблоня, груша и айва. *E. amylovora* вызывает увядание листьев и цветов инфицированных растений, которые затем буреют или чернеют. Более того, следует упомянуть вид бактерий *Pseudomonas syringae*, которые вызывают различные заболевания растений, такие как рак, увядание и пятна у важных полезных растений, таких как помидор, перец и соя. Этот распространенный вид имеет очень важное значение для многих растений, выросших под стеклом, таких как помидор, огурец и кабачок.

Большая часть из описанных бактериальных патогенов растений принадлежат к группе протеобактерий и являются грамотрицательными организмами (например, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*). Однако также экономически значимыми являются грамположительные патогены, такие как *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis*, которые вызывают бактериальное увядание помидоров. Такой карантинный

вредитель имеет важное значение в более теплых и сухих регионах произрастания помидоров, а также в теплицах.

Патогенные бактерии растений имеют несколько стратегий выживания в окружающей среде, например в почве, в растительном материале, таком как семена, или в насекомых. Насекомые, другие животные и люди играют важную роль в их распространении. Вода, например, в виде капель дождя, является важным носителем в отношении распространения по растению. Если бактерии переносятся к растению-хозяину, они проникают через естественные отверстия, такие как устьица или гидатоды, через участки поражения растения. Высокая плотность бактерий, а также внешние условия, такие как дождь, высокая влажность или поврежденные участки, способствуют инфицированию растения. Бактерии могут легко размножаться внутри растения, при этом они колонизируют апопласт и повреждают оттуда целое растение. Они нарушают физиологию и морфологию растений и, таким образом, они вызывают симптомы заболевания, такие как некротические пятна, потеря листьев, образование парши, увядание или гниение (De la Fuente and Burdman, 2011).

Следовательно, крайне важным является защитить полезные растения от таких бактериальных инфекций и, таким образом, обеспечить безопасность их урожая. Различные химические соединения и соединения меди представлены в актуальном списке средств защиты растений с антибактериальным эффектом, который одобрен в Германии. Препараты, содержащие медь, являются единственными средствами, которые, в свою очередь, допускаются к применению в экологическом сельском хозяйстве. Виды обработки содержащими медь препаратами для контроля бактериального заболевания оказывают частичный эффект и демонстрируют их ограничения, как только плотность бактериального инокулята превышает определенный порог. В связи с известными экотоксикологическими эффектами соединений меди и других агрохимикатов существует обоснованное беспокойство по поводу применения таких средств защиты растений. Кроме того, даже в Германии в исключительных случаях предусмотрено применение средств, защищающих растения, которые содержат антибиотики, такие как стрептомицин, для контроля красной бактериальной гнили корней. В других странах стрептомицин является легальным средством против бактериального заболевания, но в то же время применение антибиотиков является чрезвычайно сомнительным из-за нежелательных эффектов в отношении окружающей среды, а также может обнаруживаться снижение эффективности при развитии устойчивости у бактерий при недифференцированном применении антибиотиков. Следовательно, крайне необходимо разработать улучшенные, высокоэффективные и коммерчески целесообразные альтернативные варианты таких средств, которые являются более экологически чистыми и более безопасными для пользователя.

Современное развитие стратегий по защите растений

1. Требования к химическим средствам защиты растений в отношении эффективности, избирательности, специфичности, биологического разрушения и эффективности в отношении нецелевых организмов постоянно повышаются. В то же время ряд новых средств защиты растений являются доступными, поскольку соответствуют таким требованиям. Применение множества устаревших соединений, таких как углеводороды (алдрин, DDT, DDD, дизлдрин, кельтан), в настоящий момент запрещено. Применяемые на сегодняшний день химические средства защиты растений, однако, (например, орто-фенилфенол E231 или тиабендазол E 233) подвергаются все большей и большей критике. Они демонстрируют множество вредных побочных эффектов, которые делают их применение проблематичным. Таковые включают, не говоря о повреждении полезного растения, изменение вкуса сельскохозяйственных культур, токсические эффекты в отношении многочисленных полезных организмов, развитие устойчивых популяций вредителей, неполное разложение микроорганизмами и, таким образом, слишком длительное существование и накопление в почве, а также окончательное выщелачивание в грунтовые воды и накопление в пищевой цепи людей и животных (источник: Umweltlexikon-www.umweltlexikon-online.de).

2. Все больше и больше разрабатывается способов биологической и комплексной защиты растений, такие как применение полезных организмов и феромонов против насекомых, применение передающихся через почву антагонистов бактерий и грибов, а также применение растительных экстрактов. Среди наиболее важных антагонистически действующих классов организмов находятся бактерии *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Streptomyces* и грибы *Trichoderma*, *Coniothyrium* и *Verticillium*. Особое значение в данном случае имеют бактерия *Bacillus subtilis*, которая, будучи "ризобактерией, стимулирующей рост растений" (PGPR), выделяет фитосанитарные метаболиты и грибы рода *Trichoderma*, штаммы которого применяют в качестве "средства биоконтроля" (Kücü, C. and M. Kivanc, 2002; DeMarco, J.L., et al., 2003). В то время как многих вредителей-животных можно в достаточной мере контролировать с помощью таких биологических способов, с инфекциями, вызванными оомицетами, бороться исключительно сложно. В сельскохозяйственном секторе следующие заболевания растений имеют чрезвычайно важное значение в связи с их риском инфицирования и последующей их потерей (табл. 1).

Таблица 1

	Таксоно- мическая группа	Заболевание	Сельскохо- зяйственная площадь	Примеры
Грибы	Аскомицеты	Настоящая мучнистая роса	Выращивание овощей, зерновых, плодов, винограда и декоративных растений	<i>Erysiphe necator</i> (виноградная лоза), <i>Blumeria graminis</i> (зерновые)
	Аскомицеты	Серая гниль	Выращивание овощей, плодов, винограда и декоративных растений	<i>Botrytis cinerea</i> (земляника, виноградная лоза и т. д.)
	Базидиомицеты	Виды ржавчины	Выращивание овощей, зерновых, плодов и декоративных растений	<i>Puccinia graminis</i> (зерновые), <i>Phakospora pachyrhizi</i> (соя)
	Базидиомицеты	Головня	Выращивание овощей, зерновых, плодов и декоративных растений	<i>Ustilago maydis</i> (маис), <i>Ustilago hordei</i> (ячмень)

Оомицеты	Оомицеты	Ложная мучнистая роса, фитофтороз	Выращивание овощей, плодов, винограда и декоративных растений	<i>Phytophthora infestans</i> (картофель и помидоры), <i>Plasmopara viticola</i> (виноградная лоза)
	Протеобактерии	Красная бактериальная гниль корней, увядание, пятна и другое	Выращивание овощей, зерновых, плодов и декоративных растений	<i>Erwinia amylovorans</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>
Бактерии	Актиномицеты	Увядание и другое	Выращивание овощей, зерновых, плодов и декоративных растений	<i>Clavibacter michiganensis</i>

Уровень техники

Известно, что препараты на основе фермента, расщепляющего гликозид, типа гидролаз полисахаридов, отличных от крахмала, эффективны при профилактике и терапии патогенных грибов растения. В данном случае предполагается прямая атака ферментом структур клеточных стенок грибов, в частности оомицетов (DE 10 2205 048 520, Biopract GmbH). Однако такие типы гидролиза могут также повреждать клеточную стенку растения и, следовательно, они являются только частично пригодными для защиты растений.

Применение ферментов типа гидролаз полисахаридов, отличных от крахмала, для профилактики и терапии фитопатогенов грибкового происхождения также поддерживается целым рядом полученных данных в других областях. Например, были накоплены данные в борьбе с микозами ооцитозов рыб посредством комплексных препаратов на основе фермента из *Trichoderma* spp. (WO 2004/002574 A1 Biopract GmbH).

В патенте США 6663860 (выданном Tvedten 16 декабря 2003 года) описаны протеазы в качестве пестицида среди прочего против насекомых, бактерий и грибов. Однако применение для профилактики микозов в виноградарстве не предполагается.

Кроме того, комбинация пестицида и фермента, например протеазы, описана в различных патентных документах. В настоящем документе описан эффект, обусловленный скорее пестицидом, а не только добавленным ферментом (WO 2013/096383 A2, CN 103461383 A, WO 1997/047202 A1, WO 1990/003732 A1). В других патентных документах описана комбинация детергентов и ферментов (US 7393528 B2), растительных экстрактов и белков (WO 2001/030161 A1), а также поверхностно-активных веществ и фермента (EP 184288 A1). Также эти публикации не демонстрируют, что пестицидный эффект обусловлен самим ферментом.

Наконец, ферменты или комбинации ферментов, которые проявляют среди прочего противогрибковый или антибактериальный эффект, были описаны раньше, например протеаза растений (WO 1991/002459 A1), протеаза дождевого червя (JP 2011177105A) или надосадочная жидкость культуры *Bacillus* после ферментации (JP 54073182 A).

Ни в одном из упомянутых выше изобретений не описано сравнительно эффективное решение все еще существующей проблемы заражения полезных растений оомицетами и бактериями. Протеазы, описанные в настоящем документе, обеспечивают высокую эффективность и одновременно экологически безопасную альтернативу в отношении универсальных средств защиты растений.

Цель настоящего изобретения

Целью настоящего изобретения является разработка высокоэффективного средства для контроля

инфекций, вызванных грибами, в частности оомицетами, и бактериальными инфекциями у полезных и декоративных растений, которое является безвредным для самого растения, а также для экосистемы. Основной целью настоящего изобретения является разработка способа профилактики инфекций полезных растений, применяемых в сельском хозяйстве, которые вызваны фитопатогенами. В частности, проблема распознавания и предотвращения эпидемий, таких как ложная мучнистая роса виноградной лозы винных сортов, в ближайшее время должна быть решена. Получение подходящего средства также включено в настоящее изобретение.

Данная проблема решается с помощью мер, описанных в формуле изобретения. Способ в соответствии с настоящим изобретением отличается тем, что получают концентрат и готовый к применению раствор соответственно, которые содержат только протеазу или комбинацию протеаз и β -глюконаз и/или хитиназ. Сущностью настоящего изобретения является неожиданная возможность получать протеазы сами по себе в качестве эффективного средства для контроля инфекций у полезных и декоративных растений.

Кроме того, защитные средства могут содержать стабилизаторы, средства, улучшающие адгезию, и смачивающие средства, которые улучшают свойства в отношении применения. Общепринятые стабилизаторы, обеспечивающие несмываемость дождем, и стабилизаторы, защищающие от ультрафиолетового излучения, могут также быть включены в такие смеси.

Такую смесь наносят с помощью традиционных систем нанесения в установленные промежутки времени, которые определяются на основе погодных условий, путем смачивания всего растения. Применение можно осуществлять при значениях температуры от 4 до 34°C и, следовательно, во время всего вегетационного периода. В случае культивирования растений под стеклом применение практически не зависит от погодных условий и диапазона температур от 15 до 25°C. Такой способ применения гарантирует, что препараты на основе фермента являются активными, и заражение растений, например зооспорами фитопатогенных оомицетов или бактериальных патогенов, таких как *Pseudomonas syringae*, предотвращается. Применяемое количество на единицу площади должно быть определено в зависимости от полезного растения. Например, в виноградарстве примерно от 400 до 800 л смеси раствора для распыления на сегодняшний день применяется на площади в 1 га. Описанные препараты на основе фермента смешивают таким образом, что можно продолжать использовать методику традиционного распыления.

Описанное настоящее изобретение представляет собой значительный прогресс по сравнению с общепринятыми на сегодняшний день средствами и способами.

Далее описываются преимущества в сравнении с уровнем техники.

В отличие от медьсодержащих препаратов или других химических средств защиты растений, применение препаратов на основе фермента является безвредным для экосистемы, поскольку вещество полностью разрушается в почве и не накапливается. Следовательно, предотвращается нанесение вреда окружающей среде.

Отсутствуют фитотоксичные реакции, поскольку применяемые протеазы в соответствии с настоящим изобретением не воздействуют на поверхность растения.

Протеазы и другие ферменты являются эффективными во время роста растений. Они не прилипают к одному участку структуры листа, а распространяются в виде жидкой пленки по поверхности.

Эффективность фермента сохраняется неизменной в течение соответствующего периода, составляющего несколько дней, несмотря на дождь и ультрафиолетовое излучение. При необходимости такая устойчивость может быть улучшена с помощью подходящих составов.

Протеазы, также называемые пептидазами, расщепляют пептидные связи в белках и тем самым стимулируют их распад на пептиды или аминокислоты.

Исходя из механизма их действия протеазы делятся на следующие группы: сериновые протеазы, EC 3.4.21.-, (S), цистеиновые протеазы (C), аспарагиновая протеаза (A), металлопротеазы (M) и неизвестные или до сих пор неклассифицированные протеазы (Handbook of Proteolyse Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner (eds), Academic Press (1998)).

Описанные протеазы, которые применяют в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой, в частности, сериновые протеазы. Каталитический механизм данного класса ферментов основан на нуклеофильной гидроксильной группе аминокислоты серина, которая может расщеплять пептидные связи. Соответствующие ферменты можно получать из надосадочных жидкостей культуры, например микроорганизмов рода *Nocardiosis* или *Bacillus*. Соответствующие ферменты также можно получать рекомбинантным путем. Более того, эффективные протеазы могут представлять собой мутанты, варианты или фрагменты описанных ферментов, которые действуют аналогично.

Активность протеаз можно определять с помощью любого способа выявления, в котором применяют субстрат, который содержит соответствующие пептидные связи (например, казеин).

Неожиданно было обнаружено, что препараты на основе протеаз, которые применяют, например, для питания животных, предотвращают инфицирование растений фитопатогенными оомицетами и бактериями. В частности, зооспоры, которые появляются во время цикла размножения оомицетов и которые являются ответственными за фактическое инфицирование ткани листа, подвергаются необратимому повреждению посредством активности данных ферментов, и инфицирование защищенного таким образом

растения не возникает. До сих пор не был освещен механизм действия против бактериального заражения. Существенное влияние данных ферментов не было ожидаемо до такой степени, поскольку механизмы действия и точки воздействия не соответствуют механизму действия, описанному для β -глюканаз или хитиназ. Защитный эффект может быть улучшен посредством комбинации с β -глюканазами и/или хитиназами.

Коммерчески доступные препараты, которые содержат описанные протеазы, представляют собой, например, Ronozyme®ProAct® (DSM Nutritional Products AG, примеры 1-9: Prot III), который содержит сериновую протеазу из *Nocardopsis* sp., или Alcalase® (Novozymes AG), который содержит в основном одну сериновую протеазу, субтилизин А из *Bacillus licheniformis*. Кроме того, выбранные препараты на основе протеазы, которые демонстрируют защитный эффект, представляют собой препараты от компании Lumis Enzymes (PAP 2XS), которые, насколько известно, содержат папаин из папайи, от компании Cyadic (Protease Plus, Protease AP Conc) и от компании AB Enzymes (BIOTOUCH ROC 250LC), которые содержат, насколько известно, протеазу из *Trichoderma*.

Глюканазы и хитиназы представляют собой ферменты, которые могут гидролизировать глюканы или хитин. Они относятся к классу ферментов Е.С. 3.2.1.-, который включает гликозидазы, т.е. ферменты, которые расщепляют О-и S-гликозидные связи.

Исходя из характеристик определенного заболевания, фермент против патогенов листа (например, ложной мучнистой росы или *Pseudomonas syringae*) применяют путем обработки надземных частей растения (посредством обработки распылением) при концентрациях препарата на основе фермента от 0,001 до 1%. Протеазы и гликозилазы предпочтительно применяют в различных соотношениях компонентов в смеси из отдельных ферментов.

Эффект, обеспечиваемый препаратами на основе фермента в соответствии с настоящим изобретением, который проявляется при предотвращении случая инфекции, достигается при применении протеаз самих по себе или в виде смеси.

Ферменты получают из надосадочных жидкостей культуры микроорганизмов. Компоненты для инактивации патогена предпочтительно применяют в водной среде с рН, находящимся в диапазоне от 4,5 до 8,5, предпочтительно рН находится в диапазоне от 6,0 до 7,5. Они применяются при температуре воды от 4 до 34°C, предпочтительно от 10 до 25°C.

В дальнейшем настоящее изобретение будет проиллюстрировано с помощью примеров. На примерах 1-7 продемонстрировано применение протеаз в качестве защиты от оомикетов, в то время как на примерах 8 и 9 описан защитный эффект от бактериальных инфекций. Ronozyme®ProAct® (DSM Nutritional Products AG) применяли в качестве протеазы III.

Примеры

Защита полезных растений от инфекции, вызванной оомикетами

Пример 1. Подавляющий эффект в отношении инфекции, обеспечиваемый регулярным внекорневым внесением препаратов на основе фермента, расщепляющего белок, против *Plasmopara viticola* в листовых пластинках.

Листовые пластинки винограда *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau обрабатывали один раз различными препаратами на основе фермента, расщепляющего белок (протеазой I, II и III), посредством обработки распылением так, чтобы нижняя сторона листа используемых листовых пластинок равномерно смачивалась. Препараты содержали каждую из сериновых протеаз, полученную или из видов рода *Nocardopsis*, или *Bacillus*. Препараты на основе фермента, применяемые для обработки, тестировали при концентрациях в диапазоне от 0,01 до 1% (об./об.). Значение рН препаратов, растворенных в воде, находилось в диапазоне от 6 до 7,5. В качестве контроля на листовые пластинки распыляли медьсодержащее средство защиты растений или воду. Через 24 ч после обработки проводили искусственное инфицирование листовых пластинок с помощью *Plasmopara viticola* (примерно 40000 спор на 1 мл воды), патогена, который вызывает ложную мучнистую росу виноградной лозы. Затем листовые пластинки инкубировали на водных агаровых пластинках при 22°C в течение 6 дней в климатической камере для растений с режимом день-ночь.

Степень заражения рассчитывали исходя из соотношения общей площади листа и инфицированной площади листа. Для анализа применяли программное обеспечение для оценки изображений, с помощью которого определяли различия между общей площадью (количество зеленых пикселей листовых пластинок в начале эксперимента) и инфицированной площадью (количество белых пикселей в конце эксперимента). Два из тестируемых препаратов на основе протеазы (I, III), а также медьсодержащее средство защиты растений (купрозин) эффективно предотвращали заражение и развитие *Plasmopara viticola* (0% заражения), третий препарат, протеаза II, предотвращал заражение только до некоторой степени (38% заражения). Однако листовые пластинки, на которые распыляли воду, демонстрировали заметное заражение (см. табл. 2 и фиг. 1).

Таблица 2

	Степень заражения (MW)	Стандартное отклонение
H ₂ O	87%	6%
Купрозин	0%	1%
Протеаза I	0%	1%
Протеаза II	38%	28%
Протеаза III	0%	0%

Степень заражения (%) рассчитывали исходя из соотношения общей площади листовой пластинки и инфицированной площади на листовую пластинку после обработки листовых пластинок с помощью трех различных препаратов на основе протеазы (n=36).

Пример 2. Подавляющий эффект в отношении инфекции, обеспечиваемый регулярным внекорневым внесением комбинацией протеаз, хитиназ и препаратов на основе фермента., расщепляющего гликозид, против *Plasmopara viticola* в листовых пластинках.

Листовые пластинки винограда *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau обрабатывали один раз комбинацией ферментов, включающей протеазу, хитиназу и β -глюканазу при соотношении компонентов в смеси 1:1:1 посредством нанесения распылением так, чтобы нижняя сторона листа используемых листовых пластинок равномерно смачивалась. Концентрация применяемых препаратов на основе фермента составляла 0,1% (об./об.) для каждого фермента. Значение pH в разбавленных водой препаратах находилось в диапазоне от 6 до 7,5. В качестве контроля на листовые пластинки распыляли медьсодержащее средство защиты растений или воду. Через 24 ч после обработки проводили искусственное инфицирование листовых пластинок с помощью *Plasmopara viticola* (примерно 40000 спор на 1 мл воды), патогена, который вызывает ложную мучнистую росу виноградной лозы. Затем листовые пластинки инкубировали на водных агаровых пластинках при 22°C в течение 6 дней в климатической камере для растений с режимом день-ночь.

Степень заражения рассчитывали исходя из соотношения общей площади листа и инфицированной площади листа. Для анализа применяли программное обеспечение для оценки изображений, с помощью которого определяли различия между общей площадью (количество зеленых пикселей листовых пластинок в начале эксперимента) и инфицированной площадью (количество белых пикселей в конце эксперимента). Развитие *Plasmopara viticola* эффективно предотвращалось на листовых пластинках, которые обрабатывали ферментами и медьсодержащим средством защиты растений.

Пример 3. Подавляющий эффект в отношении инфекции, обеспечиваемый регулярным внекорневым внесением препаратов на основе фермента, расщепляющего белок, против *Plasmopara viticola* у тепличных растений.

Растения молодого винограда сорта *Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau один раз целиком обрабатывали препаратом на основе фермента, расщепляющего белок (протеаза III), при помощи стационарного аппарата для нанесения. Концентрации применяемых препаратов на основе фермента составляли 0,1, 0,2 и 0,5% (об./об.). Значения pH в смесях для распыления регулировали от 6,5 до 7,5. В качестве контроля на дополнительный горшечный виноград распыляли медьсодержащее средство защиты растений или воду. Через 24 ч после обработки препаратом на основе протеазы проводили искусственное инфицирование листьев с помощью *Plasmopara viticola*, патогена, который вызывает ложную мучнистую росу виноградной лозы. Затем растения инкубировали в течение одной недели в теплице при 20°C. Заражение определяли путем визуального осмотра, получали в виде доли (%) соответственно болезненных и некротических изменений в листьях и стеблях по отношению к общей массе растения на повторность (100%) и фиксировали результаты фотографическим способом. Применяли шкалу баллов с градацией 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 90, 100% изменений, вызванных заболеванием.

Развитие и распространение *Plasmopara viticola* эффективно предотвращалось на растениях, которые обрабатывали протеазой III и медьсодержащими средствами защиты растений, тогда как листья, на которые распыляли воду, демонстрировали высокий уровень заражения (фиг. 2).

Пример 4. Подавляющий эффект в отношении инфекции, обеспечиваемый периодическим внесением препаратов на основе фермента, расщепляющего белок, против *Plasmopara viticola* в полевых испытаниях.

На целые растения винограда сорта *Vitis vinifera* cv. Blauer Spätburgunder распыляли препарат на основе фермента, расщепляющего фермент (Prot III), с помощью распылительного устройства туннельного типа во время вегетационного периода с повторениями в промежутках от 8 до 14 дней так, чтобы поверхность растений винограда равномерно смачивалась. Концентрация применяемого препарата на

основе фермента составляла 0,1% (об./об.). Значения pH в смесях для распыления регулировали от 6,5 до 7,5. Для улучшения смачивания листьев дополнительно добавляли смачивающее средство (TREND 90).

В конце вегетационного периода оценивали степень заражения и частоту заражения ложной мучнистой росой на листьях и гроздях винограда. Развитие *Plasmopara viticola* эффективно предотвращалось на винограде в открытом грунте.

Пример 5. Подавляющий эффект в отношении инфекции, обеспечиваемый препаратами на основе фермента, расщепляющего белок, против патогена, который вызывает фитофтороз (*Phytophthora infestans*) на растениях помидора.

На помидоры сорта Red robin распыляли препарат на основе протеазы на стадии 4 листьев (протеаза III, 0,1% (об./об.)). Значения pH в смесях для распыления регулировали от 6,5 до 7,5. В качестве дополнительных вариантов добавляли универсальные смачивающие средства (T/S forte, Biomaxima, Nufilm) при концентрации 0,02% (об./об.) раствора протеазы. Коммерческий препарат на основе меди Atempro и вода служили в качестве внутренних контролей. На каждый вариант получали 5 повторов, каждый от одного растения.

Через 24 ч после применения ферментов проводили искусственное заражение патогеном *Phytophthora infestans* при концентрации спорангиев 80000 спор/мл. Для каждого растения применяли 6 мл взвеси. Растения помещали в термостат примерно при 16°C и относительной влажности 100% без света. Через 24 ч устанавливали световой режим 16:8 ч и выключали увлажнитель. Балльную оценку проводили через 6 дней после инфицирования. Заражение определяли при визуальном осмотре, получали в виде доли (%) болезненных и некротических изменений в листьях и стеблях по отношению к общей массе растения и фиксировали результаты фотографическим способом. (табл. 3).

Таблица 3

Заражение *Phytophthora infestans* и эффективность препарата на основе протеазы

№	Вариант	Среднее значение заражения [%] (стандартное отклонение)	Эффективность [%]
1	Протеаза III	12,00 (2,74)	87,50
2	Протеаза III + T/S –Forte	18,00 (2,74)	81,25
3	Протеаза III + BioMaxima	11,00 (5,48)	88,54
4	Протеаза III + Nufilm P	12,00 (2,74)	87,50
5	Atempro (медьсодержащий эталон)	1,80 (1,79)	98,13
6	Вода в качестве контроля	96,00 (5,48)	0,00

Пример 6. Подавляющий эффект в отношении инфекции, обеспечиваемый препаратами на основе фермента, расщепляющего белок, против *Pseudoperonospora cubensis* на растениях огурца.

Растения огурца выращивали в климатроне. Для доказательства защитного эффекта протеаз на нижнюю сторону листьев распыляли примерно 6 мл препарата на основе протеазы (Prot III), который представлял собой водный раствор при концентрации 0,1%. Значения pH в смесях для распыления регулировали от 6,5 до 7,5. Общепринятый препарат на основе меди (Cuprozin Progress) и вода служили в качестве контролей. На каждый вариант получали 6 повторов, каждый от одного растения. Через день после применения ферментов опытные растения инфицировали *Pseudoperonospora cubensis* (75000 спор/мл).

Инкубацию проводили при комнатной температуре в теплице при относительной влажности более чем 95%. В течении первых 48 ч растения инкубировали в темноте, затем растения содержали с режимом день-ночь 16/8 ч. Балльную оценку проводили через 10 дней после инфицирования. Следовательно, определяли пропорциональную долю заражения растений. Заражение могло уменьшаться менее чем до 4% с применением препарата Prot III (табл. 4).

Таблица 4

№	Вариант	Среднее значение заражения [%] (Стандартное отклонение)	Эффективность [%]
1	Протеаза III	3,6 (0,4)	94,1
5	Cuprozi Progress (медьсодержащий стандартный образец)	9,0 (4,7)	85,2
6	Вода	60,4 (11,9)	0,00

Пример 7. Сравнение подавляющего эффекта в отношении инфекции, обеспечиваемого различными препаратами на основе протеазы против *Pseudoperonospora cubensis* на растениях огурца.

Растения огурца выращивали в климатроне. Для сравнения эффективности различных препаратов на основе протеазы на нижнюю сторону листьев распыляли примерно 6 мл каждого препарата на основе протеазы (Prot III-Prot IX), который представлял собой водный раствор при концентрации 0,1%. Значения pH в смесях для распыления регулировали от 6,5 до 7,5.

Общепринятый препарат на основе меди (Cuprozin Progress) и вода служили в качестве контроля. На каждый вариант получали 6 повторов, каждый от одного растения. Через день после применения ферментов опытные растения инфицировали *Pseudoperonospora cubensis*. Инкубацию проводили при комнатной температуре в теплице при относительной влажности более чем 95%. В течение первых 48 ч растения инкубировали в темноте, затем растения содержали с режимом день-ночь 16/8 ч. Балльную оценку проводили через 10 дней после инфицирования. Таким образом, определяли пропорциональную долю заражения растений. Эффективность отдельных препаратов представлена в табл. 5. Препаратом с самым лучшим эффектом была протеаза III. Протеазы IV, VIII и IX обладали сходным эффектом. Насколько известно, указаны организмы, из которых происходит соответствующая протеаза.

Таблица 5

ID образца	Источник	Продукт	Среднее значение заражения [%] (Стандартное отклонение)	Эффективность [%]
Prot III	Nocardopsis	Ронозим ProAct	0,4 (0,4)	98,6
Prot IV	Bacillus	Алкалаза	0,5 (0,4)	98,3
Prot V	Bacillus	Савиназа	9,8 (4,8)	65,8
Prot VI	Aspergillus	Флаворзим	35,0 (21,5)	-

Prot VIII	Папайя	PAP 2XS	0,8 (0,3)	97,2
Prot IX	Bacillus	Protease AP Conc	1,0 (0,6)	98,5
Медьсодержащий фунгицид	-	Cuprozin Progress	7,4 (6,2)	74

Краткое изложение касательно препаратов на основе протеазы, которые применяли в эксперименте, а также заражения и соответствующих показателей эффективности.

Защита полезных растений от инфекции, вызванной бактериями

Пример 8. Эксперимент с применением чашек для доказательства ингибирующего эффекта в отношении роста, обеспечиваемого протеазой, против *Clavibacter michiganensis*.

Культуру *Clavibacter michiganensis* выращивали до поздней фазы логарифмического роста и соответственно разбавляли до $OD_{600nm}=1,0$ в 10 нМ растворе NaCl. Такую стартовую культуру высевали на чашки в 12 разведениях в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-12} на каждый питательный агар, который содержал препарат на основе протеазы III при концентрациях 0,01-1%. Две контрольные чашки не содержали протеазу III и демонстрировали максимальный рост *Clavibacter michiganensis* в заданных условиях (фиг. 3, слева: 10^{-5}). Бактериальный рост эффективно ингибировали посредством протеаз при концентрациях начиная от 0,05%, поскольку только при наиболее концентрированных разведениях происходил рост (от 10^{-1} до 10^{-3} , см. фиг. 3). Высокий потенциал протеазы III в качестве средства защиты растений для контроля бактериального увядания у помидоров (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) становится очевидным в данном эксперименте.

Пример 9. Защита растений помидора от инфекций, вызванных *Pseudomonas syringae*.

Для данного эксперимента на растения помидоров сорта "Red Robin" распыляли раствор протеазы 0,1% (протеазы III) с добавлением и без добавления средства, улучшающего адгезию (NufilmP) и инкубировали при 22°C в течение 24 ч. Значение pH в смеси для распыления регулировали от 6,5 до 7,5. В качестве контроля служили 4 растения, на каждое из которых распыляли водопроводную воду и имитирующий раствор соответственно. Через 24 ч после применения ферментов растения инфицировали *Pseudomonas syringae*.

Первые образцы больших листовых сегментов 0,7 см² брали через два часа после инокулирования, дополнительные образцы брали в день 7, 14 и 21 после инокулирования. Для анализа брали 4 различных отдельных листа от каждого из 4 различных растений и от каждого из таких четырех различных отдельных листьев брали 4 листовых сегмента для анализа. В начале количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на листовой сегмент составляло 1×10^3 . В контроле (вода) количество КОЕ повышалось до 1×10^6 КОЕ на листовой сегмент в течение трех недель. Состояние растений, которых обрабатывали протеазой III, сохранялось на постоянном уровне (10^3 КОЕ на лист) в первые две недели. Через три недели количество КОЕ на лист на листьях, обработанных протеазой, значительно уменьшалось до 10 КОЕ на листовой сегмент (фиг. 4). Применяемая протеаза была намного более эффективна, чем имитирующее вещество.

Литература.

DE LA FUENTE, L. and BURDMAN, S. 2011. Pathogenic and beneficial plant-associated bacteria. In Agricultural Sciences, [Ed.Rattan Lal], in Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [<http://www.eolss.net>]

DE MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C. and CR. FELIX, 2003: Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicios*, the causal agent of witches' broom of cocoa. Brazilian J. Microbiol. 34, 33 - 38

KASSEMEYER H.-H. (2004) Forschungsvorhaben für das Programm des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft zur Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie zum Technologie- und Wissenstransfer im ökologischen Landbau. „Innovationen zur Verbesserung der Rahmenbedingungen für den ökologischen Weinbau. Erarbeitung von wissenschaftlichen Ansätzen zur biologischen Kontrolle der Rebenperonospora und für Strategien zu deren Regulierung im ökologischen Weinbau", Projektnummer 020E269, Staatliches Weinbauinstitut Freiburg

KUDO, S. and C. TESHIMA, 1991: Enzyme activities and antifungal action of fertilization envelope extract from fish eggs. The Journal of Experimental Zoology 259, 392 - 398

KUDO, S., 1992: Enzymatic basis for protection of fish embryos by the fertilization envelope. Experientia 48, 277 - 281

KUDO, S., 2000: Enzymes responsible for the bactericidal effect in extracts of vitelline and fertilization envelopes of rainbow trout eggs. Zygote 8, 257 - 265

KÜCÜK, C. and M. KIVANC 2002: Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Türk. J. Biol. 27, 247-253

MALATHRAKIS, N.E., GOUMAS, D.E. 1999: Fungal and bacterial diseases. See Ref. 4 pp. 34-47.

MÜNCH, S., NEUHAUS, J.M., BOLLER, T., KEMMERLING, B. and K.H. KOGEL 1997: Expression of β -1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing Sr5 or Sr24-specific rust resistance. Planta 201, 235-244

OERKE, E.CH. und U. STEINER 1996: Ertragsverluste und Pflanzenschutz: Die Anbausituation für die wirtschaftlich wichtigsten Kulturen. Schriftenreihe der deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

PAULITZ, T.C. BELANGER, R.R. 2001: Biological control in greenhouse Systems. Annu. Rev. Phytopathol. 39, 103-133

POWELL, K. A., JUTSUM, A. R. (1993) Technical and commercial aspects of biocontrol products. Pestic. Sei. 37, 315-321.

SCALA F., S.L. WOO, I. GARCIA, A. ZOINA, E. FILIPPONE, J.-A. PINTOR- TORO, G. DEL SORBO, B. ALOJ and M. LORITO. 1998. Transgenic tobacco and potato plants expressing antifungal genes from *Trichoderma* are resistant to several plant pathogenic fungi. 7th International Congress of Plant Pathology, August 9-16 1998, Edinburgh, Scotland, Offered Papers Abstracts - Volume 3: 5.3.10.

WO 2004/002574 A1 Biopract GmbH, Berlin; LEIBNIZ-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei im Forschungsverbund Berlin e.V. Verfahren zur Prophylaxe und Therapie von Mykosen bei Fischen und Wirbellosen und deren Entwicklungsstadien. (expired)

DE 10 2205 048 520 Biopract GmbH, Berlin GmbH, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt. Verfahren zur Prophylaxe und Therapie von Mykosen bei Nutz- und Zierpflanzen sowie bei Gehölzen, insbesondere in hydroponischen Systemen, 07.10.2007

Подписи к фигурам

Фиг. 1. Листовые пластинки, обработанные водой (А), медьсодержащим средством защиты растений (В), протеазой I (С), протеазой II (D) или протеазой III (Е).

Фиг. 2. Тест на эффективность Prot III у горшечных растений винограда Müller-Thurgau. Представлена степень заражения *P. Viticola* в вариантах, обработанных протеазой III от 0,01% до 0,5%, по сравнению с внутренними стандартами, водой в качестве контроля и эталонным раствором на основе меди. Степень заражения эффективно снижалась с применением Prot III. Повышенная степень заражения растений, обработанных с помощью 0,5% Prot III (*), была обусловлена распылением на затененные зоны отдельного листа. Степень заражения рассчитывали исходя из пропорциональной доли заражения 6 отдельных растений не более чем с 6 листьями на вариант.

Фиг. 3. Представлен ингибирующий эффект протеазы III в отношении роста *S. michigenensis*. Представлены серии разведений бактериальной культуры для различных концентраций протеазы III. Числа под чашками с агаром указывают разведение, до которого бактерии росли.

Фиг. 4. Пролиферация бактерий *P. syringae* в листовых сегментах помидора в течение 21 дня после заражения. Растения помидора обрабатывали имитирующим контролем (холостая проба) и распыляли на них протеазу III или протеазу III в Nufilm-P соответственно. Колониеобразующие единицы (КОЕ) выделяли из 0,7 см² листовых сегментов и подсчитывали после инкубирования в течение 48 ч.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ профилактики инфекций у полезных и декоративных растений, отличающийся тем, что на растения распыляют водный раствор, содержащий бактериальную сериновую протеазу, полученную из *Nocardiopsis* sp.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный водный раствор содержит в качестве активного протеина только указанную бактериальную сериновую протеазу.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный водный раствор дополнительно содержит бактериальную сериновую протеазу, полученную из *Bacillus* sp.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанные инфекции вызваны оомицетами.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что указанные оомицеты представляют собой *Plasmopara viticola*, *Phytophthora infestans* или *Pseudoperonospora cubensis*.

6. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанные инфекции вызваны бактериями.

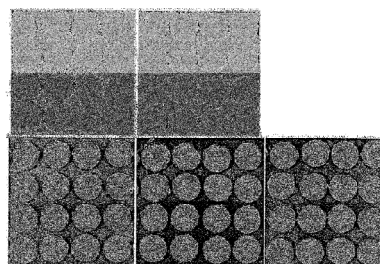
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанные бактерии представляют собой *Pseudomonas syringae* или *Clavibacter michiganensis*.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что концентрация бактериальной сериновой протеазы в указанном водном растворе составляет от 0,001 до 1%, предпочтительно от 0,01 до 0,1%.

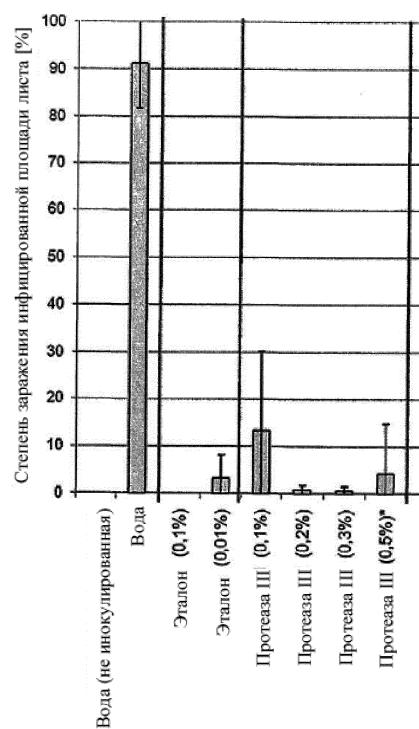
9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанный водный раствор бактериальной сериновой протеазы имеет значение pH от 4,0 до 8,0, предпочтительно от 4,5 до 7,5.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что указанный водный раствор бактериальной сериновой протеазы применяют при температурах от 4 до 34°C, предпочтительно от 20 до 32°C.

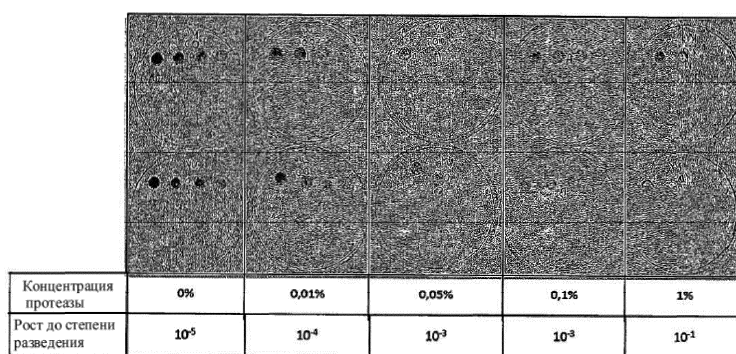
11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что указанный водный раствор бактериальной сериновой протеазы содержит средства, улучшающие адгезию, смачивающие средства, а также стабилизаторы, выбранные из группы модифицированных трисилоксанов, модифицированных фосфатидилхолинов, этоксилатов, природных жирных кислот, органических кислот, жирных спиртов и алканолов.



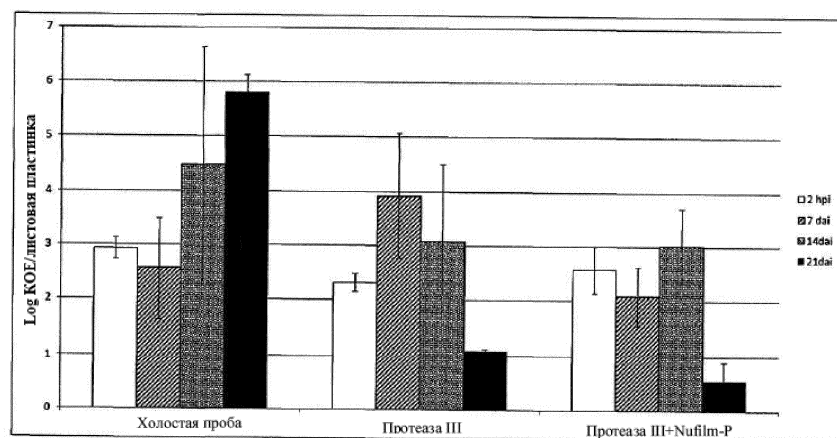
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2