

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092565** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.20

(51) Int. Cl. *A01N 27/00* (2006.01)
A01N 25/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.26

(54) СПОСОБ БОРЬБЫ С ФУЗАРИОЗОМ НА КАРТОФЕЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИЗШЕГО АЛКИЛНАФТАЛИНА

(31) **62/663,161**

(72) Изобретатель:
**Кэмпбелл Майкл А., Ваксмэн Эдди,
Форсит Джон М. (US)**

(32) **2018.04.26**

(33) **US**

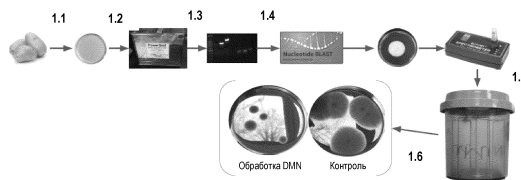
(86) **PCT/US2019/029462**

(87) **WO 2019/210245 2019.10.31**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:
**1,4ГРУП, ИНК.; КЭМПБЕЛЛ
МАЙКЛ А.; ВАКСМЭН ЭДДИ;
ФОРСИТ ДЖОН М. (US)**

(57) Способ борьбы с фузариозом на картофеле, где способ включает взаимодействие клубней картофеля с композицией, содержащей низший алкилнафталин. Борьбу с ростом фузариоза проводят путем обработки клубней картофеля композицией, содержащей низший алкилнафталин.



202092565

A1

A1

202092565

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565651EA/061

СПОСОБ БОРЬБЫ С ФУЗАРИОЗОМ НА КАРТОФЕЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НИЗШЕГО АЛКИЛНАФТАЛИНА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке U.S. № 62/663161, поданной 26 апреля 2018 г., которая во всей своей полноте включена в настоящее изобретение в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам борьбы с фузариозом на картофеле. Точнее, настоящее изобретение относится к способам борьбы с фузариозом на картофеле с использованием низших нафталинов, таких как 1,4-диметилнафталин (1,4-DMN).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Картофель является четвертым по производимому объему сельскохозяйственным продуктом в мире. Инфекция фузариоза на картофеле стала все больше распространяться во многих регионах выращивания картофеля и часто приводит к составляющей 30-50% потере урожая и ухудшенному качеству клубней. Фузариоз является одной из наиболее важных болезней картофеля, ограничивающих его урожайность в мире. Фузариоз (иногда называемый, как "фузариозный вилт") может быть вызван комплексными штаммами *Fusarium*, включая *F. eumartii*, *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. graminearum*, *F. sambucinum* и *F. oxysporum*.

Fusarium spp., например, в природе разрастается в большинстве почв земного шара, что делает его неизбежным обитателем поверхностного микробиома клубней картофеля. В результате воздействие фузариоза на мякоть может привести к вредной болезни сосудов и может привести к значительной потере урожая при хранении и обработке клубней. *Fusarium* spp. может выживать в полевой почве в течение лет, но в основном инокулят обычно находится на поверхности клубней. *Fusarium* spp. заражает картофель через раны в перидерме, нанесенные во время уборки урожая или последующем использовании. В хранящемся картофеле инфекция фузариоза быстрее всего развивается при высокой относительной влажности ($\geq 70\%$) и при 15°C-20°C, но продолжает развиваться при более низких температурах, безопасных для картофеля.

Высокая ценность культуры картофеля и значительные экономические потери, вызываемые фузариозом, привели к изучению разных способов борьбы с болезнью. Однако борьба с фузариозом затруднительна вследствие ограниченного набора

эффективных фунгицидов.

E. Gachango et al. описали исследование двух биорегулирующих фунгицидов (*Bacillus subtilis* и *Bacillus pumilus*) и трех обычных фунгицидов (фосфористая кислота, азоксистробин и пероксид водорода) на двух участках хранения в течение двух лет по эффективности подавления инфекции клубней, вызванной *Fusarium* spp. Биорегулирующие фунгициды обеспечивали ограниченную борьбу с патогенами при хранении по сравнению с обычными фунгицидами. Фосфористая кислота, пероксид водорода и азоксистробин были умеренно эффективны при борьбе с болезнью. Ни один из исследованных фунгицидов не приводил к полному подавлению болезни. Однако обычные фунгициды проявили более значительный потенциал при подавлении инфекции клубней при хранении, чем биорегулирующие фунгициды. См. Gachango E., et al., "Evaluation and comparison of biocontrol and conventional fungicides for control of postharvest potato tuber diseases", Biological Control, November 2012, 63(2), 115-120.

F. Ayed et al. сообщили о том, что обработка клубней картофеля двумя известными фунгицидами (флудиоксонил и хинолин) приводила к ограниченному эффекту при борьбе с развитием фузариозного вилта. См. Fakher Ayed et al., "Evaluation of fungicides for control of *Fusarium* wilt of potato", Plant Pathology Journal, 2006, 5(2), 239-243).

F. Ommati et al. сообщили о том, что *Trichoderma* spp. (антагонистические микроорганизмы с высокой активностью) приводили к определенной борьбе с *Fusarium* spp. См. Ommati F., Zaker M., Mohammadi A., "Biological control of *Fusarium* wilt of potato (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi*) by *Trichoderma* isolates under field condition and their effect on yield", J. Crop Protection, 2013, 2(4), 435-442.

В публикации U.S. № 2011/0047654 раскрыто применение фунгицидной композиции, содержащей натамицин и по меньшей мере одно содержащее фосфит соединение, для обработки картофеля для защиты от грибов, выбранных из группы, включающей *Mycosphaerella musicola*, *Mycosphaerella fijensis*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* или *Alternaria alternata*.

В патенте U.S. № 5552315 раскрыто применение конкретных штаммов грамотрицательных бактерий для подавления (т. е. уменьшения частоты или тяжести) вызванных грибами болезней картофеля при условиях хранения.

Фунгициды тиабендазол и 2-аминобутан использовали для борьбы с фузариозом путем нанесения на клубни картофеля при уборке урожая или перед высеваем. Однако высказана сильная озабоченность о потенциальном вредном воздействии этих химикатов на грунтовые и наземные водоемы и на здоровье персонала, работающего с сельскохозяйственными продуктами, и потребителей.

Поэтому все еще необходимы способы эффективной борьбы с фузариозом на картофеле.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 приведена схематичная диаграмма исследования 1,4-диметилнафталина (1,4-DMN) для борьбы с *F. oxysporum*, выделенного с поверхности клубней картофеля;

На фиг. 2 представлены праймеры, использованные для амплификации DNA грибов;

На фиг. 3 приведены последовательности NCBI BLASTn для продуктов PCR;

На фиг.4 представлено окрашивание грибов красителем Lactophenol Cotton Blue (1000×); и

На фиг. 5 приведен спектр NMR, подтверждающий, что средством обработки является 1,4-DMN.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам борьбы с инфекциями фузариоза на картофеле, где способы включают взаимодействие клубней картофеля с композицией, содержащей низший алкилнафталин. Клубни картофеля, обработанные такой композицией, менее восприимчивы к инфекции фузариоза, чем необработанные клубни картофеля. Другие варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам борьбы с ростом *Fusarium oxysporum* на клубнях картофеля, где способы включают взаимодействие клубней картофеля с композицией, содержащей низший алкилнафталин. Клубни картофеля можно ввести во взаимодействие с композицией, содержащей низший алкилнафталин, до или во время хранения, во время транспортировки клубней картофеля или до высевания. Композиция, содержащая низший алкилнафталин может находиться в форме жидкой композиции.

Термин "низший алкилнафталин" при использовании в настоящем изобретении включает нафталин, содержащий по меньшей мере один C2–C12 алкильный заместитель.

Термин "алкил" при использовании в настоящем изобретении включает линейную алкильную группу, разветвленную алкильную группу или циклическую алкильную группу.

Неограничивающими примерами низших алкилнафталинов, пригодных для настоящего изобретения, являются: диметилнафталин (DMN), такой как 1,2-диметилнафталин (1,2-DMN), 1,4-диметилнафталин (1,4-DMN), 1,6-диметилнафталин (1,6-DMN) и диизопропилнафталин (DIPN); или триметилнафталин. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция может содержать смесь разных низших алкилнафталинов. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления низшим

алкилнафталином является диметилнафталин. В других вариантах осуществления низшим алкилнафталином является 1,4-диметилнафталин (1,4-DMN), который является соединением, естественно содержащемся в тканях картофеля, находящегося в покое.

Известно, что диметилнафталин (DMN) пригоден для применения, как стимулятор перехода в состояние покоя/ингибитор роста побегов картофеля при хранении или транспортировке. DMN также помогает картофелю быть тугорным (гидратированным). См. патент U.S. № 6010728.

В некоторых вариантах осуществления композицию, содержащую DMN (такой как 1,4-DMN), можно легко нанести в отделениях хранения картофеля в виде аэрозоля, который образует пары и адсорбируется хранящимся картофелем.

В некоторых вариантах осуществления жидкую композицию, содержащую DMN (такой как 1,4-DMN) можно разбрызгать на свежерыкопанный картофель в поле сразу после выкапывания, во время транспортировки с поля, при направлении в хранилище или сразу после помещения на хранение. В хранилище картофель также можно обработать парами или туманом DMN (такого как 1,4-DMN) в дополнение к начальной обработке или вместо предыдущей обработки.

При желании жидкая композиция может дополнительно содержать по меньшей мере один из следующих химикатов: вспомогательные вещества, растворители/разбавители, поверхностно-активные вещества, смазывающие вещества, одоранты, дезодоранты, фунгициды, биоциды или пестициды.

Разбавители в зависимости от их типа и/или запаха можно использовать в разных количествах. Неограничивающие примеры подходящих разбавителей могут включать: C₂–C₁₂ спирты (например, метанол, этанол, изопропиловый спирт, гексанол, октанол, нонанол, деканол и додеканол и т. п.); низшие алкиловые эфиры C₆-C₁₀ алифатических спиртов (например, метиловые, этиловые или пропиловые эфиры 1-нонанола или 1-гексанола); алифатические альдегиды; или алифатические кетоны. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция вместе с диметилнафталином (DMN) содержит растворитель/разбавитель, причем отношение количества растворителя/разбавителя к количеству DMN составляет от примерно 2:1 до примерно 50:1.

Жидкую композицию, содержащую низший алкилнафталин, можно использовать для клубней картофеля по разным методикам, включая, но не ограничиваясь только ими, следующие: погружение клубней картофеля ванну с жидкой композицией; опрыскивание жидкой композицией клубней картофеля; или нанесение жидкой композиции в виде тумана на клубни картофеля.

В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция является водной

композицией. Низший алкилнафталин (например, DMN) не смешивается с водой; однако энергичное перемешивание может поддерживать в основном однородную суспензию низшего алкилнафталина в воде. Перемешивание можно проводить в баке, таком как камера перемешивания спрея или аэрозольный генератор. В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, если низший алкилнафталин составляет не менее 5%, хотя предпочтительно 10% от объема от жидкой композиции.

Обработка клубней картофеля композицией, содержащей DMN (такой как 1,4-DMN), сильно влияет на микробиом на поверхности картофеля, в особенности на разнообразие штаммов. Из этой популяции микробиома *Fusarium oxysporum*, конкретный штамм патогенных грибов, вызывает болезнь - фузариозный вилт.

F. oxysporum выделяли с поверхности клубней картофеля с использованием селективных для *Fusarium* агаровых сред Nash-Snyder, в которые культуры переносили и держали в планшетах с питательным комплексом из картофельного агара с декстрозой. Секвенирование DNA с использованием селективных праймеров NL1, NL2, ITS1F и ITS2R подтвердило, что грибы представляют собой *F. oxysporum*.

Методику выделения одной споры использовали для определения количества и реакции роста спор, обработанных с помощью 1,4-DMN при сопоставлении со спорами, обработанными водой (т. е. контрольными). Планшеты с изолятами отдельных спор держали в герметичных вакуумных камерах и инкубировали при постоянной температуре, равной примерно 22°C, с обработкой посредством 7,5 мкл 1,4-DMN в виде аэрозольной дисперсии в течение 4 дней. После дня выдерживания споры в каждом планшете измеряли и подсчитывали. Как показано на фиг. 1 и в таблице 1, споры *F. oxysporum*, обработанные с помощью 1,4-DMN, характеризовались меньшей скоростью роста диаметра мицелия, чем необработанные споры *F. oxysporum* (т. е. контрольные).

Таким образом, DMN (такой как 1,4-DMN) можно использовать для борьбы (например, уменьшения частоты и степени) с ростом *F. oxysporum*, который является типичным штаммом *Fusarium*, вызывающим болезнь фузариоз на картофеле.

Методики

На фиг. 1 приведена схематичная диаграмма исследования 1,4-DMN для борьбы *F. oxysporum*, выделенного с поверхности клубней картофеля.

Соскобы кожуры картофеля выращивали в селективных для *Fusarium* агаровых средах Nash-Snyder и затем переносили в питательный комплекс из картофельного агара с декстрозой (PDA) и держали в нем (стадия 1.1 на фиг. 1). Выделение DNA проводили для изолятов одиночных спор с использованием набора для выделения Power Soil DNA (стадия 1.2 на фиг. 1). Несколько праймеров, приведенных на фиг. 2, исследовали для

амплификации DNA грибов. Селективные праймеры для *Fusarium* NL1, NL2, ITS1F и ITS2 обеспечили амплификацию PCR штаммов грибов, геномно аналогичных *Fusarium*. DNA из образцов обладала интенсивными полосами продукта PCR при электрофорезе (стадия 1.3 на фиг. 1). DNA секвенировали и данные секвенирования анализировали путем выстраивания последовательностей с помощью NCBI BLASTn (стадия 1.4 на фиг. 1). На фиг. 3 приведены последовательности NCBI BLASTn для продуктов PCR. Грибы окрашивали красителем Lactophenol Cotton Blue (1000×), как показано на фиг. 4. Затем штамм, идентифицированный, как *F. oxysporum*, обрабатывали посредством DMN (7,5 мкл) в специализированных герметичных камерах и инкубировали при постоянной температуре, равной примерно 25°C, в течение 4 дней (стадия 1.5 на фиг. 1). На фиг. 5 приведен спектр NMR, подтверждающий, что средством обработки являлся 1,4-DMN. Затем определяли количество колоний и диаметр мицелия (стадия 1.6 на фиг. 1).

В таблице 1 сопоставлены средние диаметры мицелия и полные количества колоний для контрольных и обработанных и помощью 1,4-DMN DMN образцов

Образец	Средний диаметр мицелия колоний	Среднее количество колоний в планшете	Всего колоний
Контрольный образец	9,89 см	4,05	162
Обработанный с помощью 1,4-DMN образец	2,94	4,125	165

Таким образом, *F. oxysporum*, успешно выделенный с поверхности клубней, характеризуется подавлением роста мицелия после обработки с помощью 1,4-DMN в течение 4 дней.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ борьбы с фузариозом на картофеле, где способ включает взаимодействие клубней картофеля с композицией, содержащей низший алкилнафталин.
2. Способ по п. 1, где низший алкилнафталин включает диметилнафталин, триметилнафталин или их комбинацию.
3. Способ по п. 1, где диметилнафталин включает 1,2-диметилнафталины (1,2-DMN), 1,4-диметилнафталин (1,4-DMN), 1,6-диметилнафталин (1,6-DMN), диизопропилнафталин (DIPN) или их смесь.
4. Способ по п. 1, где низший алкилнафталин включает 1,4-диметилнафталин.
5. Способ по п. 1, где композиция, содержащая низший алкилнафталин, является жидкой композицией.
6. Способ по п. 5, где жидкая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один из следующих химикатов: вспомогательные вещества, разбавители, растворители, поверхностно-активные вещества, смазывающие вещества, ароматические вещества, дезодоранты, фунгициды, биоциды или пестициды.
7. Способ по п. 6, где разбавитель содержит по меньшей мере один из следующих: C₂–C₁₂ спирты, алкиловые эфиры C₆–C₁₀ алифатических спиртов, алифатические альдегиды или алифатические кетоны.
8. Способ по п. 6, где отношение количества разбавителя к количеству низшего алкилнафталина составляет от примерно 2:1 до примерно 50:1.
9. Способ по п. 5, где жидкая композиция является композицией на водной основе.
10. Способ по п. 5, где количество низшего алкилнафталина в жидкой композиции составляет не менее 5 об.% от жидкой композиции.
11. Способ по п. 1, где фузариоз вызван штаммами *Fusarium*, содержащими *Fusarium oxysporum*.
12. Способ по п. 1, где клубни картофеля вводят во взаимодействие с композицией, содержащей низший алкилнафталин, до или во время хранения, во время транспортировки клубней картофеля или до высева.
13. Способ борьбы с ростом *Fusarium oxysporum* на клубнях картофеля, способ включает взаимодействие клубней картофеля с композицией, содержащей низший алкилнафталин.
14. Способ по п. 13, где низший алкилнафталин включает диметилнафталин, триметилнафталин или их комбинацию.
15. Способ по п. 13, где диметилнафталин включает 1,2-диметилнафталины (1,2-DMN), 1,4-диметилнафталин (1,4-DMN), 1,6-диметилнафталин (1,6-DMN),

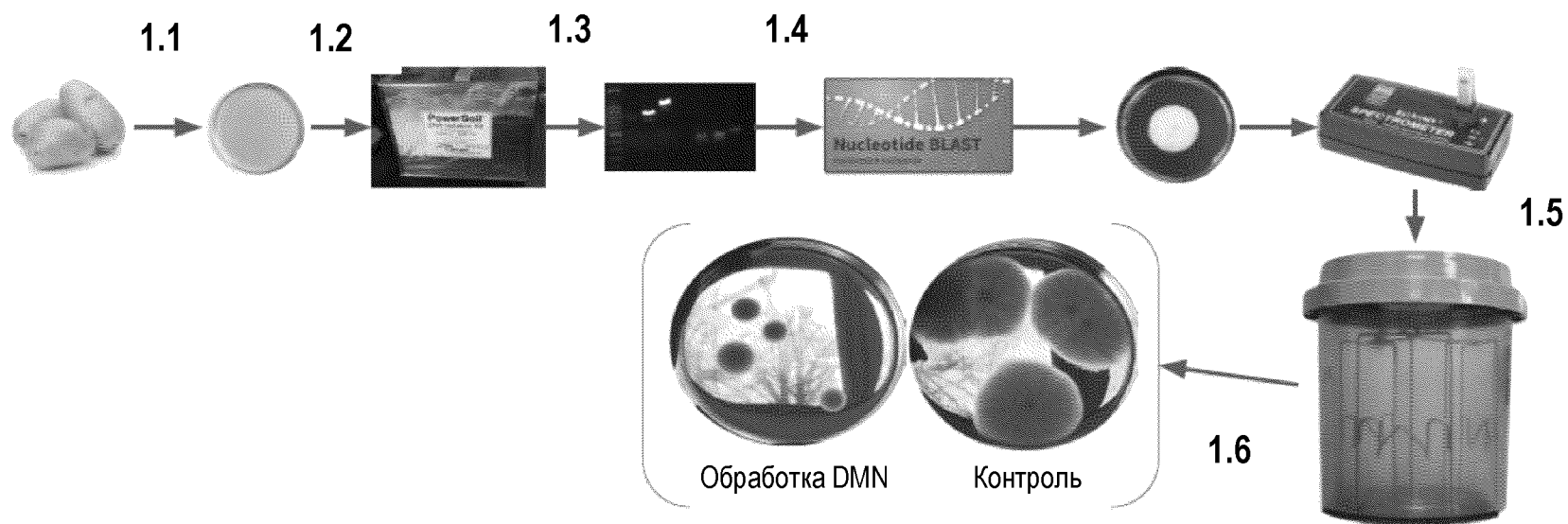
диизопропилнафталин (DIPN) или их смесь.

16. Способ по п. 13, где низший алкилнафталин включает 1,4-диметилнафталин.

17. Способ по п. 13, где клубни картофеля вводят во взаимодействие с композицией, содержащей низший алкилнафталин, до или во время хранения, во время транспортировки клубней картофеля или до высева.

По доверенности

ФИГ.1



1/5

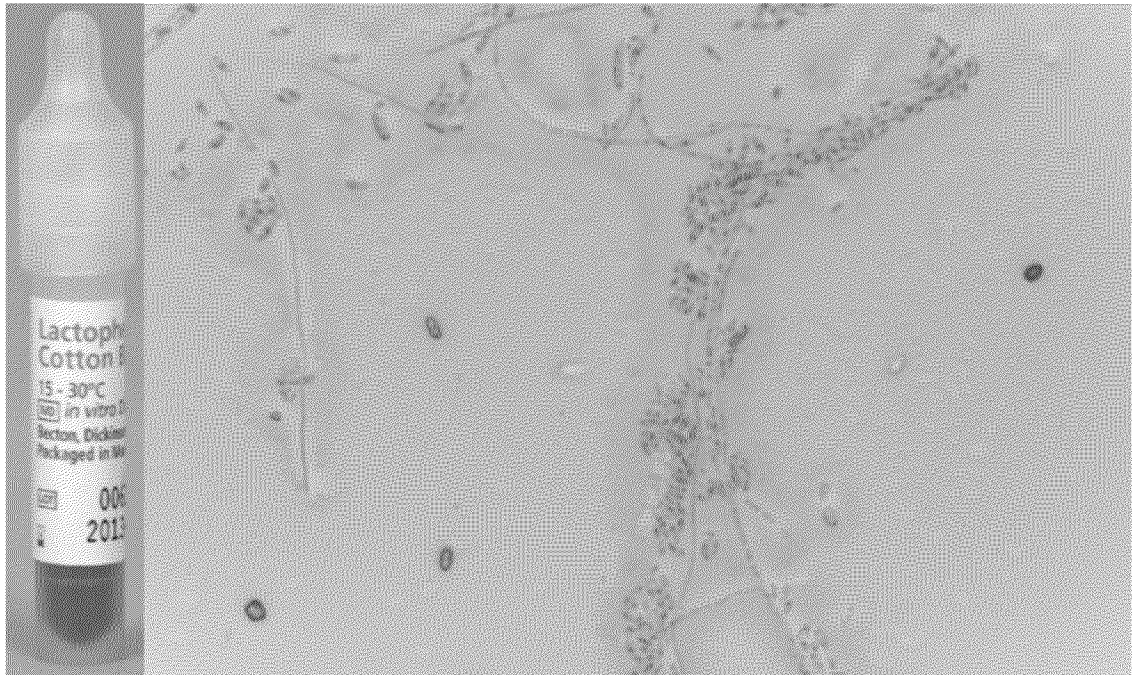
ФИГ.2

Ген	Праймер	Последовательность	Литература
RPB1	VH6Fa	CAYAARGARTCYATGATGGGWC	Hofstetter et al. 2007
	G2R	GTCATYTGDTGCDGGYTCDC	Hall, unpubl.
RPB2	5f2	GGGGWGAYCAGGAAGAAGGC	Reeb et al. 2004
	7cr	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	Liu et al. 1999
	7cf	ATGGGYAARCAAGCYATGGG	Liu et al. 2000
	11ar	GCRTGGATCTTRTCRTCSACC	Liu et al. 2001
TEF1-alpha	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	Campbell Personal Communication
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	Campbell Personal Communication
ITS	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGA	Campbell Personal Communication
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Campbell Personal Communication
	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	
	ITS2R	GCGTTCTTCATCGATGC	

ФИГ.3

Праймер	Штамм	Значение E
ITS	<i>Fusarium Oxysporum</i>	2×10^8
NL	<i>Fusarium Oxysporum Sp. lycopersici</i>	0.00

ФИГ.4



ФИГ.5

DMN – тестовый фрагмент, полученный при использовании 1 мл CDCI3 в качестве экстрагента в течение 30 сек.
Испытание 2

