

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246937 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **436671**

(22) Data zgłoszenia: **2021.01.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.07.18 BUP 29/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.04.07 WUP 14/2025**

(51) MKP:

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 19/04 (2006.01)

A01N 43/16 (2006.01)

A01G 7/06 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

A01P 7/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**INTERMAG SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Oikusz, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

HUBERT KARDASZ, Oikusz, PL

KRZYSZTOF AMBROZIAK, Kraków, PL

KLAUDIA GAŚKA, Bębło, PL

ROKSANA RAKOCZY-LELEK, Wołowice, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Dorota Rzążewska, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

**Sposób wytwarzania preparatu na bazie oligogalakturonidów i jego zastosowanie
w rolnictwie**

PL 246937 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania preparatu na bazie oligogalakturonidów (OGA) i jego zastosowanie w rolnictwie.

Oligogalakturonidy są pochodnymi pektyn o niskiej masie cząsteczkowej, które wytwarzane są zwykle poprzez depolimeryzację naturalnych pektyn o wysokiej masie cząsteczkowej.

Najbardziej znaną metodą otrzymywania tego typu związków jest metoda enzymatycznej hydrolizy pektyn za pomocą pektynaz. Istnieje również m.in. metoda alkalicznej depolimeryzacji pektyn, metoda hydrolizy w wysokiej temperaturze i metody depolimeryzacji poliuronidów przy użyciu środka utleniającego.

W zależności od stopnia polimeryzacji, tj. od 6 do 25–30 reszt monosacharydowych, oligogalakturonidy posiadają różne właściwości i zastosowania. Na przykład ustalono, że oligogalakturonidy o stopniach polimeryzacji DP od 6 do 9 zdolne są do tworzenia silnych kompleksów z jonami metali ciężkich, takich jak ołów, rtęć, kadm i inne. Oligogalakturonidy o większym stopniu polimeryzacji stymulują powstawanie kwiatów oraz wydłużanie merystemów wierzchołkowych korzeni i pędów.

Z patentu europejskiego nr **EP1373543 B1** znany jest sposób wytwarzania produktów hydrolizy pektyny obejmujący traktowanie pektyny lub materiału roślinnego zawierającego pektynę w wodnym roztworze lub zawiesinie, enzymem hydrolizującym pektynę A w pierwszym etapie i enzymem hydrolizującym pektynę B w drugim etapie sposobu oraz zastosowanie produktów w doustnych preparatach farmaceutycznych. Wytworzone sposobem według wynalazku produkty hydrolizy pektyny mają frakcję galakturonidów, które zawierają co najmniej jedną 4,5-nienasyconą cząsteczkę kwasu galakturonowego i które są estryfikowane metanolem z wydajnością $\geq 20\%$. Opcjonalnie w sposobie według ujawnienia ciekłe produkty hydrolizy otrzymane z drugiego etapu sposobu traktuje się enzymem C w trzecim etapie sposobu, w którym enzymem C jest pektynoesteraza.

Z patentu hiszpańskiego nr **ES2537936 B1** znany jest sposób wytwarzania zmodyfikowanych pektyn cytrusowych charakteryzujący się tym, że surowiec pochodzący z produktów ubocznych przemysłu cytrusowego jest uwodniony i poddawany obróbce enzymatycznej celulazą i pektynoesterazą w łagodnych warunkach. Zgodnie w wynalazkiem sposób obejmuje wytwarzanie zmodyfikowanej pektyny cytrusowej i ekstraktu alkoholowego. Polega on na tym, że do produktów ubocznych po produkcji soków cytrusowych, tj. skórki lub pulpy dodaje się wodę i 5–10% cytrynianu sodu, w celu zwiększenia pH. Następnie przeprowadzana jest obróbka enzymatyczna roztworem celulazy, utrzymując produkt w trakcie mieszania w temperaturze 40–50°C przez 30 minut. Sposób obróbki enzymatycznej analogicznie powtarza się przy zastosowaniu pektynoesterazy w takich samych warunkach reakcji. Po zakończeniu tego etapu przeprowadza się dezaktywację enzymatyczną poprzez obróbkę cieplną w temperaturze około 90°C przez 1–5 minut, następnie roztwór jest ochładzany do temperatury 25–30°C i ekstrahowany metanolem w temperaturze pokojowej. Sposobem według wynalazku uzyskuje się pektynę o masie cząsteczkowej 10–20 kDa i stopniu polimeryzacji 30–70 jednostek.

Z patentu amerykańskiego nr **US9113650 B1** znany jest sposób wytwarzania zhydrolizowanej pektyny PET, obejmujący:

- a) poddanie roztworu pektyny cytrusowej hydrolizie enzymatycznej przy zastosowaniu mieszanego roztworu pektynazy w warunkach kwaśnych przy pH=4 i w temperaturze od 45°C do 65°C przez 1 godzinę do 72 godzin, w celu wytworzenia hydrolizatu pektyny, w którym roztwór pektyny cytrusowej ma stężenie pektyny od 1 do 3% objętości a mieszany roztwór pektynazy zawiera esterazę metylową pektyny, poligalakturonazę i liazę pektynową, a stosunek objętościowy zmieszanego roztworu pektynazy do roztworu pektyny cytrusowej wynosi 1000:1, a następnie
- b) podanie hydrolizatu pektyny obróbce termicznej w temperaturze 100°C przez 10 minut, w celu zakończenia enzymatycznej hydrolizy.

Uzyskana pektyna jest całkowicie zhydrolizowana i ma uśrednioną masę cząsteczkową mniejszą lub równą 1 kDa.

Z patentu rosyjskiego nr **RU2478649 C1** znany jest sposób wytwarzania pektyny o niskiej masie cząsteczkowej, obejmujący hydrolizę pektyny w wodnym roztworze kwasu mineralnego przez ogrzewanie w celu oddzielenia fazy ciekłej od nierozpuszczalnej pozostałości pektyny, izolowanie docelowych produktów hydrolizy poprzez wytrącenie rozpuszczalnikiem organicznym mieszalnym z wodą. Materiałem zasilającym hydrolizę jest pektyna o niskim stopniu estryfikacji, natomiast hydrolizę prowadzi w spo-

sób ciągły w aparacie odpływowym utrzymując temperaturę na poziomie 70–100°C. Szybkość podawania kwasu mineralnego do komory oblicza się według określonego wzoru. Przygotowaną fazę ciekłą po procesie hydrolizy poddaje się dodatkowej obróbce cieplnej w przepływowym wymienniku ciepła. Fazę ciekłą przed wytrąceniem pektyny zobojętnia się do pH co najmniej 4.

Z patentu europejskiego nr **EP/PL2115066T3** znana jest "bioaktywna" kompozycja, która zawiera jeden lub więcej oligogalakturonianów ((1→4)- α -D-galakturonian) lub dowolne inne oligosacharydy (oligoguluroniany), które mogą wykazywać konformację "pojemnika na jajko" oraz jest stabilizowana przez jeden lub więcej polikationowych sacharydów, korzystnie albo oligosacharyd chitozanowy, albo polisacharyd chitozanowy. Zgodnie z ujawnieniem kompozycja zwiększa synergistycznie aktywność biologiczną każdego oligosacharydu i łączy ich indywidualne działanie wzmacniające w różnych dziedzinach. Na przykład może być kompozycją elicytora, która jest stosowana do ochrony roślin (zwiększenia naturalnej obrony roślin przed patogenami) i do stymulowania wzrostu i różnicowania roślin. Kompozycja według wynalazku może też być kompozycją nawożącą, stosowaną do zwiększania, na przykład wydajności roślin, poprzez zwiększoną wysokość, grubość (łodygi, liści, korzeni), biomasę lub liczbę kwiatów/owoców przypadającą na roślinę. W zastosowaniach środowiskowych ujawniona w wynalazku kompozycja może być stosowana jako środek chelatujący (chelatuje metal ciężki) lub do uzdatniania ścieków, zwłaszcza w technikach oczyszczania wody, do segregacji związków organicznych i metali ciężkich. Można ją również stosować do wytrącania niektórych związków odpadowych lub innych substancji zanieczyszczających, takich jak DDT i polichlorobenzenu lub do utrwalania rodników. Ponadto kompozycja według wynalazku może być również łatwo stosowana w układach rolniczych i agrochemicznych, jako powłoka konserwująca i środek biostatyczny po naniesieniu na owoce, warzywa i uprawy, jako nawóz, jako środek zwiększający liczbę użytecznych mikroorganizmów glebowych i zmniejszający liczbę szkodliwych ("kontrola biologiczna") lub do stymulowania syntezy środków ochronnych przez samą roślinę, w celu przyspieszenia kiełkowania i wzrostu roślin. Kompozycję stosuje się jako promotor wzrostu roślin, środek powlekający nasiona czy adiuwant przeciwgrzybiczy.

Zmieniający się klimat, gwałtowne zmiany warunków atmosferycznych, występujące okresy suszy na przemian z wysokimi opadami deszczu i związana z tym wysoka presja chorób i szkodników to istotne problemy dzisiejszego rolnictwa. Dodatkowo zanieczyszczenie środowiska naturalnego oraz problem pozostałości pestycydów w żywności pochodzenia roślinnego skłaniają do poszukiwań nowych rozwiązań w zakresie ochrony i stymulacji roślin zarówno pod względem przystosowania rośliny do zmiennych warunków atmosferycznych oraz zwiększenia jej naturalnej odporności na atak szkodników i patogenów wywołujących choroby. Wzrost świadomości społecznej dotyczącej zdrowego odżywiania zmusza producentów do poszukiwania i wprowadzania do praktyki rolniczej bezpiecznych i biodegradowalnych środków ochrony roślin.

W stanie techniki nie ujawniono preparatów biostymulujących pochodzenia naturalnego, które łączyłyby poprawę możliwości obronnych roślin przed atakiem patogenów i szkodników oraz równoczesne działanie bezpośrednio na szkodniki.

Twórcy wynalazku w toku prac badawczo-rozwojowych otrzymali preparat, który posiada takie właściwości.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania preparatu na bazie oligogalakturonidów (OGA) o stopniu polimeryzacji DP od 2 do 10 metodą enzymatyczną, charakteryzujący się tym, że do reaktora wyposażonego w mieszadło i system grzejny wprowadza się wodę, roztwór 40% wersenianu 4-sodowego oraz wodorotlenek sodu do uzyskania pH 12.0 mieszaniny reakcyjnej, następnie do reaktora wprowadza się pektynę owocową wybraną spośród pektyny cytrusowej lub jabłkowej, i miesza się zawartość reaktora do czasu całkowitego rozpuszczenia się pektyny, po czym dodaje się 10% roztwór kwasu cytrynowego do uzyskania pH 5.0, następnie do reaktora wprowadza się 0.1% roztwór enzymu pektynolitycznego wybrany spośród poligalakturonazy lub pektynazy, po czym zawartość mieszaniny reakcyjnej ogrzewa się do osiągnięcia temperatury 80°C, którą utrzymuje się jeszcze przez kolejne 30 minut do czasu dezaktywacji enzymu, następnie mieszaninę reakcyjną chłodzi się do temperatury poniżej 40°C i dodaje się roztwór sorbinianu potasu (1–5 kg proszku rozpuszczonego w niewielkiej ilości wody) i miesza się przez kolejne 30 minut, gotowy produkt w postaci płynnej zlewa się do pojemników lub suszy rozpyłowo albo liofilizuje w celu otrzymania produktu w postaci stałej.

Stosowane w dalszej części opisu określenie „preparat OGA” oznacza preparat wytworzony sposobem według wynalazku.

Zgodnie ze sposobem według wynalazku do wytwarzania preparatu OGA stosuje się surowce głównie pochodzenia roślinnego, dlatego też preparat OGA jest bezpieczny dla środowiska podczas jego stosowania.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie wytworzonego sposobem według wynalazku preparatu OGA o stopniu polimeryzacji DP od 2 do 10 w rolnictwie lub sadownictwie lub uprawie warzyw jako preparatu o działaniu biostymulującym rośliny i/lub działaniu kontaktowym na szkodniki oraz do stymulacji procesów obronnych roślin i wzmocnienia odporności roślin na atak patogenów i szkodników, zwłaszcza w uprawach warzyw, roślin sadowniczych i zbóż lub do ograniczenia porażenia przez szkodniki,

przy czym patogen wybrany jest spośród *Golovinomyces orontii*, *Oidium lycopersici*, *Erysiphe betae*, *Erysiphe heraclei*, *Blumeria graminis* *Pseudoperonospora cubensis*, *Alternaria spp*, *Puccinia recondita*, *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia crealis*, a szkodnik wybrany jest spośród przędziorka, wciornastka, mszyc, mączlika, tanńsi krzyżowiaczek i połyśnicy marchwianka.

Jak wykazano w przykładach wykonania preparat OGA według wynalazku wykazuje działanie biostymulujące i poprawia kondycję roślin zwiększając ich tolerancję na zmieniające się warunki atmosferyczne. Co więcej, preparat OGA według wynalazku wykazuje działanie stymulujące odporność nabytą rośliny po przez aktywację szlaków sygnałowych oraz genów odpowiedzialnych za reakcje obronne rośliny, co pozwala na ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin, zwłaszcza w uprawach gatunków ogrodnich i rolniczych, gdzie atakujące rośliny patogeny albo szkodniki mogą powodować zniszczenie całej uprawy. Dlatego też preparat OGA według wynalazku korzystnie stosuje się w rolnictwie lub sadownictwie lub uprawie warzyw.

Preparat OGA według wynalazku może być uznany za naturalną szczepionkę, która wspomaga procesy odpornościowe roślin. Dodatkowo preparat ten wpływa na zwiększenie zawartości m.in. cukru oraz polifenoli w roślinie, zatem zgodnie z wynalazkiem stosowanie preparatu OGA może poprawiać właściwości prozdrowotne uprawianych roślin, zwłaszcza owoców i warzyw, szczególnie tych uznawanych za „superfoods”.

Jak wykazano w przykładach wykonania, po aplikacji preparatu OGA według wynalazku zwiększył się plon użytkowy roślin uprawnych oraz jakość plonu, zatem stosowanie tego preparatu jest wskazane w produkcji ekologicznej, zdrowej i bezpiecznej żywności. Zgodnie z wynalazkiem preparat OGA korzystnie stosuje się do wzmocnienia odporności roślin na patogeny i szkodniki lub ograniczenia chorób grzybowych roślin, zwłaszcza w uprawach warzyw i zbóż.

Jak wykazano w przykładach wykonania preparat OGA według wynalazku działanie ambiwalentne na rośliny, gdyż z jednej strony stymuluje systemiczną odporność nabytą rośliny poprawiając jej możliwości obronne na atak patogenów i szkodników, a jednocześnie w sytuacji ataku szkodników, wykazuje działanie kontaktowe, ograniczając liczbę żerujących szkodników na porażonej roślinie. Jest to unikalna właściwość preparatu OGA według wynalazku, która nie jest znana wśród innych dostępnych w stanie techniki preparatów naturalnych tego typu. W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że skuteczność preparatu OGA według wynalazku jest w pewnych zastosowaniach porównywalna do preparatów chemicznych. Zatem rozwiązanie według wynalazku jest zgodne z programem ochrony w Integrowanej Produkcji Rolniczej oraz z zasadami Rolnictwa Ekologicznego i może stanowić alternatywę dla stosowanych w uprawach preparatów chemicznych lub też pozwala na ograniczenie ilości stosowanych preparatów chemicznych, co może się przyczynić do zmniejszenia negatywnych dla człowieka i środowiska skutków stosowania chemicznych środków ochrony roślin, zwłaszcza tych stosowanych powszechnie i na dużą skalę w produkcji rolnej.

Dlatego, zgodnie z wynalazkiem może być on zastosowany jako preparat zwiększający odporność na atak patogenów tj. mączniaki, alternaria, rdza brunatna, septorioza paskowana liści, fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni i ostra plamistość oczkowa, a także do zwalczania szkodników w uprawach gatunków roślin użytkowych tj. przędziorki, wciornastki, mszyce, a także mączlik, tanńsi krzyżowiaczek i połyśnica marchwianka. Wykazano szczególnie korzystne działanie wobec mączniaka prawdziwego obejmującej gatunki m.in. *Golovinomyces orontii*, *Oidium lycopersici*, *Erysiphe betae*, *Erysiphe heraclei*, które najczęściej atakują uprawy warzywne.

Wynalazek przedstawiono w przykładach wykonania, które nie ograniczają jego zakresu.

Przykład 1 otrzymywanie preparatu OGA

Do reaktora wyposażonego w mieszadło i system grzejny wprowadza się 900 dm³ wody, następnie włącza się mieszadło i wprowadza roztwór 40% wersenianu 4-sodowego w ilości 2,5 dm³ oraz wodorotlenek sodu w ilości odpowiednio 2–5 kg, tak aby po rozpuszczeniu surowców uzyskać docelową wartość pH mieszaniny wynoszącą 12,0.

Następnie wprowadza się odpowiednio 10 kg pektyny jabłkowej (Pektyna, Centrochem) i miesza się do całkowitego rozpuszczenia, po czym wprowadza się do reaktora odpowiednio 20–25 kg 10% roztworu kwasu cytrynowego do uzyskania pH 5.0. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 2 dm³ 0.1% roztworu enzymu pektynolitycznego- pektynazy (Rohapect®, AB Enzymes) i całość ogrzewa się do osiągnięcia temperatury 80°C, którą utrzymuje się przez kolejne 30 minut. Następnie wyłącza się ogrzewanie i mieszaninę reakcyjną pozostawia się do schłodzenia do temperatury roztworu poniżej 40°C, po czym dodaje się 1 kg sorbinianu potasu, w formie roztworu (rozpuszcza się uprzednio w niewielkiej ilości wody potrzebnej do całkowitego rozpuszczenia proszku) i miesza się przez kolejne 30 minut. Po zakończeniu procesu reaktor uzupełnia się wodą do 1000 dm³.

Po zakończeniu mieszania gotowy produkt w postaci płynnej można rozlać do pojemników lub poddawać dalszej obróbce (suszenie rozpyłowe, liofilizacja) celem otrzymania postaci stałej.

Przeprowadzono badanie stopnia polimeryzacji preparatu OGA wg procedury opisanej w przykładzie 6, badania wykazały polimeryzację pektyn na poziome DP wynoszącym 9 ± 1 .

Przykład 2 otrzymywanie preparatu OGA

Do reaktora wyposażonego w mieszadło i system grzejny wprowadza się 900 dm³ wody, następnie włącza się mieszadło i wprowadza roztwór 40% wersenianu 4-sodowego w ilości 2,5 dm³ oraz wodorotlenek sodu w ilości odpowiednio 2–5 kg. Po rozpuszczeniu surowców zmierzono pH, wartość docelowa po dodaniu wodorotlenku sodu pH powinna wynosić 12.0 w mieszaninie reakcyjnej.

Następnie wprowadza się 10 kg pektyny cytrusowej (Pectin Classic CU 201, Herbstreith) i miesza się do całkowitego rozpuszczenia, po czym wprowadza się do reaktora 20–25 kg 10% roztworu kwasu cytrynowego do uzyskania pH 5.0. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 6 dm³ 0.1% roztworu enzymu pektynolitycznego – poligalakturonazy (Pectinex SP-L, Novozymes) i całość ogrzewa się do osiągnięcia temperatury 80°C, którą utrzymuje się przez kolejne 30 minut. Następnie wyłącza się ogrzewanie i mieszaninę reakcyjną pozostawia się do schłodzenia do temperatury roztworu poniżej 40°C, po czym dodaje się 2.5 kg sorbinianu potasu, w formie roztworu (proszek rozpuszcza się uprzednio w niewielkiej ilości wody potrzebnej do całkowitego rozpuszczenia proszku) i miesza się przez kolejne 30 minut. Po zakończeniu procesu reaktor uzupełnia się wodą do 1000 dm³.

Po zakończeniu mieszania gotowy produkt w postaci płynnej można rozlać do pojemników lub poddawać dalszej obróbce (suszenie rozpyłowe, liofilizacja) celem otrzymania postaci stałej.

Przeprowadzono badanie stopnia polimeryzacji preparatu OGA wg procedury opisanej w przykładzie 6, badania wykazały polimeryzację pektyn na poziome DP wynoszącym 6 ± 1 .

Przykład 3 otrzymywanie preparatu OGA

Do reaktora wyposażonego w mieszadło i system grzejny wprowadza się 900 dm³ wody, następnie włącza się mieszadło i wprowadza roztwór 40% wersenianu 4-sodowego w ilości 2,5 dm³ oraz wodorotlenek sodu w ilości odpowiednio 2–5 kg, tak aby po rozpuszczeniu surowców uzyskać docelową wartość pH mieszaniny wynoszącą 12,0.

Następnie wprowadza się 10 kg pektyny cytrusowej (Pectin Classic CU 201, Herbstreith) i miesza się do całkowitego rozpuszczenia, po czym wprowadza się do reaktora 20–25 kg 10% roztworu kwasu cytrynowego do uzyskania pH 5.0. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 10 dm³ 0.1% roztworu enzymu pektynolitycznego-poligalakturonazy (Pectinex SP-L, Novozymes) lub i całość ogrzewa się do osiągnięcia temperatury 80°C, którą utrzymuje się przez kolejne 30 minut. Następnie wyłącza się ogrzewanie i mieszaninę reakcyjną pozostawia się do schłodzenia do temperatury roztworu poniżej 40°C, po czym dodaje się 5 kg sorbinianu potasu, w formie roztworu (proszek rozpuszcza się uprzednio w niewielkiej ilości wody potrzebnej do całkowitego rozpuszczenia proszku) i miesza się przez kolejne 30 minut. Po zakończeniu procesu reaktor uzupełnia się wodą do 1000 dm³.

Po zakończeniu mieszania gotowy produkt w postaci płynnej można rozlać do pojemników lub poddawać dalszej obróbce (suszenie rozpyłowe, liofilizacja) celem otrzymania postaci stałej.

Przeprowadzono badanie stopnia polimeryzacji preparatu OGA wg procedury opisanej w przykładzie 6, badania wykazały polimeryzację pektyn na poziome DP wynoszącym 3 ± 1 .

Przykład 4 otrzymywanie preparatu OGA w formie stałej

Roztwór otrzymany według przykładów 1 – można wysuszyć rozpyłowo uzyskując produkt w formie stałej zawierający OGA w ilości do 10% (m/m).

Stosuje się znane zjawy dziedziny techniki suszenia rozpyłowego przy zadanych warunkach, gdzie:

- temperatura zasilania powietrzem na wejściu wynosi 180–220°C,
- temperatura zasilania powietrzem na wyjściu wynosi 80–100°C,
- łożo wewnętrzne osiąga temperaturę na wejściu 75–90°C,
- łożo zewnętrzne na wejściu osiąga temperaturę 20–30°C,
- Natężenie przepływu roztworu otrzymanego wg przykładów 1–3 przez układ wynosi 1000–2000 kg/h.

Uzyskane wartości DP dla preparatu stałego mają wartości odpowiadające ich płynnym roztworom wyjściowym.

Przykład 5

Roztwór otrzymany według przykładów 1–3 można poddać liofilizacji uzyskując produkt w formie stałej zawierający OGA w ilości do 10% (m/m).

W celu uzyskania materiału w postaci liofilizatu stosuje się liofilizator.

Stosuje się znane zjawy dziedziny techniki liofilizacji przy zadanych warunkach, gdzie:

- roztwór otrzymany według przykładów 1–3 zamraża się do temperatury od -35 do -25°C utrzymując takie warunki przez 2 godziny,
- proces suszenia prowadzi się pod ciśnieniem 0.2 mbar w temperaturze 20–30°C przez 20 godzin,
- uzyskany materiał dosusza się w temperaturze 30–40°C pod ciśnieniem 0.1 mbar przez 1–2 godziny.
- Uzyskane wartości DP dla preparatu w postaci liofilizatu mają wartości odpowiadające ich płynnym roztworom wyjściowym.

Przykład 6

Badanie zakresu stopnia polimeryzacji (DP) w preparacie OGA

Badanie zakresu stopnia polimeryzacji preparatu OGA uzyskanego sposobem według wynalazku prowadzono dla formy płynnej i stałej preparatu. Wybrano metodę oznaczania zawartości kwasu galakturonowego metodą spektrofotometryczną z *m*-hydroksydifenylem według Blumenkrantz, Asboe-Hansen. W warunkach oznaczenia zachodzi całkowita hydroliza substancji pektynowych do kwasów galakturonowych (Gala). Kwasy te reagują z kwasem siarkowym tworząc kwas 5-formylo-2-furanokarboksyłowy (5FF). Z kolei te pochodne reagują z *m*-hydroksydifenylem (MHDP) tworząc kompleksy o różowym zabarwieniu, o maksimum absorpcji przy długości fali 520 nm. Do oznaczania zawartości końców redukujących kwasu galakturonowego zastosowano metodę Bertranda. Oznaczanie oligosacharydów przeprowadza się metodą pośrednią na podstawie ilości roztworu manganianu (VII) potasu zużytego na miareczkowanie jonów Fe⁺² odpowiadających stechiometrycznie ilości polisacharydów redukujących zawartych w badanym roztworze. W metodzie tej stosuje się trzy płyny Bertranda (I – siarczan (VI) miedzi (II); II – winian potasu i sodu oraz wodorotlenek sodu; III – siarczan (VI) żelaza (III) w stężonym kwasie siarkowym (VI)). Oznaczenie polega na ilościowej redukcji jonów Cu⁺² do Cu⁺¹ przez polisacharydy zawierające w cząsteczce wolne grupy redukujące, które zachodzi w środowisku silnie alkalicznym i w temperaturze wrzenia roztworu. W celu uzyskania wartości DP należy porównać stosunek całkowitej zawartości kwasu galakturonowego oznaczonego metodą Blumenkrantz, Asboe-Hansen (1973) do całkowitej zawartości redukujących końców oznaczonych metodą Bertranda. Powyższą zależność określa się za pomocą wzoru:

$$\text{Stopień polimeryzacji (DP)} = \frac{\text{całkowita ilość kwasu galakturonowego} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right)}{\text{całkowita ilość wolnych końców redukujących} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right)}$$

Przykład 7

Badanie właściwości preparatu OGA

Badania właściwości preparatu OGA uzyskanego sposobem według wynalazku prowadzono dla formy płynnej preparatu.

Doświadczenia przeprowadzono na roślinach uprawianych w tunelu i w polu narażonych na porażenie przez powszechnie występujące choroby grzybowe. Obserwowano wpływ preparatu OGA na najczęściej występujące choroby grzybowe roślin wywoływane przez mączniaki i Alternarie, dozując preparat OGA według wynalazku w dawce 2 l i 3 l na hektar uprawy. Ilość cieczy roboczej w doświadczeniach wynosiła 600 l/ha. Do celów porównawczych zastosowano kontrolę, która oznacza uprawy bez podawania preparatów oraz kombinację z zastosowaniem dostępnych komercyjnie środków ochrony roślin.

Preparat OGA wg wynalazku aplikowano dolistnie kilkakrotnie w odstępach co 7–10 dni poprzez oprysk roślin. Dawki preparatów są podane w tabelach z wynikami poszczególnych doświadczeń. OGA zastosowano przed wystąpieniem objawów choroby w celu aktywacji procesów obronnych roślin. Skuteczność preparatów oceniono na podstawie stopnia porażenia liści przez mączniaka lub alternarię w odstępach czasu co 7–10 dni. Doświadczenia prowadzono na uprawach ogórka i pomidora w tunelu oraz w polowych uprawach buraka ćwikłowego, marchwi i kapusty.

W tunelowej uprawie ogórka skuteczność OGA w obu badanych dawkach, obserwowana 10 dni po 2 zabiegu, wynosiła powyżej 80% przy porażeniu na obiekcie kontrolnym wynoszącym 1,54%. Dalsze obserwacje wykazały, że skuteczność utrzymywała się powyżej 80% dla dawki 3 l/ha, natomiast dla dawki 2 l/ha spadła do poziomu 76%. Wzrost porażenia na roślinach kontrolnych do 19,3% (10 dni po 4 zabiegu), a następnie 39,6% (10 dni po 5 zabiegu) spowodowało, że skuteczność OGA bez względu na dawkę spadła poniżej 70% (obserwacja prowadzona 10 dni po 4 zabiegu), a następnie poniżej 60%. Obserwacje skuteczności preparatu OGA w ograniczeniu mączniaka prawdziwego *Golovinomyces orontii* w uprawie ogórka pod osłonami przedstawiono w Tabeli 1. Pierwsza aplikacja OGA miała miejsce w fazie BBCH 16.

Tabela 1 Skuteczność preparatu OGA w ograniczaniu mączniaka prawdziwego ogórka (*Golovinomyces orontii*) w uprawie pod osłonami.

KOMBINACJA	Obserwacje							
	10 dni po 2 zabiegu		10 dni po 3 zabiegu		10 dni po 4 zabiegu		10 dni po 5 zabiegu	
	% porażenia liści / % skuteczności							
KONTROLA	1,54	-	5,3	-	19,3	-	39,6	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	0,24	84	1,3	76	7,7	60	19,3	51
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	0,17	89	1,0	81	6,2	68	16,1	59
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	0,18	70	1,1	69	8,9	51	19,0	52
Scorpion 325 SC (substancja aktywna: <i>Azoksystrobina</i> , <i>Difenokonazol</i> , producent: Syngenta)	0,0	100	0,0	100	0,0	100	0,04	99

W tunelowej uprawie pomidora preparat OGA według wynalazku aplikowany w uprawie pomidora (pierwsza aplikacja w fazie BBCH 53–61) skutecznie ograniczał rozwój mączniaka prawdziwego, jego skuteczność obserwowana 10 dni po 3 aplikacji wynosiła 90% bez względu na zastosowaną dawkę. Wzrost porażenia do 30,2% na obiekcie kontrolnym spowodował obniżenie skuteczności, jednakże 4 zabieg preparatem pozwolił na utrzymanie skuteczności preparatu na poziomie od 65% dla dawki 3 l/ha do 75% dla dawki 2 l/ha, wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Skuteczność preparatu OGA w ograniczaniu mączniaka prawdziwego pomidora (*Oidium lycopersici*) w uprawie pod osłonami.

KOMBINACJA	Obserwacje					
	10 dni po 3 zabiegu		14 dni po 4 zabiegu		7 dni po 5 zabiegu	
	% porażenia liści/% skuteczności					
KONTROLA	8,78	-	30,2	-	68,8	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	0,78	91	7,4	75	36,6	46
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	0,84	90	10,4	65	42,9	37
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	2,08	76	18,1	40	48,9	29
Scorpion 325 S.C. (substancja aktywna: <i>Azoksystrobina</i> , <i>Difenokonazol</i> , producent: Syngenta)	0,0	100	0,0	100	0,2	99

WNIOSKI:

Dolistna aplikacja preparatu OGA w uprawie ogórka i pomidora pod osłonami skutecznie ograniczyła porażenie roślin przez mączniaka prawdziwego. OGA stosowane przed wystąpieniem objawów choroby stymuluje procesy obronne i zwiększa odporność roślin. Ponowienie aplikacji preparatem OGA utrzymuje wysoką skuteczność działania w ograniczaniu rozwoju mączniaka prawdziwego w uprawie warzyw pod osłonami.

W połowej uprawie buraka ćwikłowego (Tabela 3) obserwacje porażenia liści przez patogen wykonane 10 dni po 1 aplikacji OGA (faza BBCH 42–45) wykazały jego skuteczność w obu badanych dawkach na poziomie około 70%. Powtórzenie zabiegu pozwoliło na ograniczenie porażenia przez mączniaka i uzyskanie skuteczności na poziomie powyżej 50% w 7 dniu po 2 aplikacji oraz powyżej 40% w 7 dniu po 3 aplikacji (Tabela 3). Skuteczność w ograniczaniu mączniaka prawdziwego w uprawie marchwi po 4 aplikacji preparatem OGA była wysoka i wynosiła około 80% dla dawki 2 l/ha i 3 l/ha. Obserwacje wykonane 7 i 14 dni po 5 zabiegu wykazały skuteczność na poziomie około 40% dla dawki 2 i 3 l/ha (Tabela 4). Pierwsza aplikacja OGA w uprawie marchwi miała miejsce w fazie BBCH 42.

Tabela 3 Skuteczność preparatu OGA w ograniczaniu mączniaka prawdziwego buraka ćwikłowego (*Erysiphe betae*) w uprawie poi owej.

KOMBINACJA	Obserwacje					
	10 dni po 1 zabiegu		7 dni po 2 zabiegu		7 dni po 3 zabiegu	
	% porażenia liści/% skuteczności					
KONTROLA	9,7	-	45,5	-	72,5	-
OGA 2 l/ha (Przykład 3)	2,7	72	18,5	59	38,8	46
OGA 3 l/ha (Przykład 3)	3,0	69	21,9	51	42,1	41
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	5,8	40	31,3	43	52,9	30
Scorpion 325 SC (substancja aktywna: <i>Azoksystrobina</i> , <i>Difenokonazol</i> , producent: Syngenta)	0,0	100	1,1	97	2,2	97

Tabela 4 Skuteczność preparatu OGA w ograniczaniu mączniaka prawdziwego marchwi (*Erysiphe heraclei*) w uprawie polowej

KOMBINACJA	Obserwacje					
	7 dni po 4 zabiegu		7 dni po 5 zabiegu		14 dni po 5 zabiegu	
	% porażenia liści/% skuteczności					
KONTROLA	0,66	-	5,9	-	33,2	-
OGA 2 l/ha (Przykład 3)	0,13	80	2,6	56	20,1	40
OGA 3 l/ha (Przykład 3)	0,14	78	3,2	46	22,6	32
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	0,25	57	4,7	27	26,7	20
Luna Experience (substancja aktywna: <i>fluopyram</i> , <i>tebukonazol</i> , Producent: Bayer)	0,0	100	0,0	100	0,03	99

Przetestowano także OGA w uprawie ogórka w celu określenia działania na mączniaka rzekomego (Tabela 5). Skuteczność OGA w ograniczaniu organizmów grzybopodobnych (mączniak rzekomy) w uprawach polowych wynosiła około 60% przy porażeniu na obiekcie kontrolnym wynoszącym 5%. Wzrost porażenia na liściach do 49,1%, spowodował spadek skuteczności OGA do poziomu poniżej 40%. Kolejne obserwacje wykazały dalszy duży spadek skuteczności OGA. Pierwsza aplikacja preparatów w fazie BBCH 65.

Tabela 5 Skuteczność badanych preparatów w ograniczaniu rozwoju mączniaka rzekomego ogórka (*Pseudoperonospora cubensis*)

KOMBINACJA	Obserwacje: % porażenia liści/% skuteczności					
	7 dni po 1 zabiegu		7 dni po 2 zabiegu		7 dni po 3 zabiegu	
KONTROLA	5,0	-	49,1	-	79,5	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	2,0	60	36,0	27	73,3	8
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	1,7	66	32,3	34	65,7	17
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	3,2	36	44,7	9	70,0	12
Cabrio duo (substancja aktywna <i>piraklostrobina</i> , <i>dimetomorf</i> , Producent BASF)	0,0	100	6,4	87	29,6	63

WNIOSKI:

Dolistna aplikacja preparatu OGA w uprawie marchwi i buraka ćwikłowego w warunkach polowych skutecznie ograniczyła porażenie roślin przez mączniaka prawdziwego. OGA stosowane przed wystąpieniem infekcji patogenu stymuluje procesy obronne roślin. Preparat OGA jest skuteczny w uprawach polowych w szczególności w ograniczeniu porażenia mączniaka prawdziwego.

W polowej uprawie marchwi i kapusty skuteczność preparatu OGA w ograniczeniu rozwoju alternariozy marchwi (Tabela 6) i czerni krzyżowych kapusty (Tabela 7) były zbliżone. W uprawie marchwi pierwsza przeprowadzona ocena wykazała skuteczność OGA na poziomie od 36% dla dawki 2 L/ha do

52% dla 3 l/ha. W 2 terminie oceny OGA wykazywała skuteczność od 23 do 45%, a w 3 terminie oceny od 21 do 41% (Tabela 6). Pierwsza aplikacja w uprawie marchwi w fazie BBCH 42.

W dniu pierwszej oceny skuteczność ograniczenia porażenia liści kapusty przez *Alternaria spp.* wynosiła 45% dla OGA 3 l/ha, w kolejnych terminach oceny skuteczność wynosiła około 30%. Skuteczność OGA 2 l/ha była o kilka procent niższa (Tabela 7). Pierwsza aplikacja OGA w uprawie marchwi w fazie BBCH 41–42.

Tabela 6 Skuteczność preparatów w ograniczeniu rozwoju alternariozy marchwi (*Alternaria dauci*)

KOMBINACJA	Obserwacje					
	% porażenia liści/% skuteczności					
	10 dni po 2 zabiegu		7 dni po 3 zabiegu		7 dni po 4 zabiegu	
KONTROLA	8,4	-	17,6	-	30,9	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	5,4	36	13,5	23	24,3	21
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	4,0	52	9,7	45	18,2	41
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	5,1	39	13,9	21	25,3	18
Luna Experience 400 S.C. substancja aktywna: <i>fluopyram 200 g/l,</i> <i>tebukonazol 200</i> <i>g/l</i> , Producent: Bayer	0,4	95	1,0	94	2,2	93

Tabela 7. Skuteczność preparatów w ograniczeniu rozwoju czerni krzyżowych kapusty (*Alternaria spp.*)

KOMBINACJA	Obserwacje					
	% porażenia liści/% skuteczności					
	10 dni po 2 zabiegu		7 dni po 3 zabiegu		10 dni po 4 zabiegu	
KONTROLA	1,93	-	4,87	-	7,27	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	1,13	42	3,39	30	5,42	25
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	1,07	45	3,18	35	5,14	29
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	1,2	38	3,48	29	5,5	24
Signum 33 WG Substancja aktywna: <i>boskalid, piraklostrobina</i> Producent: BASF SE	0,0	100	0,16	97	0,25	97

WNIOSKI:

Preparat OGA ogranicza rozwój chorób grzybowych wywoływanych przez grzyby rodzaju *Alternaria* w uprawie warzyw na poziomie 40–50%. OGA jest skuteczne w ochronie roślin uprawianych w polu.

Przeprowadzono doświadczenie, w celu sprawdzenia skuteczności preparatu OGA w ograniczaniu chorób grzybowych pszenicy ozimej.

W uprawie pszenicy aplikowano preparat OGA dolistnie dwukrotnie w fazie BBCH 30–31 i 49–55 w dawce 2 l/ha (Tabela 8). Obserwacje wykonane po drugim zabiegu na liściu podflagowym i flagowym

wykazały skuteczność preparatu OGA powyżej 40% w ograniczeniu mączniaka prawdziwego i septoriozy w pszenicy ozimej. Na poziomie 51% kształtowała się skuteczność w ograniczeniu fuzaryjnej zgorzeli podstawy źdźbła na źdźbłach pszenicy. Natomiast rdza brunatna na liściach podflagowych i flagowych oraz ostra plamistość oczkowa na źdźbłach w wyniku aplikacji OGA została ograniczona w 60% (Tabela 8). W przypadku rdzy brunatnej i septoriozy skuteczność OGA była o kilka procent niższa niż preparatu chemicznego.

Tabela 8. Skuteczność preparatu OGA w ograniczaniu chorób grzybowych pszenicy ozimej.

OBSERWACJE	19 dni po 2 zabiegu liść podflagowy i flagowy	29 dni po 2 zabiegu liść podflagowy i flagowy		24 dni po 2 zabiegu źdźbło	
KOMBINACJA	Mączniak prawdziwy (<i>Blumeria graminis</i>)	Rdza brunatna (<i>Puccinia recondita</i>)	Septorioza paskowana liści (<i>Zymoseptoria tritici</i>)	Fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni (<i>Fusarium spp.</i>)	Ostra plamistość oczkowa (<i>Rhizoctonia crealis</i>)
Skuteczność (%)					
KONTROLA	-	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	40-43	45-60	31-42	51	60
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	16-21	19-24	15-20	19	33
Talius 200EC (substancja aktywna proquinazid, Producent: DuPont) Prosaro 250EC (substancja aktywna: protiokonazol, tebukonazol, Producent: Bayer)	81-92*	64-88*	55-73*	74*	72*

*Skuteczność odczytana po aplikacji Taliusa 200EC (faza BBCH 30-31) i Prosaro 250EC (faza 49-55)

WNIOSKI:

Preparat OGA ogranicza rozwój chorób grzybowych roślin zbożowych na poziomie 40–60%.

Przeprowadzono serię doświadczeń oceniających wpływ OGA na ochronę roślin przed powszechnie występującymi szkodnikami. Preparat OGA stosowano według wynalazku w dawce 2 l i 3 l na hektar uprawy, stosowano 600 l/ha cieczy roboczej. Do celów porównawczych zastosowano kontrolę, która oznacza uprawy bez podawania preparatów oraz kombinację z zastosowaniem dostępnych komercyjnie środków ochrony roślin.

Preparat OGA wg wynalazku aplikowano dolistnie 2-krotnie w odstępach co 7 dni poprzez oprysk roślin. W prezentowanych badaniach pierwsza aplikacja miała miejsce po przekroczeniu progu szkodliwości dla danego szkodnika, zgodnie ze standardami EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization <https://www.eppo.int>). Dawki preparatów podano w Tabelach z wynikami.

Przeprowadzono doświadczenia na uprawach truskawki, ogórka, pomidora, papryki, kapusty i marchwi. Preparat OGA aplikowano dolistnie w dawce 2 l/ha i 3 l/ha i badano działanie preparatu OGA na szkodniki ssąco-kujące tj. przędziorki, wciornastki i mszyce. Szkodniki te wysysają soki z komórek roślinnych uszkadzając tym samym tkanki roślinne i powodują straty w uprawie roślin. Skuteczność (%) zwalczania szkodników została obliczona wzorem Hendersona-Tiltona, który uwzględnia liczebność populacji szkodnika przed i po zabiegu.

Wzór Hendersona-Tiltona: Skuteczność (%) = $(1 - (K1 \times T2)/(K2 \times T1)) \times 100$,

gdzie:

K1 – liczba szkodnika przed zabiegiem na poletku kontrolnym

K2 – liczba szkodnika po zabiegu na poletku kontrolnym

T1 – liczba szkodnika przed zabiegiem na poletku traktowanym

T2 – liczba szkodnika na poletku traktowanym

Skuteczność OGA w zwalczaniu form ruchomych przędziorka (Tabela 9) w dawce 2 l/ha i 3 l/ha, obserwowana 7 dnia po 1 aplikacji (T1 + 7) wynosiła powyżej 70% w uprawie truskawki i ogórka. Obserwacja wykonana 7 dnia po drugiej aplikacji (T2 + 7) wykazała kilku procentowy spadek skuteczności, jednakże po kolejnych 7 dniach skuteczność OGA 2 l/ha zwiększyła się do 80% dla truskawki i 70% dla ogórka (Tabela 9). Najwyższą skuteczność w zwalczaniu jaj przędziorka (Tabela 10) wynoszącą 91% zaobserwowano 14 dni po 2 zabiegu (T2 + 14) preparatem OGA w dawce 2 l/ha w uprawie truskawki oraz 69% dla dawki 2 l/ha dla ogórka. Skuteczność preparatu OGA w dawce 2 l/ha w zwalczaniu przędziorka była porównywalna do syntetycznego standardu środka Vertigo (Tabela 10).

Tabela 9. Skuteczność zwalczania form dorosłych przędziorka chmielowca (*Tetranychus urticae*) w uprawie truskawki i ogórka

KOMBINACJA	SKUTECZNOŚĆ (%) ZWALCZANIA PRZĘDZIORKA (FORMY RUCHOME)									
	Truskawka					Ogórek				
	T1+3	T1+7	T2+7	T2+14	T2+21	T1+3	T1+7	T2+7	T2+14	T2+21
KONTROLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	64	75	69	80	59	76	77	63	70	46
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	63	70	66	74	63	65	72	42	37	68
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	44	40	46	31	35	44	38	35	30	29
VERTIGO (substancja aktywna: <i>abamektyna</i> , Producent: Makhteshim Agan)	66	71	95	47	83	76	83	90	45	63

Tabela 10. Skuteczność zwalczania jaj przędziorka chmielowca (*Tetranychus urticae*) w uprawie truskawki i ogórka

KOMBINACJA	SKUTECZNOŚĆ (%) ZWALCZANIA PRZĘDZIORKA (JAJA)									
	Truskawka					Ogórek				
	T1+3	T1+7	T2+7	T2+14	T2+21	T1+3	T1+7	T2+7	T2+14	T2+21
KONTROLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 3)	55	72	50	91	45	57	52	63	69	54
OGA 3 l/ha (Przykład 3)	31	29	31	77	0	57	76	34	32	78
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	29	25	20	18	15	46	40	38	35	20
VERTIGO (substancja aktywna: <i>abamektyna</i> , Producent: Makhteshim Agan)	68	91	88	81	71	71	79	91	64	74

Skuteczność preparatu OGA w zwalczaniu wciornastka w uprawie ogórka była najwyższa względem stadium nimf i wynosiła 90% w 21 dniu po 2 aplikacji (T2 + 21) dla dawki 2 l/ha. Obserwacje dla tego stadia rozwojowego wykonane 7 i 14 dnia po 2 aplikacji także wykazały wysoką skuteczność wynoszącą powyżej 80%. Najwyższą skuteczność w stosunku do osobników dorosłych stwierdzono 14 dni po 2 aplikacji wynosiła ona 72% (Tabela 11). W uprawie pomidora preparat OGA także wykazywał wyższą skuteczność w zwalczaniu nimf w porównaniu do osobników dorosłych, która wynosiła powyżej 90%, 7 dni po 1 oraz 7 i 14 dni po 2 zabiegu. Zarówno w zwalczaniu osobników dorosłych, jak i nimf skuteczniejsza jest dawka 2 l/ha preparatu OGA. Obserwacje wykonane 14 dni po 2 zabiegu wykazały, że preparat OGA w dawce 2 l/ha jest skuteczny w 72%. W uprawie papryki skuteczność zwalczania osobników dorosłych była najwyższa dla preparatu OGA dla dawki 3 l/ha i wynosiła 100% siedem dni po 2 zabiegu, skuteczność zwalczania nimf wciornastka utrzymywała się na poziomie ponad 50% 7 dni po 1 i 2 aplikacji (Tabela 11).

Tabela 11. Skuteczność zwalczania wciornastka zachodniego (*Frankliniella occidentalis*) w uprawie ogórka i pomidora oraz wciornastka tytoniowca (*Thrips tabaci*) w uprawie papryki

KOMBINACJA	OSOBNIKI DOROSŁE					NIMFY				
	T1+3	T1+7	T2+7	T2+14	T2+21	T1+3	T1+7	T2+7	T2+14	T2+21
Skuteczność (%) preparatów w uprawie ogórka										
KONTROLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	69	43	68	72	62	63	18	83	82	90
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	70	42	53	51	30	76	13	82	72	85
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	30	35	29	25	20	55	28	49	44	40
MOSPILAN 20 EC (substancja czynna: <i>Acetamipryd</i> , producent: Sumi Agro)	63	24	28	0	20	74	47	88	66	91

	Skuteczność (%) preparatów w uprawie pomidora									
KONTROLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	45	20	61	74	3	86	91	92	93	18
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	0	0	0	0	0	55	71	71	59	4
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	15	10	9	5	0	20	15	9	0	0
MOSPILAN 20 EC (substancja czynna: <i>Acetamipryd</i> , producent: Sumi Agro)	0	0	0	26	2	0	44	51	68	21
	Skuteczność (%) preparatów w uprawie papryki									
KONTROLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	15	0	46	24	27	15	3	38	6	0
OGA 3 l/ha (przykład 2)	22	0	100	18	86	30	58	59	23	19
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	20	0	0	18	14	0	0	20	15	16
MOSPILAN 20 EC (substancja czynna: <i>Acetamipryd</i> , producent: Sumi Agro)	0	0	0	11	70	0	64	83	70	56

WNIOSKI:

OGA skutecznie zwalcza przędziorka i wciornastka w uprawie warzyw, działanie OGA jest zarówno bezpośrednie na szkodnika, jak i pośrednie. Powtórzenie aplikacji OGA powoduje wzrost lub utrzymanie wysokiej skuteczności zwalczania szkodnika. Skuteczność OGA w zwalczaniu przędziorka i wciornastka jest porównywalna do skuteczności chemicznych środków ochrony roślin. Przeprowadzono doświadczenia, w celu sprawdzenia skuteczności preparatu OGA w zwalczaniu mszyc w uprawie warzyw i jabłoni.

Skuteczność zwalczania mszyc w uprawie kapusty po pierwszej aplikacji (T1 + 3, T1 + 7) preparatu OGA wynosiła od 66% dla dawki 2 l/ha do 72% dla dawki 3 l/ha.

Po 2 powtórnej aplikacji skuteczność preparatu OGA wzrosła i wynosiła powyżej 80% dla dawki 2 l/ha w terminie 7 dni po 2 aplikacjach, a 14 i 21 dni po 2 aplikacjach skuteczność wzrosła prawie do 100%. Skuteczność preparatu OGA w zwalczaniu mszycy na kapuście była porównywalna do syntetycznego środka ochrony roślin, jakim jest Karate Zeon. Wyniki przedstawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Skuteczność zwalczania mszyc (*Brevicoryne brassicae*) w uprawie kapusty

KOMBINACJA	Skuteczność (%) zwalczania mszyc				
	T1+3	T1+7	T2+7	T2+14	T2+21
KONTROLA	-	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	66	67	84	95	97
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	72	72	79	89	92
KARATE ZEON 0,05% (substancja czynna: <i>lambda-cyhalotryna</i> , Producent: Syngenta)	80	79	87	91	97

Aplikacja OGA w dawce 3 l/ha zmniejszyła populację mszycy żerującej na roślinach marchwi co przełożyło się bezpośrednio na zmniejszenie liczby uszkodzonych roślin przez tego szkodnika. Wartości badanych parametrów w kombinacji z OGA 3 l/ha były niższe niż w kombinacji z aplikacją chemicznego środka Proteus 110. Wyniki przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Wpływ OGA na mszycę – bawelnica topolowo-marchwiowa (*Pemphigus phenax*) w uprawie marchwi

KOMBINACJA	Liczba uszkodzonych przez bawelnicę roślin/3 m ²	% zasiedlonych roślin po zabiegach na powierzchni 3 m ²
KONTROLA	53,7	28,4
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	40,2	26,2
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	35,5	20,9
Proteus 110, (substancja aktywna: <i>tiachlopryd</i> , <i>deltametryna</i> , producent: Bayer)	46,2	26,3

Przeprowadzone zostało doświadczenie w celu określenia wpływu preparatu OGA na mszycę jabłoniową w uprawie jabłoni. Skuteczność preparatu OGA aplikowanego dolistnie w dawkach 2 l/ha i 3 l/ha w zwalczaniu mszycy wynosiła 60–67% 7 dni po zabiegu (T1 + 7). Wyniki przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Skuteczność OGA w zwalczaniu mszycy jabłoniowej (*Aphis pomi*) na jabłoni.

KOMBINACJA	Średnia liczba mszyc na 1 pędzie			Skuteczność (%) zwalczania	
	PRE-T	T1+2	T1+7	T1+2	T1+7
KONTROLA	212,6	221,9	191,3	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 3)	173,2	137,5	71,6	26	60
OGA 3 l/ha (Przykład 3)	185,1	144,2	49,8	23	67
Mospilan 20 SP (substancja czynna: <i>Acetamipryd</i> , producent: Sumi Agro)	256,1	34,3	5,3	84	98

W doświadczeniu szalkowym testowano skuteczność działania OGA wg wynalazku, jako preparatu o działaniu kontaktowym na szkodniki. Do testu wybrano mszycę. W doświadczeniu pobrano liście papryki z roślin naturalnie zasiedlonych przez mszycę. Liście z mszycami zostały wyłożone na szalki z wilgotną bibułą. Wykonano dwie aplikacje badanymi preparatami. Obserwacje liczby żywych mszyc prowadzono 3 i 7 dni po pierwszym i po drugim zabiegu (Tabela 15). Obserwacje wykonane 7 dni po 1 aplikacji wykazały skuteczność na poziomie 87% dla dawki 2 l/ha, a dla dawki 3 l/ha na poziomie 92%. Po 2 aplikacji skuteczność wzrosła do 100%. Skuteczność preparatu OGA wg wynalazku była wyższa od OGA 2 l/ha (Przykład 1) i porównywalna do środka chemicznego.

Tabela 15. Skuteczność kontaktowego działania OGA w zwalczaniu mszycy brzoskwiowej (*Myzus Persicae*) na liściach papryki

KOMBINACJA	3 dni po 1 zabiegu	7 dni po 1 zabiegu	3 dni po 2 zabiegu	7 dni po 2 zabiegu
	Skuteczność (%) zwalczania			
KONTROLA	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	65	87	92	100
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	94	94	96	100
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	30	25	31	15
MOSPILAN 20 EC (substancja czynna: <i>Acetamipryd</i> , Producent: Sumi Agro)	95	94	100	100

WNIOSKI:

W uprawie kapusty i w teście szalkowym na papryce skuteczność OGA wynosiła ponad 80% i była porównywalna do syntetycznego środka ochrony roślin, jakim jest Karate Zeon i Mospilan 20EC. W uprawie marchwi działanie ochronne preparatu OGA jest porównywalne do chemicznego preparatu komercyjnego Proteus 110.

OGA działa kontaktowo na szkodniki (działanie bezpośrednie) po zetknięciu OGA ze szkodnikiem, szkodnik ginie (Tabela 15). OGA skutecznie zwalcza mszyce w połowej uprawie warzyw.

Kolejne doświadczenia w celu określenia możliwości wykorzystania OGA w ograniczeniu populacji szkodników żerujących na liściach i korzeniach przeprowadzono na kapuście i marchwi.

Preparat OGA aplikowano dolistnie w dawkach 2 l/ha i 3 l/ha i badano działanie preparatu OGA na larwy mączlika warzywnego i tantsnia żerujące na liściach kapusty. W przypadku larw mączlika (Tabela 16) skuteczność preparatu OGA wynosiła 44% i została zaobserwowana 14 dni po 2 zabiegu, skuteczność OGA w zwalczaniu gąsienic tantsnia (Tabela 17) pojawiła się także 14 dni po 2 zabiegu. Dla niższej dawki preparatu OGA skuteczność wynosiła 59%, a dla wyższej 65%. Zaobserwowana skuteczność zwalczania larw mączlika była wyższa dla preparatu OGA (T2 + 14) niż dla preparatu porównawczego Benevia, (Tabela 17).

Tabela 16. Skuteczność zwalczania larw mączlika warzywnego (*Aleyrodes proletella*) w uprawie kapusty białej

KOMBINACJA	SKUTECZNOŚĆ (%) ZWALCZANIA			
	T+3	T+7	T2+7	T2+14
KONTROLA	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 3)	0	0,7	12,4	44,0
OGA 3 l/ha (Przykład 3)	0	0	0	10,0
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	0	0	0	0
Benevia 100 OD (substancja aktywna: <i>cyjanotraniliprol</i> , Producent FMC	70,2	56,7	46,4	0

Tabela 17. Skuteczność zwalczania gąsienic tantsnia (*Plutella xylostella*) w uprawie kapusty białej

KOMBINACJA	SKUTECZNOŚĆ (%) ZWALCZANIA			
	T+3	T+7	T2+7	T2+14
KONTROLA	-	-	-	-
OGA 2 l/ha (Przykład 2)	7,0	5,2	0,0	59,0
OGA 3 l/ha (Przykład 2)	0,0	0,0	0,0	65,3
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	0	0	0	0
Benevia 100 OD (substancja aktywna: <i>cyjanotraniliprol</i> , Producent FMC	97,7	92,4	79,2	93,2

Oceniono wpływ aplikacji dolistnej na porażenie korzeni marchwi przez larwy polyśnicy marchwianki. Formułacje OGA testowano w dwóch dawkach 2 i 3 l/ha, jako środek chemiczny zastosowano Proteus 110 (Tabela 18). Liczba uszkodzonych korzeni marchwi przez polyśnicę była najniższa w kombinacji z OGA w dawce 2 l/ha. Skuteczność działania OGA (2 l/ha) była na zbliżonym poziomie co Proteus 110.

Tabela 18. Skuteczność preparatów w zwalczaniu polyśnicy marchwianki (*Chamaepsila rosae*).

KOMBINACJA	Średnia liczba uszkodzonych roślin spowodowana żerowaniem larw/100 szt. korzeni	Skuteczność (%)
KONTROLA	16,2	-
OGA 2 l/ha (Przykład 3)	8,5	48
OGA 3 l/ha (Przykład 3)	12,2	25
OGA 2 l/ha (Przykład 1)	13,0	20
Proteus 110, (substancja aktywna: <i>tiaclopryd</i> , <i>deltametryna</i> , producent: Bayer)	7,2	55

OGA zwalcza larwy żerujące na liściach i korzeniach roślin poprzez stymulację procesów obronnych roślin. OGA chroni korzenie marchwi przed larwami żerującymi na korzeniach na poziomie chemicznych środków ochrony roślin.

PODSUMOWANIE EKSPERYMENTÓW

Otrzymane wyniki z doświadczeń na ważnych gospodarczo uprawach roślin wykazały, że w ograniczeniu chorób grzybowych preparat OGA skutecznie ogranicza mączniaka prawdziwego w uprawie warzyw, choroby grzybowe w uprawie pszenicy oraz grzyby z rodzaju *Alternaria*. Wyższą skuteczność w ograniczeniu mączniaka prawdziwego wykazuje preparat OGA w uprawach pod osłonami niż w uprawie polowej. W uprawie pod osłonami skuteczność preparatu OGA wynosi około 90%, a w uprawie polowej około 80%. W uprawie polowej skuteczność OGA jest wyższa w ograniczeniu mączniaka prawdziwego niż rzekomego. Preparat OGA aplikowany profilaktycznie w uprawie pszenicy ozimej ogranicza porażenie liści i źdźbła przez choroby grzybowe na poziomie 40–60%. Wysoka skuteczność zwalczania chorób grzybowych w uprawach roślin w szczególności na początku porażenia wskazuje na możliwość wykorzystania preparatu OGA do programów ochrony roślin, jako uzupełnienie działań ochronnych mające na celu ograniczenie stosowania syntetycznych środków ochrony roślin. Ponadto, obserwowany w doświadczeniach wzrost skuteczności preparatu po ponownej jego aplikacji wskazuje także na pośrednie działanie preparatu OGA na roślinę. Preparat OGA stymuluje mechanizmy obronne rośliny, które uruchamiane są podczas ataku patogenów.

Skuteczność działania preparatu OGA w zwalczaniu przędziorka, wciornastka i mszyc jest wysoka i oscyluje na poziomie od 60 do 90%, powtórny drugi zabieg preparatem według wynalazku zwiększa o kilkanaście procent skuteczność zwalczania szkodników. Preparat OGA wykazuje wyższą skuteczność w ograniczaniu nimf wciornastka niż osobników dorosłych, w szczególności po powtórzeniu zabiegu. W teście szalkowym oraz w uprawie kapusty w polu skuteczność zwalczania mszyc wynosiła powyżej 90% i była porównywalna ze stosowanymi obecnie środkami chemicznymi. Skuteczność OGA w ograniczeniu żerowania larw wynosi od 45 do 65%.

Preparat OGA w zwalczaniu szkodników o aparacie kująco-ssącym tj. przędziorków, wciornastków i mszyc wykazuje głównie działanie kontaktowe (bezpośrednie) na szkodniki, w przypadku larw mączlika, gąsienic tantnisia i larw polyśnicy, które żerują na liściach lub korzeniach, preparat OGA działa pośrednio na szkodnika poprzez działanie na roślinę. Obserwowana skuteczność działania OGA na larwy i gąsienice ujawniająca się po pewnym czasie i po powtórzeniu aplikacji pozwala sądzić, że preparat OGA stymuluje odporność roślin. Preparat OGA aktywuje procesy i przemiany metaboliczne roślin, które odpowiadają za mechanizm obronny roślin. Przykładem takiego procesu jest produkcja metabolitów wtórnych takich jak terpenoidy, które mają właściwości repelentne. Akumulacja związków repelentnych w tkankach rośliny powoduje, że jest ona mniej „smaczna” dla larw żywiących się liśćmi.

Przykład 8**Ocena wpływu preparatu OGA na stymulację odpowiedzi odpornościowej roślin**

Analiza ekspresji genów metodą RNA-seq pozwala na identyfikację genów, które w danej fazie wzrostu rośliny w konkretnej tkance ulegają ekspresji. Analiza bioinformatyczna pozwala zidentyfikować geny, których ekspresja jest statystycznie istotnie różna w obiekcie traktowanym w porównaniu do obiektu kontrolnego. Analiza ekspresji genów wykonana została w liściach pomidora po aplikacji preparatu OGA w dawce 1 L/ha (przykład 2). Doświadczenie prowadzono w warunkach kontrolowanych w komorze fitotronowej. Pierwszy zabieg został wykonany w fazie 4 liści i następnie wykonano 3 zabiegi co 4 dni. Następnie, 48 h po ostatnim zabiegu zebrano liście z kombinacji kontrolnej, gdzie rośliny traktowane były wodą destylowaną oraz z kombinacji z OGA, bezpośrednio po zbiorze liście zostały zamrożone w -80°C do momentu izolacji mRNA. Wyizolowane mRNA z liści pomidora zostało poddane sekwencjonowaniu metodą NGS (sekwencjonowanie nowej generacji). Sekwencjonowanie mRNA wykazało aktywację genów kodujących związki tj. białka, enzymy i fitohormony biorące udział w reakcji obronnej roślin. W wyniku analizy bioinformatycznej zidentyfikowano 1760 genów ulegających statystycznie istotnie podwyższonej ekspresji pod wpływem preparatu OGA w porównaniu do obiektu kontrolnego oraz 1329 genów o istotnie obniżonej ekspresji. W Tabeli 19 przedstawiono fragment wyników analizy bioinformatycznej, dla genów o statystycznie istotnej różnicy między kontrolą (wartość ekspresji wynosi 1) a preparatem OGA (przykład 2), gdzie krotność zmiany ekspresji genu wyniosła przynajmniej 3.

Tabela 19. Wyniki analizy ekspresji genów

Nr genu	Wartość zmiany ekspresji genu (o tyle razy wzrosła ekspresja)	Nazwa genu	Nazwa białka kodującego gen
Solyc04g079450.3	7,27	SPZ3_ARATH	Serpin-Z3
Solyc02g085910.3	7,14	LBD41_ARATH	LOB domain-containing protein 41
Solyc11g042560.1	5,42	ERF22_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor ERF022
Solyc03g093130.3	4,93	XTH25_ARATH	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 25
Solyc02g090770.1	4,47	EF112_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor ERF112
Solyc02g064830.3	4,32	GH33_ARATH	Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.3
Solyc11g018775.1	4,32	PERX_NICSY	Lignin-forming anionic peroxidase
Solyc01g090300.3	4,26	ERF99_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor 13
Solyc10g050970.1	4,25	EF109_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor ERF109
Solyc03g093120.3	4,12	XTH25_ARATH	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 25
Solyc08g036640.3	4,11	TIF5A_ARATH	Protein TIFY 5A {ECO:0000303 PubMed:17499004}
Solyc08g007830.1	4,1	DRE1F_ARATH	Dehydration-responsive element-binding protein 1F
Solyc01g098690.2	3,96	RLP50_ARATH	Receptor-like protein 50 {ECO:0000303 PubMed:18434605}
Solyc10g050960.2	3,87	CRF4_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor CRF4
Solyc02g076640.1	3,87	DOGL4_ARATH	Protein DOG1-like 4 {ECO:0000303 PubMed:17065317}

Solyc03g093080.3	3,87	XTH22_ARATH	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 22
Solyc12g009015.1	3,86	ENV_SIVMK	Envelope glycoprotein gp160
Solyc06g054630.2	3,84	ERF17_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor ERF017
Solyc08g080290.3	3,84	ERF26_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor ERF026
Solyc01g005160.3	3,84	PUB21_ARATH	U-box domain-containing protein 21
Solyc03g111300.1	3,82	C94B3_ARATH	Cytochrome P450 94B3 {ECO:0000305}
Solyc03g097050.3	3,79	CSLD2_ARATH	Cellulose synthase-like protein D2
Solyc08g074705.1	3,79	DAAF1_DROPS	Dynein assembly factor 1, axonemal homolog
Solyc08g068640.3	3,76	SDC1_ORYSJ	Serine decarboxylase 1
Solyc01g087590.3	3,76	CAC1F_HUMAN	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1F {ECO:0000305}
Solyc02g063540.2	3,74	1A13_SOLLC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 3
Solyc05g055080.1	3,73	RS14_BUCAK	30S ribosomal protein S14 {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_00537}
Solyc02g080850.1	3,73	FB333_ARATH	Probable F-box protein At4g22030
Solyc01g079200.3	3,72	G2OX6_ARATH	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 6
Solyc07g054980.2	3,68	MYB15_ARATH	Transcription factor MYB15 {ECO:0000305}
Solyc03g083680.1	3,66	PLSY1_THEMA	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 {ECO:0000255 HAMAP-Rule:MF_01043}
Solyc01g109920.2	3,65	ECP40_DAUCA	Embryogenic cell protein 40
Solyc05g054250.1	3,65	HIP33_ARATH	Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 33 {ECO:0000303 PubMed:21072340, ECO:0000303 PubMed:23368984}
Solyc03g121340.1	3,64	NIH_ARATH	DExH-box ATP-dependent RNA helicase DExH2 {ECO:0000305}
Solyc10g008080.2	3,59	ATL40_ARATH	RING-H2 finger protein ATL40
Solyc03g111750.2	3,58	ATG16_ARATH	Autophagy-related protein 16 {ECO:0000305}
Solyc08g036620.3	3,55	TIF5A_ARATH	Protein TIFY 5A {ECO:0000303 PubMed:17499004}
Solyc06g076060.1	3,53	SMR3_ARATH	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor SMR3 {ECO:0000303 PubMed:24399300, ECO:0000303 PubMed:26546445}

Solyc06g075690.3	3,51	UFC_ARATH	Protein UPSTREAM OF FLC
Solyc06g062920.3	3,5	Y1725_ARATH	Putative receptor-like protein kinase At1g72540
Solyc12g005450.1	3,44	Y1332_ARATH	Probable receptor-like protein kinase At1g33260 {ECO:0000305}
Solyc02g094000.1	3,44	CML19_ORYSJ	Putative calcium-binding protein CML19
Solyc02g064980.1	3,43	M3K20_ARATH	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 20 {ECO:0000303 PubMed:21969089}
Solyc11g068390.1	3,43	BIC1_ARATH	Protein BIC1 {ECO:0000303 PubMed:27846570}
Solyc04g076730.1	3,42	RAD18_SCHPO	Postreplication repair E3 ubiquitin-protein ligase rad18
Solyc08g008280.3	3,41	WRK53_ARATH	Probable WRKY transcription factor 53 {ECO:0000303 PubMed:17369373}
Solyc08g036660.3	3,38	TIF5A_ARATH	Protein TIFY 5A {ECO:0000303 PubMed:17499004}
Solyc10g085700.1	3,34	MAIL1_ARATH	Protein MAIN-LIKE 1 {ECO:0000303 PubMed:24635680}
Solyc02g062550.3	3,33	HSR4_ARATH	Protein HYPER-SENSITIVITY-RELATED 4 {ECO:0000303 PubMed:15181213}
Solyc09g082870.2	3,31	ACA13_ARATH	Putative calcium-transporting ATPase 13, plasma membrane-type
Solyc08g077610.2	3,29	CLSY3_ARATH	SNF2 domain-containing protein CLASSY 3
Solyc08g036625.1	3,27	TIF5A_ARATH	Protein TIFY 5A {ECO:0000303 PubMed:17499004}
Solyc01g079660.2	3,24	A70_ARATH	Pathogen-associated molecular patterns-induced protein A70 {ECO:0000303 PubMed:17215350}
Solyc08g066320.3	3,23	SIK1_ORYSJ	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase SIK1 {ECO:0000305}
Solyc06g035700.1	3,22	ERF25_ARATH	Ethylene-responsive transcription factor ERF025
Solyc09g011860.3	3,22	OFT28_ARATH	O-fucosyltransferase 28 {ECO:0000305}
Solyc08g068600.3	3,22	SDC1_ORYSJ	Serine decarboxylase 1
Solyc07g056000.3	3,21	XTH16_ARATH	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 16
Solyc10g011910.3	3,21	WRK22_ARATH	WRKY transcription factor 22
Solyc04g079360.1	3,2	MYB77_ARATH	Transcription factor MYB77 {ECO:0000303 PubMed:11597504}

Solyc06g074140.1	3,18	PUB24_ARATH	E3 ubiquitin-protein ligase PUB24
Solyc05g050210.3	3,18	GDL61_ARATH	GDSL esterase/lipase At4g01130
Solyc02g068680.1	3,18	NRX1_ARATH	Probable nucleoredoxin 1
Solyc03g119530.3	3,17	LBD41_ARATH	LOB domain-containing protein 41
Solyc10g080010.2	3,17	MUC21_ARATH	Xylan glycosyltransferase MUCI21 {ECO:0000305}
Solyc09g083360.3	3,16	RS151_ARATH	40S ribosomal protein S15-1
Solyc01g073830.1	3,13	PKL_ARATH	CHD3-type chromatin-remodeling factor PICKLE
Solyc01g065530.3	3,13	COBL7_ARATH	COBRA-like protein 7
Solyc04g074830.1	3,12	CAP16_ARATH	Putative clathrin assembly protein At4g40080
Solyc08g068680.3	3,12	SDC1_ORYSJ	Serine decarboxylase 1
Solyc07g051950.3	3,11	SLAH1_ARATH	S-type anion channel SLAH1
Solyc07g040710.3	3,1	IQM5_ARATH	IQ domain-containing protein IQM5 {ECO:0000305}
Solyc08g022240.1	3,1	PLA15_ARATH	Phospholipase A1-Igama1, chloroplastic
Solyc03g007380.2	3,09	WRK41_ARATH	Probable WRKY transcription factor 41
Solyc11g071760.2	3,06	CML37_ARATH	Calcium-binding protein CML37 {ECO:0000303 Ref.5}
Solyc10g076240.2	3,06	PER1_ARAHY	Cationic peroxidase 1
Solyc03g116890.3	3,06	WRK40_ARATH	Probable WRKY transcription factor 40 {ECO:0000303 Ref.1}
Solyc03g005040.1	3,05	CML31_ORYSJ	Probable calcium-binding protein CML31
Solyc04g015360.3	3,04	GATA8_ARATH	GATA transcription factor 8
Solyc12g055710.1	3,04	ATL60_ARATH	RING-H2 finger protein ATL60
Solyc02g077060.2	3,04	HR1_ARATH	RPW8-like protein 1 {ECO:0000303 PubMed:11141561}
Solyc01g096720.3	3,01	ZIFL1_ARATH	Protein ZINC INDUCED FACILITATOR-LIKE 1

WNIOSKI:

Preparat OGA zwiększył ekspresję genów biorących udział w jednej z głównych odpowiedzi obronnych roślin w systemicznej odporności nabytej (SAR). Odporność nabyta SAR jest indukowana przez patogeny oraz substancje naturalne imitujące interakcję patogen-roślina. Indukcja SAR przebiega szlakiem sygnałnym kwasu salicylowego, któremu towarzyszy synteza substancji sygnałnych oraz białek związanych z patogenezą – roślinne białka PR (Pathogenesis Related).

Pod wpływem aplikacji preparatu OGA w liściach pomidora zwiększyła się ekspresja genów kodujących kinazy z rodziny MAPK (kinazy aktywowane mitogenami, ang. mitogen-activated protein kinases), które pełnią główną rolę w przekazywaniu sygnału w odpowiedzi SAR. Kinazy te ulegają aktywacji w komórce w momencie, kiedy komórka poprzez receptory w błonie komórkowej odbierze sygnał, że nastąpił atak patogenów, tym sygnałem są elicytory, czyli fragmenty ścian komórkowych, pochodzących od rośliny lub patogenu, powstałe w trakcie ataku patogenu na roślinę.

Preparat OGA według wynalazku dzięki swojej unikalnej budowie jest w stanie imitować fragmenty ścian komórkowych i aktywuje receptory błonowe, które za pomocą kinaz MAPK aktywują szlak biosyntezy kwasu salicylowego, a pośrednio reakcję odpornościową SAR. Poza genami kodującymi kinazy preparat OGA aktywował geny bezpośrednio zaangażowane w syntezę kwasu salicylowego

tj. gen *Dystrophin*, gen: *UPF0182 protein Tery* oraz gen: *WRKY DNA-binding transcription factor 70*. Preparat OGA zwiększył ekspresję czynników transkrypcyjnych *Ethylene-responsive transcription factor* zależnych od etylenu, geny te odpowiadają za przekazywanie sygnałów w komórce w trakcie stresu jakim jest zwiększona presja chorób i szkodników. Poza powyższymi genami preparat OGA zwiększył ekspresję genów odpowiedzialnych za odpowiedź rośliny na zranienie gen: *lignin-forming anionie peroxidase* oraz gen: *Linoleate 13S-lipoxygenase 3-1*, zwiększył ekspresję genów związanych z syntezą białek biorących udział w odpowiedzi odpornościowej roślin tj. *chloroplastic. Linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic, 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1B, Respiratory burst oxidase homolog protein C, Probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase JRG21, Probable aspartic proteinase GIP2, 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase A, Biotin synthase, Cationic peroxidase 1* w tym również geny kodujące składniki ścian komórkowych. Uszczelnienie ściany komórkowej jest jednym z pierwszych procesów w odpowiedzi roślin na atak patogenów.

OGA zwiększając ekspresję genów związanych z odpornością roślin zwiększa możliwości obronne rośliny przygotowując ją na stres, jakim jest atak patogenów lub szkodników. Dodatkowo preparat działa kontaktowo na szkodniki i wykazuje skuteczność w ograniczeniu chorób grzybowych. OGA z powodzeniem może być stosowany jako stymulator odporności roślin oraz naturalny środek ograniczający porażenie przez choroby i szkodniki.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania preparatu na bazie oligogalakturonidów (OGA) o stopniu polimeryzacji DP od 2 do 10 metodą enzymatyczną, **znamienny tym**, że do reaktora wyposażonego w mieszadło i system grzejny wprowadza się wodę, roztwór 40% wersenianu 4-sodowego oraz wodorotlenek sodu do uzyskania pH 12.0 mieszaniny reakcyjnej, następnie do reaktora wprowadza się pektynę owocową wybraną spośród pektyny cytrusowej lub jabłkowej, i miesza się zawartość reaktora do czasu całkowitego rozpuszczenia się pektyny, po czym dodaje się 10% roztwór kwasu cytrynowego do uzyskania pH 5.0, następnie do reaktora wprowadza się 0.1% roztwór enzymu pektynolitycznego wybrany spośród poligalakturonazy lub pektynazy, po czym zawartość mieszaniny reakcyjnej ogrzewa się do osiągnięcia temperatury 80°C, którą utrzymuje się jeszcze przez kolejne 30 minut do czasu dezaktywacji enzymu, następnie mieszaninę reakcyjną chłodzi się do temperatury poniżej 40°C i dodaje się roztwór sorbinianu potasu (1–5 kg proszku rozpuszczonego w niewielkiej ilości wody) i miesza się przez kolejne 30 minut, gotowy produkt w postaci płynnej zlewa się do pojemników lub suszy rozpyl owo albo liofilizuje w celu otrzymania produktu w postaci stałej.
2. Zastosowanie preparatu OGA o stopniu polimeryzacji DP od 2 do 10 wytworzonego według zastrzeżenia 1 w rolnictwie lub sadownictwie lub uprawie warzyw jako preparatu o działaniu biostymulującym rośliny i/lub działaniu kontaktowym na szkodniki oraz do stymulacji procesów obronnych roślin i wzmocnienia odporności roślin na atak patogenów i szkodników, zwłaszcza w uprawach warzyw, roślin sadowniczych i zbóż lub do ograniczenia porażenia przez szkodniki, przy czym patogen wybrany jest spośród *Golovinomyces orontii*, *Oidium lycopersici*, *Erysiphe betae*, *Erysiphe heraclei*, *Blumeria graminis* *Pseudoperonospora cubensis*, *Alternaria* spp., *Puccinia recondita*, *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia crealis*, a szkodnik wybrany jest spośród przędziorka, wciornastka, mszyc, mączlika, tantniś krzyżowiaczek i polyśnicy marchwianka.