



(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

213 526 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 01640

(22) A bejelentés napja: 1991. 11. 28.

(30) Elsőbbségi adatok:

90/26271.8 1990. 12. 03. GB

(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 91/02111

(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/09202

(51) Int. Cl.⁶

A 01 N 43/36

A 61 K 31/40

(40) A közzététel napja: 1994. 05. 30.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1997. 07. 28.

(72) Feltalálók:

Alphey, Thomas James William, Dundee, Skócia
(GB)

Birch, Andrew Nicholas Edmund, Dundee,
Skócia (GB)

Fellows, Linda Elizabeth, London (GB)

Robertson, Walter Morris, Perth, Skócia (GB)

(73) Szabadalmaz:

British Technology Group Ltd., London (GB)

(74) Képviselő:

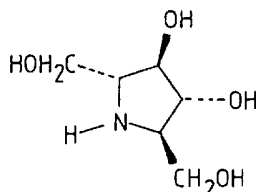
S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Eljárás élősködő fonalférgek leküzdésére pirrolidinszármazékkal**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya az (I) képletű 2(R),5(R)-bisz
(hidroxi-metil)-3(R),4(R)-dihidroxi-pirrolidin és savad-
diciós sóinak felhasználása növényeken élősködő fonál-

férgek okozta betegségek és károsodások megelőzésére
és leküzdésére a hatóanyag 0,001–3,5 g/liter koncentrá-
ciójú oldatával vagy diszperziójával végzett kezeléssel.



(I)

A találmány tárgya eljárás növények élősködő fonálférgek által okozott károsodásának leküzdésére egy pirrolidinszármazékkal.

Már az 1940-es évek elejétől kezdve számos vegyi anyagot alkalmaznak a növényeken élősködő fonálférgek ellen. Ezek a vegyszerek sok esetben nemkívánatos, toxikus mellékhatásokat mutattak, például az egyik gáz alakú növényvédő szert, a dibrom-klór-propánt 1977-ben kivonták a forgalomból, mivel a vele dolgozók körében meddőséget okozott. Az 1960-as években a gáz alakú növényvédő szereket jelentősen háttérbe szorították a granulált formában hozzáférhető, úgynevezett szisztémás hatású nematicidek; ezeket mind a mai napig alkalmazzák, és egyik jellegzetes képviselőjük például az oxamil, kémiai nevén metil-{1-(dimetil-karbamoil)-N-(metil-karbamoil)-oxi]-tioformimidát}. A leginkább használatos nematicidek oxim-karbamát típusú anyagok vagy szerves foszforsavészterek, amelyek erősen mérgező tulajdonságúak, ezért felhasználásuk csak szigorúan szabályozott és ellenőrzött körülmények között lehetséges. Az elmondottakból az következik, hogy egy olyan, a fonálférgek ellen bevezethető szer, amely a környezetet nem károsítja, vagyis sem maga, sem a bomlástermékei a célzott organizmuson kívül más élőlényekre nézve nem toxikusak, rendkívül hasznos és kívánatos lenne.

Legújabbán azt találtuk, és ez képezi a találmány alapját, hogy az (I) képletű 2(R),5(R)-bisz(hidroxi-metil)-3(R),4(R)-dihidroxi-pirrolidin (az angol nyelvű szakirodalomból átvett és a továbbiakban itt a leírásban is használat rövidítéssel: DMDP) – beleértve a savaddíciós sóit is – növényeken, beleértve a gabonaféléket is, élősködő fonálférgek károsításának a visszafordítására alkalmas szerek hatóanyagaként hasznosítható 0,001–3,5 g/liter koncentrációban.

A DMDP az élősködő fonálférgek kártételét többféleképpen, különböző mechanizmus szerint képes csökkenteni vagy kivédeni: elsősorban a közvetlen nematotoxikus, illetve nematosztatikus hatást kell említeni, de ide sorolhatjuk a táplálékfelvételt gátló hatást, amely mind a teljesen kifejlett, mind a fiatal egyedeknél jelentkezhet, a fonálférgek petéből való kikelésének, valamint a lárvafejlődésnek a gátlását, a fonálférgek táplálkozásának következményeként a gyökéren mutatókozó sebzések, valamint gubacsok létrejöttének gátlását, továbbá minden más hatást, ami megakadályozza, hogy a nematodák növényi vírusokat vegyenek fel és/vagy a vírusokat egyik növényről a másikra átvigyük.

A DMDP természetes eredetű anyag, és a eddigi vizsgálatok során a fitotoxicitását csekély mértékűnek találták.

A DMDP felfedezéséről és extrakciójáról L.E. Fellows és G.W.J. Fleet számolnak be az „Alkaloid Glycosidase Inhibitors from Plants” című közleményükben („Natural Products Isolation”, G.H. Wagman and R. Cooper, Eds., Elsevier, Amsterdam, 1988, 540–565. oldal). A beszámolóban foglalkoznak a DMDP tulajdonságaival, többek között annak rovarölő és a rovarokat elriasztó hatásával, mindkettőt kísérleti úton – melynek során a hatóanyagot a táplálékkal juttatják a szervezetbe – állapították meg. Világosabb leírást ad a DMDP ezen

tulajdonságairól L.E. Fellows egy másik munkájában [Chemistry in Britain, 842–844 (1987)], továbbá más sajátságokkal együtt ezekről is részletes áttekintést olvashatunk a „Plant Nitrogen Metabolism” (Plenum Publishing Corporation, 1989, 395–427. oldal) címmel megjelent könyv 11. fejezetében – a szerzők L.E. Fellows és munkatársai –, amely áttekintésből ki kell emelnünk a 410. oldalt, ahol S.V. Evans és munkatársai [Entomol. Exp. Appl. 37, 257–261 (1985)], a 411. oldalt, ahol a szerzők saját, továbbá W.M. Blaney és munkatársai [Entomol. Exp. Appl. 36, 209–216 (1984)] eredményeire történik utalás, valamint a 415. oldalt. Ugyancsak figyelemre méltónak tartjuk a témával kapcsolatban L.E. Fellows és munkatársai fejtegetéseit a „Swainsonine and Related Glycosidase Inhibitors” címmel az Iowa State University Press kiadó által, L. James, A.D. Elbein, R.J. Molyneux és C.D. Warren szerkesztésében, 1989-ben megjelentetett monográfia 396–416. oldalain. A fenti, a DMDP tulajdonságaival foglalkozó tudományos dolgozatokban és közleményekben sehol sem szerepel utalás arra, hogy a vegyület a fonálférgekkel szemben hatásos volna. A DMDP növényvédő szerként történő hasznosításakor – elsősorban a gabonafélék esetében – különleges előnyként jelentkezik az alkalmazás módja. Számos, a fonálférgek ellen bevezethető vegyi anyagot úgy használnak, hogy azt a talajra kihordják és rotációs kapával beledolgozzák. A DMDP ezzel szemben a levélzetre alkalmazható és valamilyen módon a növény gyökérzetén fejti ki az antinematod hatást. Feltehetőleg a DMDP a hancsrétegen keresztül változtatja a helyét, ez azonban nem biztos. Kétségtelen azonban, hogy a DMDP a levélzetre permetezve alkalmazható a fentebb említett hagyományos alkalmazási mód helyett vagy annak kiegészítéseként. Ha a talajra alkalmazzuk a DMDP-t, akkor 20 cm mélységig, hektáronként legalább 24, de legfeljebb 48 kg a megfelelő mennyiség. A DMDP azonfelül alkalmazható a vetést megelőzően a vetőmag előkezelésére is.

A DMDP vízzoldható, ezért alkalmazásakor felületaktív anyagokra vagy diszpergálószerre nincs szükség. A hatóanyag koncentrációja és mennyisége az alkalmazás módjától, valamint az elérni szándékozott hatástól függ, ugyanis nyilván különbséget kell tennünk a között, ha a nematotoxikus hatást akarjuk kihasználni, vagy az alkalmazás célja a vírusok terjedésének a megakadályozása. A levélzetre, permet formájában történő alkalmazáskor normális esetben a javasolt koncentráció 0,001 és 3,5 g/liter, előnyösen 0,01 és 1,0 g/liter között van a hatóanyagot tekintve, és az ennek megfelelő koncentrációjú oldatot olyan mennyiségben permetezzük a növényre, hogy permetlé a leveleken megfolyjon. Némely esetben az alacsonyabb koncentrációjú oldat is tökéletesen megfelelő, sőt bizonyos körülmények között előnyösebb lehet; a nagyobb koncentrációt viszont a növény legtöbbször jól elviseli.

A DMDP hatása a növényeket károsító fonálférgek csaknem minden csoportjával szemben megmutatkozik, így egyaránt találunk ezek körében gyökérgubacs-fonálférgeket, csiztaképző fonálférgeket és vírusterjesztő fonálférgeket. Különösen figyelemre méltónak találjuk, hogy a DMDP számos, a gabonaféléket károsító, például

a Meloidogyne, Globodera, Heterodera, Radopholus, Pratylenchus, Hirschmanniella, Scutellonema, Helicotylenchus, Tylenchus, Rotylenchus, Ditylenchus, Longidorus és Xiphinema nemzetséghez tartozó fonálféregfajjal szemben is hatékonyak bizonyultak.

A DMDP-t kinyerhetjük növényekből – ilyen például a Derris elliptika Benth (Leguminosae) – extrakciós úton, amint azt A. Welter és munkatársai leírták [Phytochem, 15, 747–749 (1976)], vagy előállíthatjuk szintetikus úton, D-glükózból [Fuhrman és munkatársai: Nature 307, 755–758 (1984); G.W.J. Fleet and R.W. Smith: Tetrahedron Letters 26, 1465–1468 (1985)], valamint L-szorbózból [P. Card és munkatársai: J. org. Chem. 50, 891–893 (1985)].

A fent elmondottak egyaránt vonatkoznak a DMDP savaddíciós sóira is, amely sók alatt bármely, a felhasználás céljának megfelelő só érthetünk, vagyis ha például növények kezelését akarjuk elvégezni, akkor mezőgazdaságilag elviselhető sókat alkalmazhatunk. A sók előállítása a szokásos módon, ismert eljárásokkal történhet a szabad bázisból.

Az alábbiakban a találmányt példákkal illusztráljuk. Szükségesnek tartjuk megjegyezni, hogy „Tween” egy szolubilizáló anyag márkaneve, ppm az oldat hatóanyag-tartalmát jelenti mg-ban, 1 liter vízre vonatkoztatva, akár az in vitro kísérletekhez, akár a permetezőszereként alkalmazott oldatokról van szó. DMDP itt a példákban mindig a szabad bázist jelenti.

1. példa

Vírusfelvétel és vírusátvitel kísérletes vizsgálata

Valamely vegyi anyag hatását a vírusfelvételre úgy vizsgáljuk, hogy a vírusmentes fonálférgeket vírussal fertőzött növényvel hozzuk kapcsolatba a vizsgálandó vegyszer jelenlétében. Ezt követően összehasonlítva a kezelt és kezeletlen fonálférgek közötti vírusátvitel mértékét, meghatározhatjuk az adott vegyület hatékonyságát.

Annak eldöntése, hogy a vizsgált vegyszer valóban a vírusátvitelt gátolja-e, úgy történik, hogy a hatóanyagot akkor alkalmazzuk, miután a fonálférgek a vírust felvették, időben ez egybeesik a receptornövényen a táplálékfelvétel kezdetével.

A kísérletekhez 25 cm³-es, műanyagból készült virágcserepeket használunk, amelyeket szabályozható hőmérsékletű kamrákban helyezünk el [Taylor and Brown: Nematol. medit. 2, 171–175 (1974)]. Petunia hybrida Vilm háromhetes palántái szolgálnak kísérleti növényként, a nematodafaj a Xiphinema diversicaudatum (csecsefarkú tüfonálféreg), amelynek egyedeit az Arabis mozaikvírus vektoraként vizsgáljuk.

A palántákat 22 ml, 3 : 1 tömegarányban homokból és vályogföldből kevert földbe ültetjük. 24 órával később a növényeket befertőzzük a vírussal, majd újabb 24 óra elteltével 5 kifejlett fonálférget helyezünk minden egyes cserepbe. A vírusfelvétel gátlásának vizsgálata esetén ekkor kell az egyes cserepekhez hozzáadni a vizsgálandó hatóanyagot is. Általában minden mérendő paraméterhez 10–15 párhuzamos kísérletet indítunk. Négy hét múlva a fonálférgeket az egyes cserepekből összegyűjtjük és olyan talajra helyezzük át, amelyben vírusmentes, úgyne-

vezett receptornövények fejlődnek. Ez az az időpont, amikor a vizsgálandó hatóanyagot is alkalmazni kell, ha a vírusátvitel gátlására vagyunk kíváncsiak. Újabb 4 hét elteltével végezzük el a kísérlet kiértékelését, melynek során a férgeket ismét összegyűjtjük és megszámloljuk. A receptornövény gyökerén képződött elváltozásokat ugyancsak megszámloljuk, majd a gyökérrészt szétnyomkodjuk és a levét vírus-indikátorként szolgáló Chenopodium quinoa leveleire visszük fel. 12 nappal később a Chenopodium quinoa leveleit megvizsgálva megállapítjuk, hogy mutatkoznak-e a vírusfertőzés tünetei. Itt is 10–15 párhuzamos kísérletet végzünk mindkét víruseszben a kiértékelés megbízhatósága végett. Valamennyi esetben kontrollkísérletet is végzünk, melynek során a vizsgálandó hatóanyag nélkül folytatjuk le a kísérletet.

A vizsgálatokat a DMDP 15 és 30 ppm-es koncentrációival végeztük, összehasonlítva anyagként az ismert nematotoxikus növényvédő szert, az oxamilt alkalmaztuk, ennek a koncentrációja 7 ppm volt.

Az 1a. táblázat adatai mutatják, hogy a DMDP gátolja a gyökéren látható elváltozások keletkezését, valamint csökkenti a százalékban kifejezett vírusfelvételt a kontrollhoz képest.

Az 1b. táblázat adatai a kontrollhoz viszonyítva szintén a DMDP gátló hatására utalnak, mind a gyökéren látható nyomok, mind a vírusátvitel tekintetében.

1a. Táblázat

A Xiphinema diversicaudatum táplálékfelvétele és fertőződése Arabis mozaikvírussal a hatóanyagok jelenlétében

Hatóanyag	A gyökérsebek átlagos száma gyökérenként	A vírusfelvétel %-os értéke	A párhuzamos kísérletek száma
Kontroll	1,5	33	15
DMDP 15 ppm	0,5 (66%)	27 (18%)	15
DMDP 30 ppm	0,4 (74%)	7 (79%)	14
Oxamil 7 ppm	0,3 (80%)	0 (100%)	10

A zárójelbe tett százalékos értékek a kontrollhoz képest a kezelés hatására tapasztalt csökkenést jelzik.

1b. Táblázat

A Xiphinema diversicaudatum táplálékfelvétele és Arabis mozaikvírus átvitele a hatóanyagok jelenlétében

Hatóanyag	A gyökérsebek átlagos száma gyökérenként	A vírusfelvétel %-os értéke	A párhuzamos kísérletek száma
Kontroll	1,5	64	11
DMDP 15 ppm	0,4 (74%)	72 (0%)*	10
DMDP 30 ppm	0,5 (66%)	18 (72%)	11
Oxamil 7 ppm	0,7 (53%)	1 (98%)	11

A zárójelbe tett százalékos értékek a kontrollhoz képest a kezelés hatására tapasztalt csökkenést jelzik.

*A kezelt csoportban kapott érték magasabb a kontrollkísérletben kapott értéknél.

2. példa

A petéből való kikelés vizsgálata

Ebben a kísérletben a hatóanyagoknak a *Globodera pallida* (sápadt burgonya-fonálféreg)-petéből való kikelésére gyakorolt hatását vizsgáljuk.

10 darab azonos méretű és színű *Globodera pallida* cisztát helyezünk el egy kémcsőben 0,25 ml, a vizsgálati anyagot 50 ppm, illetve 100 ppm koncentrációban tartalmazó oldattal együtt, majd hozzáadunk 0,75 ml, burgonyagyökérből nyert nedvet. A gyökérnedv normális körülmények között serkenti a lárvák kikelését a cisztában található petékből. Ennél a vizsgálatnál minden egyes kezelés hatását 4 párhuzamos kísérletben tanulmányozzuk. Hetenként kétszer a folyadékot eltávolítjuk, és megszámoljuk a kikelt élő, illetve elhalt egyedeket. Minden ilyen számbavétel után a kémcsőben a hatóanyagot, illetve a gyökérnedvet tartalmazó oldatot frissre cseréljük, a közbülső időszakokban a csöveket 19 °C-on tartjuk.

A 2a. táblázatból kiolvashatjuk a kikelt élő és elpusztult egyedek számát. 4 párhuzamos kísérlet átlagértékeit tüntettük fel a táblázatban. A hatás mértékét %-ban is kifejeztük a kontrollkísérletnél kapott értékre vonatkoztatva, ezek a számok zárójelben állnak. Az adatok világosan mutatják a cisztából kikelt egyedek számának a DMDP hatására megmutatózó jelentős csökkenését.

Ugyanezt a vizsgálatot megismételtük a *Globodera rostochiensis* (közönséges burgonya-fonálféreg) petéivel. A 2b. táblázat adatai a négyhetes kísérleti periódusban a kikelt élő egyedek arányát mutatják a kontrollcsoportnál kapott értékek százalékában kifejezve. A 2b. táblázatból azt is kiolvashatjuk, hogy a DMDP hatékonyság tekintetében felülmúlja a savaddíciós sóját.

2a. Táblázat

Globodera pallida petéből való kikelésére gyakorolt hatás

Hatóanyag	A kikelt lárvák száma		
	élő (%-os csökkenés)	elpusztult (%-os növekedés)	összes (%-os csökkenés)
15 napos kísérleti periódus:			
Kontroll	698	16	714
DMDP 50 ppm	374 (46)	68 (325)	442 (38)
DMDP 100 ppm	203 (71)	91 (468)	294 (59)
24 napos kísérleti periódus:			
Kontroll	1257	32	1289
DMDP 50 ppm	1056 (16)	112 (250)	1168 (9)
DMDP 100 ppm	601 (52)	150 (368)	751 (42)

2b. Táblázat

Globodera rostochiensis petéből való kikelésére gyakorolt hatás

Hatóanyag-koncentráció: (ppm)	220	100	50	25	12,5	6,25	3,12
DMDP	32	38	52	52	41	0	10
DMDP.HCl	0	0	0	0	27	31	21

3. példa

Toxicitási vizsgálat in vitro körülmények között

Xiphinema diversicaudatum kifejlett egyedek tízes csoportjait kézzel kiválogatva, külön-külön, desztillált vizet tartalmazó óraüvegekre helyezünk, majd adott időpontban az egyes csoportokat a vizsgálati anyagot különböző koncentrációban tartalmazó, 1–1 ml oldathoz, illetve a kontrollkísérlet esetében 1 ml desztillált vízhez adjuk. Minden egyes koncentrációt 3 párhuzamos kísérletben vizsgálunk. 48 és 72 óra múlva feljegyezzük a mozgásképtelen nematodák számát. Mozgásképtelennek azokat az egyedeket tekintjük, amelyek akkor sem végeznek mozgást, ha szőrszállal megdöfködve próbáljuk arra rábírn. A vizsgálatot minden esetben 5 °C-on végeztük.

A 3a. táblázat a DMDP különböző koncentrációjú oldatainak in vitro toxicitását mutatja, az adatokat az Abbot-képletet alkalmazva, a kontrollkísérlet során talált mozgásképtelen egyedek számának figyelembevételével korrigáltuk. Láthatjuk, hogy az in vitro toxicitás mértékét mutató mozgásképtelen egyedek aránya 200 ppm-nél, illetve attól kezdődően lecsökken. Valamelyest anomáliának látszik, hogy 25 ppm-nél ez az arány szintén nagyon alacsony.

Hasonló kísérleti elrendezésben különbséget találtunk a toxicitást illetően a kifejlett és fiatal egyedek között. A 3b. táblázatban az EC₅₀-értékeket adjuk meg, vagyis azt a koncentrációt, amelynél az összes fonálféreg 50%-a a mozgásképtelenné válik. Az EC₅₀-értéket természetesen a kísérleti adatokból számítjuk ki.

A toxicitási vizsgálatokat megismételtük oly módon, hogy *Xiphinema diversicaudatum* helyett *Globodera rostochiensis* kifejlett egyedei szolgáltak kísérleti alanyként. Az eredményeket a 3c. táblázatban közöljük, és az adatokból jól látható, miszerint mind a DMDP, mind annak savaddíciós sója toxikus hatást mutat a fonálférgekkel szemben.

3a. Táblázat

In vitro toxicitás *Xiphinema diversicaudatum* kifejlett egyedek

Hatóanyag-koncentráció: (ppm)	10	25	50	100	200	500
A mozgásképtelen egyedek %-os aránya						
DMDP 48 óra	15	5	11	35	0	0
72 óra	39	9	63	78	4	0

3b. Táblázat

In vitro toxicitás EC_{50} -értékben (ppm) kifejezve
(*Xiphinema diversicaudatum*)

Hatóanyag	A vizsgált nematoda fejlettségi stádiuma	Kísérleti időtartam	
		48 óra	72 óra
DMDP	Kifejlett	87,0	44,0
DMDP	Fiatal	94,0	0,08

3c. Táblázat

In vitro toxicitás *Globodera rostochiensis* kifejlett egyedein

Hatóanyag-koncentráció: (ppm)	2,5	10	25	50	100
DMDP	25	37	44	50	37
DMDP.HCl	88	56	50	50	50

4. példa

A 4. példához tartozó táblázatokban három különböző vizsgálat során kapott adatokat találunk, amelyek a DMDP dózisfüggő hatékonyságát bizonyítják. A három vizsgálati módszer az úgynevezett osztott-cserepes kísérlet, a kiscserepes vizsgálat és a gyökérgubacs-teszt.

a) Osztott-cserepes kísérlet

Ezzel a vizsgálattal megállapíthatjuk, hogy a találmány szerinti, kísérleti nematodaellenes szernek van-e a férgek elriasztó, közhasználatú idegen szóval repellens, illetve azok táplálékfelvételét gátló és/vagy nematocid hatása.

Az osztott-cserepes kísérlethez egy finom hálószerű anyaggal [lásd Alphey és munkatársai: *Revue Nematol.* 11, 399–404 (1988)] két részre osztott virágcserepeket használunk. A cserép mindkét oldalát feltöltjük 37 ml, 3 : 1 arányban homokból és vályogföldből kevert földdel, az egyik részbe *Petunia* palántát ültetünk, és a cserépnek ebben a beültetett részében a földet a vizsgálati anyag különböző, a 4a. táblázatban megadott koncentrációjú oldataival kezeljük, a cserép másik, beültetetlen részébe pedig a *Xiphinema diversicaudatum* nevű fonálféregfaj 100 darab kifejlett egyedét helyezzük el. Minden egyes koncentrációhoz 8 párhuzamos kísérletet indítunk.

21 nappal később a cserép két felét külön-külön kiemeljük, és a férgek a földtől elkülönítjük. A kezelt oldalon megvizsgáljuk a növény gyökérzetét, és számba vesszük a szemmel látható elváltozásokat. Az így kapott értékeket a 4a. (i) táblázatból olvashatjuk ki. Az élő és elhalt férgek mindkét oldalon külön-külön megszámoljuk, ezek az adatok a 4a. (ii) táblázatban találhatók.

A 4a. (i) táblázat adatai azt mutatják, hogy a DMDP a vizsgált valamennyi koncentrációban gátolta a nematodák táplálékfelvételét. A 4a. (ii) táblázatban közölt eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy 80 ppm koncentrációban a DMDP-nek nematotoxikus hatása is

van, ugyanis a beültetett oldalon több mozgásképtelen férget számolhattunk össze, mint az azonos kísérleti elrendezésben vizsgált oxamil esetében.

5 b) Kiscserepes vizsgálat

Ezzel a vizsgálattal a talajra alkalmazott vegyszerek a nematocid hatását, valamint a fonálféreg táplálékfelvételére gyakorolt hatását állapíthatjuk meg.

22 ml, 3 : 1 tömegarányban homokból és vályogföldből kevert földbe *Petunia* palántákat ültetünk, és a beültetett virágcserepekben a földet a vizsgálandó hatóanyag oldatával, illetve a kontrollkísérlet esetében vízzel kezeljük, miközben egyidejűleg *Xiphinema diversicaudatum* 5 vagy 10 kifejlett példányát is elhelyezzük a cserépben. Minden vizsgálandó hatóanyaghoz, illetve koncentrációhoz 10–10 párhuzamos kísérletet indítunk. 3 hét elteltével a férgeket kiszedjük a földből, és megállapítjuk a gyökereken található sérülések számát, amelyeket táplálkozás közben a férgek a szájszuronyukkal ejtettek. Ezeket az értékeket átlagoljuk, és az eredményt a kontrollértékekre vonatkoztatva a csökkenés mértékét kifejező %-ban adjuk meg.

A 4b. táblázatban összefoglaltuk az így kapott adatokat, amelyek a DMDP-nek a nematodákat elriasztó, illetve azok táplálékfelvételét gátló hatását bizonyítják.

c) Gyökérgubacs-teszt

Ebben a vizsgálatban a kísérleti növény a paradicsom, amelynek palántáiról a főgyökeret eltávolítjuk, ezáltal arra készítetve a növényt, hogy apró oldalgyökereket növelessen. A palántákat 25 g finomszemcsés, szitált és megszárított homokot, valamint a *Meloidogyne incognita* (J2) (kertészeti gubacs-fonálféreg) faj 350 egyedét és a DMDP vizes oldatát tartalmazó csövekbe ültetjük. A DMDP-nek a fonálféreg gubacsképző képességére gyakorolt hatását 10–12 napos kísérleti periódusban vizsgáljuk. Kontrollként ugyanilyen módon készítjük elő a kísérletet, de hatóanyagot nem tartalmazó vízzel kezeljük a talajt. Minden vizsgálandó paraméterhez 10 párhuzamos kísérletet indítunk.

A kísérleti eredményeket a 4c. táblázatban láthatjuk, és ebből megállapítható, hogy a DMDP a 2,5 és 25 ppm közötti koncentrációtartományban azonos aktivitást mutatott, kevésbé hatékonyak nálunk viszont az 50 és 250 ppm közötti koncentrációértékeket. A DMDP 2,5 és 100 ppm közötti koncentrációira vonatkozóan a különböző vizsgálatok során hasonló aktivitásszinteket találtunk.

4. táblázat

4a. (i) Osztott-cserepes kísérlet (*Xiphinema diversicaudatum*-*Petunia*)

Hatóanyag/koncentráció (ppm)	A gyökérsebek átlagos számának csökkentése a kontroll %-ában
DMDP/15	63
DMDP/30	83
DMDP/80	89

4a.(ii) A kettéosztott cserép beültetett és beültetetlen részéből összegyűjtött fonálféreg átlagos száma 21 nap után (*Xiphinema diversicaudatum*–*Petunia*)

Hatóanyag	koncentráció (ppm)	Összes fonálféreg		Mozgó fonálféreg		Mozgás-képtelen fonálféreg	
		Beültetett	Beültetett	Beültetett	Beültetett	Beültetett	Beültetett
DMDP	16	27	15	24	10	3	5
DMDP	32	24	14	21	11	3	3
DMDP	80	25	15	12	11	13	4
Oxamil	15	17	21	13	14	4	7
Kontroll	–	33	16	31	12	2	4

4b. Kiscserepes vizsgálat (*Xiphinema diversicaudatum*–*Petunia*)

Hatóanyag/koncentráció	A gyökérsebek átlagos számának csökkenése a kontroll %-ában	
	5 fonálféreg/cserép	10 fonálféreg/cserép
DMDP/8	70	–
DMDP/14	70	–
DMDP/25	94	72
DMDP/50	72	83
DMDP/100	65	100

4c. Gyökérgubacs-teszt (*Meloidogyne incognita*–*paradicsom*)

Hatóanyag/koncentráció (ppm)	A gyökérgubacsok számának csökkenése a kontroll százalékában
DMDP/2,5	76
DMDP/12,5	70
DMDP/25	72
DMDP/50	50
DMDP/240	47

5. példa

Alkalmazási módok

a) A gyökérzetre történő alkalmazás

Annak eldöntésére, hogy a vizsgálandó nematodaellenes hatóanyag hatékonyabbnak mutatkozik-e, ha az egész növénybe felszívódva, azaz szisztémásan fejti ki hatását, a kiscserepes vizsgálatot adaptáltuk. A kísérleti növényként szolgáló *Petunia hybrida* kiválasztott példányainak a gyökérzetét eltávolítjuk, és a törzs levágott részét, ahol az újonnan kifejlődő gyökerek növekedésnek indulnak, a kísérlet kezdete előtt 24 órával a vizsgálandó hatóanyagnak az 5. táblázatban megadott koncentrációjú oldataiba helyezzük. Ezeknek az így ke-

zelt növényeknek a *Xiphinema diversicaudatum* fonálféregfajjal szemben megmutató hatását összehasonlítjuk olyan növényekével, amelyek levágott végét 24 órára előzőleg vízbe merítettük. Az 5. táblázatban látható adatok azt mutatják, hogy a talajra alkalmazott DMDP a gyökérzeten keresztül felszívódva is kifejti a hatását, tehát ennél a hatóanyagnál ez az alkalmazási mód megfelelő.

b) A levélzetre történő alkalmazás

A 4. példában leírt kiscserepes vizsgálatot és a gyökérgubacs-tesztet megismételtük oly módon, hogy a vizsgálandó hatóanyaggal bekentük a növény, utóbbi esetben a paradicsompalánták leveleit. A kísérletben a levélzet kezelésére a hatóanyag 0,4 ml, 200 ppm koncentrációjú vizes oldatát használtuk – a kontrollkísérletben csak vizet –, amelyhez 0,05 tömeg%-os „Tween 80” nedvesítőszer-oldatot is adtunk.

A gyökérsebek 86%-os csökkenése a kiscserepes vizsgálatban, valamint a gubacsképződés 79%-os csökkenése a gyökérgubacs-tesztben a kontrollhoz képest kétségtelenül azt bizonyítja, hogy a hatás a gyökérzeten jelentkezik, és a vizsgált hatóanyag ilyen módon is védelmet nyújt a nematodák ellen.

5. táblázat

A gyökérzeten keresztül felszívódott hatóanyag aktivitása kiscserepes vizsgálatban (a részleteket lásd a szövegben; *Xiphinema diversicaudatum* – *Petunia*; 21 nap)

Hatóanyag/koncentráció (ppm)	A gyökérsebek átlagos számának csökkentése a kontroll %-ában
Oxamil/50	92
DMDP/15	83
DMDP/30	100
DMDP/100	58

6. példa

Fitotoxicitási adatok

A DMDP fitotoxicitását 200 ppm koncentrációban, 14 napos kísérleti időtartammal, a kiscserepes vizsgálatnál leírt módszerrel határoztuk meg három különböző növényfajon. A palántákat a kezelést követően 16 napon át hagytuk fejlődni, és a növekedés mértékét – egyaránt mértük a hajtás és a gyökér hosszát – a kontrollnövényre vonatkoztatva %-ban adtuk meg.

A 6. táblázatban található adatok a DMDP-nek a növények növekedésére kifejtett hatását mutatják. A számok a kontrollra vonatkoztatott %-ot jelentenek, vagyis 100% ugyanolyan mértékű növekedést fejez ki, mint amelyet a kontrollnövényenél tapasztaltunk, a 100%-nál nagyobb értékek pedig a kontrollt meghaladó növekedésre utalnak.

A rozs a DMDP-vel kezelve a kontrollhoz képest csupán 65%-os növekedést mutatott, ennek az adatnak azonban nem szabad túlzott jelentőséget tulajdonítani,

mivel az itt alkalmazott koncentráció (200 ppm) kétszerese a DMDP nematodák ellen hatékony dózisának.

6. táblázat
Toxicitási adatok
(200 ppm; talajra alkalmazva; vizes oldat)

Hatóanyag	Gyökérhossz			Hajtáshossz			Teljes tömeg		
	PAR	OR	RO	PAR	OR	RO	PAR	OR	RO
Oxamil	107	84	108	91	95	93	103	104	107
DMDP	90	98	105	90	97	74	100	100	65

A növények: PAR = paradicsom (fajtaváltozat: Moneymaker)
OR = olajrepece (fajtaváltozat: Bienvenue)
RO = rozs (fajtaváltozat: Melle)

7. példa

Fémdobozos vizsgálat

Kicsi, 60 ml-es, tiszta fémdobozokba mintegy 25 g termőföldet töltünk, majd ehhez hozzáadunk 1 ml, a vizsgálandó hatóanyagot tartalmazó oldatot, valamint 1 ml vizet, amely a burgonya-fonálféreg petéit tartalmazza, összesen 1500 darabot. A komposzt tetejére ezenkívül kicsíráztatott burgonya (Desiree fajta) apróra vágott darabjait helyezük, majd a dobozokat 3–4 helyen átlukasztott fedéllel lezárjuk. Ezt követően a fémdobozokat tálcára rakjuk, fekete polietilén fóliával letakarjuk és állandó hőmérsékletű térben, 20 °C-on tároljuk. 4 hét elteltével számoljuk meg első ízben a cisztákat, majd ettől kezdve hetenként, egészen a nyolcadik hét végéig. A 7. táblázat a ciszták számában tapasztalt csökkenést mutatja a kontrollkísérletben kapott értékekre vonatkoztatott %-ban kifejezve. Az eredmények azt igazolják, hogy a DMDP hatékonyan gátolja a cisztaképződést.

7. táblázat

Fémdobozos vizsgálat *Globodera rostochiensis*

Hatóanyag-koncentráció: (ppm)	A ciszták számának %-os csökkenése						
	3,12	6,26	12,5	25	50	100	200
DMDP	7	0	14	46	43	35	7
DMDP.HCl	0	0	0	7	7	43	0

8. példa

Alkalmazási módok II.

Az 5. példában leírt vizsgálatok kiterjesztéseképpen további kísérleteket végeztünk különböző növényekkel és fonálféreggel, homokban és termőföldben, hogy ezáltal a DMDP különböző alkalmazási módozataira példát szolgáltassunk.

8(1). Talajkezelés hatása kémcsőben, homokba ültetett növényeknél

2,5×7,5 cm méretű kémcsöveket megtöltünk 24,5 g szitált és szárított homokkal. 4 ml különlegesen tisztított víz hozzáadása után a homokba lyukat mélyítünk, majd

közvetlenül a paradicsompalánták beültetése előtt 1 ml, a vizsgálandó hatóanyagokat tartalmazó oldatot, valamint 1 ml, a *Meloidogyne javanica* (melegővi gubacs-fonálféreg) faj 350 egyedét tartalmazó vizet adunk minden egyes csőhöz. Ezt követően a csöveket 14 napra félretesszük. Ebben a kísérletben, és az ezután következő, a 8(2) pont alatt leírtakban is, a palántákat a beültetéshez úgy készítjük elő, hogy a gyökereket levágjuk, és hagyjuk, hogy növény apró oldalgyökereket növelessen. A 8(1). táblázat a DMDP és hidrokloridja hatását mutatja különböző koncentrációjú oldatokkal végzett kísérletekben. Az adatok a hatóanyag nélkül lefolytatott kontrollkísérlethez viszonyítva az élő nematodák számának %-os csökkenését mutatják.

8(2). Levélkezelés hatása kémcsőben, homokba ültetett növényeknél

Három darab 7,5×2,5 cm méretű üvegcsövet megtöltünk 24,5 g szitált és szárított homokkal, és 5 ml különlegesen tisztított víz hozzáadása után egy-egy paradicsompalántát ültetünk a csövekbe. A növény szára körül nemáteresztő vattát helyezünk el, miáltal megakadályozzuk, hogy a hatóanyagpermet a homokra kerüljön, majd a csöveket éjszakára inkubátorba helyezzük. Másnap minden egyes növényt egy festékszóró segítségével 0,1 ml, a vizsgálandó hatóanyagot tartalmazó oldattal bepermetezünk, majd a csöveket visszahelyezzük az inkubátorba. A rá következő napon a csövekhez 1 ml, a *Meloidogyne javanica* fonálféregfaj 350 egyedét tartalmazó vizet töltünk, azután 14 napra félretesszük az összes csövet. A 8(2). táblázatban a DMDP és hidrokloridjának különböző növényekre gyakorolt hatását mutatjuk be. Az adatok a 8(1). táblázathoz hasonlóan, %-ban kifejezett értékek.

8(3). Levélkezelés hatása termőföldbe ültetett növényeknél

2,5 cm-es virágcserepeket megtöltünk 75 g, Levington univerzális kertiföld és homok 3 : 1 tömegarányú keverékével, a cserepekbe 34 napos paradicsompalántákat ültetünk és mindegyikhez 1 ml vizet adunk. A földet szűrőpapírral letakarva védjük, majd a cserepeket éjszakára üvegházba helyezzük. Másnap a szűrőpapírt eltávolítjuk, és 1 ml, a *Meloidogyne javanica* vagy *Meloidogyne incognita* fajok 350 egyedét tartalmazó vizet adunk egy-egy cseréphez, azután az összesen 12 napra félretesszük, majd ennek elteltével megszámláljuk az élő és elpusztult férgeket. A 8(3). táblázat a DMDP hatását mutatja a *Meloidogyne javanica* (a) és *Meloidogyne incognita* (b) fonálféregfajokkal szemben.

8(4). Talajkezelés hatása termőföldbe ültetett növényeknél

A 8(3). pont alatt leírtakat megismételjük annyi változtatással, hogy az első napon 1 ml, a vizsgálandó hatóanyagot tartalmazó oldatot és 1 ml, a fonálférgeket tartalmazó vizet viszünk a beültetett cserepek földjére, majd ezt követően 14 napra félretesszük a cserepeket. Az eredményeket a szokott módon a 8(4). táblázatban foglaltuk össze.

8(1). táblázat

Hatóanyag-koncentráció: (ppm)	A Meloidogyne javanica okozta gubacsok számának csökkenése %-ban						
	200	100	50	25	10	5	1
DMDP.HCl		47	51	30	18	43	13
DMDP (1. kísérlet)	77		72		79		76
DMDP (2. kísérlet)	56	57	53	56	68	63	71

5

10

8(2). táblázat

Növény	Hatóanyag-koncentráció: (ppm)	A Meloidogyne javanica okozta gubacsok számának csökkenése %-ban				
		3200	2400	1600	800	400
Paradicsom	DMDP			59	0	9
	DMDP.HCl			18	5	9
Paprika	DMDP	7	7	30	0	
	DMDP.HCl	9	0	7	0	
Padlizsán	DMDP	38	43	34	9	
	DMDP.HCl	44	50	19	19	

8(3). táblázat

Hatóanyag-koncentráció: (ppm)		Levélkezelés hatása: a Meloidogyne javanica (a) és a Meloidogyne incognita (b) okozta gubacsok számának csökkenése %-ban										
		1600	1000	800	400	200	100	50	25	10	1	0,1
a)	DMDP	27	–	27	22	22	–	–	–	–	–	–
a)	DMDP	–	–	–	35	28	22	39	34	–	–	–
b)	DMDP	–	24	–	–	–	24	–	–	26	30	31
b)	DMDP	–	–	–	–	–	–	–	–	23	22	–

8(4). táblázat

Hatóanyag-koncentráció: (ppm)	Levélkezelés hatása: a Meloidogyne javanica (a) és a Meloidogyne incognita (b) okozta gubacsok számának csökkenése %-ban						
	100	50	20	10	1,0	0,1	0,01
DMDP	28	19	21	–	–	–	–
DMDP	28	–	–	30	29	20	8

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Ejárás növényeken élősködő fonalférgek okozta károsítás elleni védelmére, *azzal jellemezve*, hogy a növényeket vagy magvaikat és/vagy a növények életterét 0,001–3,5 g/liter (I) képletű 2(R),5(R)-bisz(hidroxi-metil)-3(R),4(R)-dihidroxi-pirrolidint (DMDP) vagy savaddíciós sóját tartalmazó oldattal vagy diszperzióval kezeljük.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az oldatot vagy diszperziót a növényekre vagy az ültetvényre permetezzük.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*,

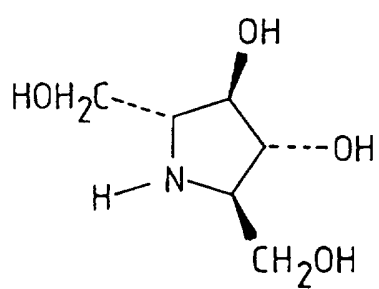
hogy az oldatot vagy diszperziót a talajon keresztül juttatjuk a növényekhez.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Meloidogyne, Globodera vagy Xiphinem nemzetséghez tartozó fonalférgek elleni kezelést végzünk.

5. Az 1. vagy 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a védekezést a növények magvainak kezelésével, bevonásával vagy átitatásával valósítjuk meg.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy levélkezelést végzünk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy talajkezelést végzünk.



(1)