

(19)



(10) **LT IP113 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

- (21) Paraiškos numeris: **IP113** (51) Int. Cl. (2006): **C12P 17/18**
A01N 43/90
(22) Paraiškos padavimo data: **1992 07 17** **A01N 53/00**
A01N 65/00
(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 07 15** **C07D 493/00**
(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
(30) Prioritetas: **9101266, 1991 07 18, NL**
(71) Pareiškėjas:
B.V. CHEMISCHE PHARMACEUTISCHE INDUSTRIE „LUXAN“, Industrieweg 2,
6662 PA Elst, NL
(72) Išradėjas:
Johan Gerard MULDER, NL
Pieter DIEPENHORST, NL
Pieter PLIEGER, NL
Ingrid Elisabeth Maria BRUGGEMANN-ROTGANS, NL
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Marija LENKUTIENĖ, Patentinių paslaugų centras, UAB, J. Basanavičiaus g.
11/1, LT-03108 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Perėjimo agentas bulvių cistų nematodui
(57) Referatas:
—

PERĖJIMO AGENTAS BULVIŲ CISTŲ NEMATODUI

Šis išradimas susijęs su bulvių cistų nematodų perėjimo agentu, jo gavimo būdu, ir panaudojimu kovai su bulvių liga.

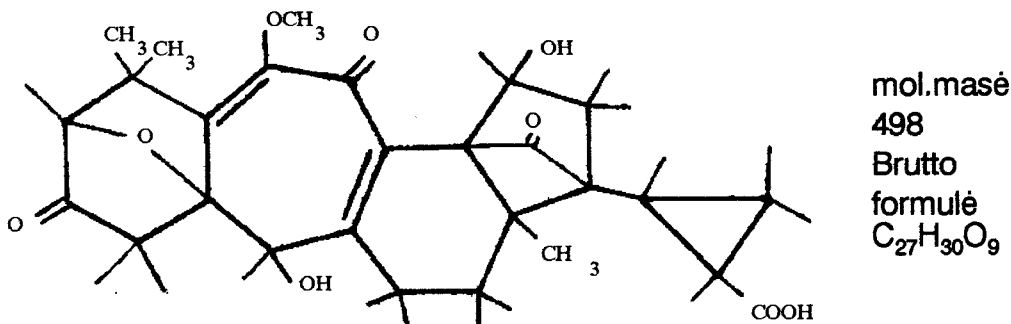
Yra žinomi keli būdai, kaip apsaugoti bulves nuo cistų nematodų: tai intensyvi sėjomaina, ūkio higienos priemonių panaudojimas ir dirvos dezinfekcija. Iš šitų priemonių dirvos dezinfekcija kol kas yra vienintelė ir plačiausiai taikoma. Šiam tikslui naudojami dezinfekatoriai 1,3-dichloropropenas ir metam natriis (žiūr. žurnalas "Nematologica", 31, Nr.2 (1985) p. 159-170).

Tačiau, dėl didelių naudojamų dezinfektorių kiekių, bei jų cheminių, fizikinių ir toksikologinių savybių, naudojimas ribojamas, nes kelia grėsmę aplinkai.

Yra žinoma medžiaga, išskirta iš **Solanaceae** augalų šaknų ląstelių, galinti stimuliuoti bulvių cistų nematodų kiaušinėlių perėjimą, ir šios medžiagos gamybos būdas (žiūr. Europos patentas, Nr.434417).

Šio išradimo tikslas-pateikti bulvių cistų nematodo perėjimo agentą.

Tikslas pasiekiamas tuo, kad išskirtas perėjimo agentas, kurio struktūrinė formulė:



ir jo esterių ir druskų dariniai, iššaukia **Globodera rostochiensis** ir **Globodera pallida** cistų nematodų perėjimą.

Perėjimo agentas išskiriamas iš hidrokultūros arba bulvinių šeimos (**Solanaceae**) augalų dalių, audinių arba ląstelinės kultūros masės, esant tinkamam maitinimo šaltiniui. Perėjimo agentas gali būti išskirtas ir iš recirkuliuojančio maitinamo vandens substrato kultūrose. Gautas tirpalas kultivavimo būdu yra gryninamas.

Kovos su nematodų, sukeliančių bulvių ligą, rūšimis ir patotipais būdas, naudojamas purškiant lauką prieš užsodinant bulvėmis. Purškiama vandeniniu tirpalu, kartu su dirvos dezinfekatoriais, tokiais kaip 1,3-dichloropropenas ir metam natriis.

Perėjimo agentas, tai junginys, kurio sisteminė formulė yra: trans-2-(2,13-dihidroksi - 9-metoksi-7,7,16-trimetil-5,10,20-triokso-19-oksaheksaciklo[9.7.0.1^{3,6}.0^{3,8}1^{2,15}.0^{12,16}]-eikosa-1(11), 8-dien-15-il) ciklopropankarboninė rūgštis, ir jo esterių ir druskų dariniai.

Perėjimo agentas pagal šį išradimą gali būti išskirtas iš hidrokultūros arba bulvinių šeimos (**Solanaceae**) augalų dalių audinio arba ląstelinės kultūros, būtent iš bulvių arba pomidorų šaknų, esant tinkamam maitinimo šaltiniui. Perėjimo agentą taip pat galima gauti iš recirkuliuojančio **Solanaceae** šeimos narių substrato kultūros maitinimo vandens, daugiausia iš pomidorų.

Naudojant tinkamą kultūros terpę, perėjimo agento tirpalas gaunamas iš ląstelinės suspensijos. Pradinis produktas gali būti ląstelinis eksudatas, bet taip pat galima naudoti pačių ląstelių ekstraktą arba homogenatą. Ląstelės yra imamos, pavyzdžiui iš bulvinių šeimos tinkamų narių audinių, sugebančių perinti norimus nematodus. Ypač svarbios auginamos **Solanum tuberosum L** rūšys, pavyzdžiui, **Mentor** rūšis. Galima naudoti ląsteles kaip tokias, arba genetiškai modifikuotas, pavyzdžiui, ląsteles, į kurias yra įvesta specifinė genetinė informacija, naudojant **Agrobacterium tumefaciens**. Taip pat galima naudoti daigų kultūras arba šakniavaisines kultūras vietoj ląstelių suspensinės kultūros.

Maitinimo terpė, tinkama perėjimo agento gavimui iš ląstelinės suspensijos, paprastai susideda iš:

- pagrindinių komponentų (druska, sporų elementai),
- karbohidratų šaltinio (dažnai cukrozė, bet taip pat galima naudoti vieną ar daugiau kitų karbohidratų),
- vitaminų (prekyboje vitaminų paketai yra gaunami standartinės sudėties ir tokie gali būti naudojami),
- hormonų (dažnai naudojama kombinacija: citokininas/ auksinai su giberelike rūgštimi ir abscisine rūgštimi arba be jų, tačiau sudėtis ir koncentracija gali būti keičiama priklausomai nuo ląstelių tipo).

Galima substrato komponentų kombinacija susideda iš:

1. Pagrindinių komponentų + vitaminų (pagal Murschige ir Skoog "Physiol. Plant" 15, 473-497 (1962)).

2. Karbohidratų šaltinio,
- cukrozės tirpalas - 30 g/l.

3. Hormonų:

- genetiškai nemodifikuotų ląstelių suspensinės kultūros atveju galima pridėti 5 mg/l naftilacetinės rūgšties,
- genetiškai nemodifikuotų šakniavaisių kultūrų atveju galima pridėti 0,2 mg/l giberelikinės rūgšties ir 0,05 mg/l naftilacetinės rūgšties,
- kultūrų, kurių pagrindas yra genetiškai transformuotos ląstelės (ląstelių suspensija, šakniavaisių arba daigų kultūros) atveju, ne visada reikia hormonų.

Aukščiau pateikti substrato komponentai yra tik komponentų pavyzdžiai, kurie gali būti naudojami. Šios srities darbuotojai gali sukurti kitas substrato komponentų kombinacijas ir sudėtis, kurių pagalba būtų galima sėkmingai gaminti perėjimo agentą bendrų darbo žinių pagrindu.

Priklausomai nuo kultūros prigimties, perėjimo agento išskyrimo iš ląstelių ir ekstraląstelių terpių būdas gali susidėti iš tokių stadijų:

- visos ląstelių masės homogenizacija,
- ekstrakcija arba nusodinimas, siekiant pašalinti baltymus ir ląstelių liekanas,
- jeigu reikalinga, skystos fazės, turinčios perėjimo agentą, filtravimas ir praskiedimas arba jos koncentravimas iki norimos koncentracijos,
- skystos fazės gryninimas, naudojant preparatyvinės chromatografijos gryninimo metodą.

Chromatografiniai gryninimo metodai, siekiant išskirti perėjimo agentą, gali būti paremti viena ar daugiau perėjimo agento savybių:

- tirpumas metanolyje,
- pasiskirstymo koeficiento skirtumai tarp vandens/metanolio ir vandens/chloroformo sistemų,
- krūvis preparatyvinėje-analitinėje chromatografijoje, naudojant sefarozę,
- grįžtamos fazės hidrofobiškumas chromatografijoje,
- krūvio/hidrofobiškumo santykis jonų pašalinimo chromatografijoje.

Perėjimo agentas yra nelakus junginys, kuris gerai tirpsta vandenyje, metanolyje, dietileteryje, etilacetate ir panašiuose poliniuose tirpikliuose, bet netirpūs heksane, dichlormetane, chloroforme ir panašiuose.

Dėka jo mažo lakumo, tirpalai, turintys agentą, gali būti efektyviai koncentruojami, panaudojant vakuuminės technikos priemones, tokias, kaip rotacinis garintuvas, ir/arba džiovinimą šaltyje.

Perėjimo agentas yra nestabilus prie pH mažiau už 2 ir daugiau už 7 ir temperatūroje, aukštesnėje už 35° C.

Perėjimo agentas pagal šį išradimą gali būti gaunamas ir naudojamas grynas, t.y. 99% grynumo pagal svorį. Tačiau naudojimui tai nėra būtina. Jis gali būti naudojamas ir dalinai išgrynintas, pvz. gaunamas eliuojant adsorbentą, ant kurio perėjimo agentas buvo adsorbuotas. Tai ypač naudinga tuo atveju, kai perėjimo

agentas yra gaunamas iš maitinančio recirkuliuojančio vandens auginant pomidorus ant substrato šiltnamiuose. Gamyboje naudojamas maitinantis vanduo, kuris recirkuliuoja šiltnamiuose ir, jeigu reikia, papildomas šviežiu vandeniu. Jis turi pakankamą kiekį perėjimo agento. Eliuojant perėjimo agentą, gaunamas koncentruotas perėjimo agentas vandeniniame tirpale, kuris yra kaip nešėjas.

Perėjimo agentas gali būti naudojamas rūgštinėje formoje, kaip druska, pvz. natrio arba kalio druska, kaip esteris su atitinkamu junginiu arba kaip darinys.

Perėjimo agentas gali būti įterptas į dirvą vienas arba su tinkamu nešėju, tokiu kaip vanduo arba vandeninis tirpalas. Taip pat gali būti naudojamas kietas nešėjas.

Norint gauti agento prailgintą veikimą, naudojamos kontroliuojamos išlaisvinančios formos.

Išgrynintas arba dalinai išgrynintas perėjimo agentas yra aktyvus vandeniniuose tirpaluose arba kietoje būsenoje, koncentracijų ribose nuo 0,01 iki 1000 mg/kg dirvožemio, su optimalia riba nuo 1 iki 100 mg/kg dirvožemio.

Siekiant gauti geresnių rezultatų, tirpalas arba kieta medžiaga turėtų būti įterpti arba įpurkšti į dirvožemį, geriausiai į 10-20 cm gylį. Pelkėtuose dirvožemiuose daugiau išperinama lervų negu kituose dirvožemiuose, ir taip pat žymiai daugiau negu savaiminio perėjimo metu.

Buvo nustatyta, kad perėjimo agento aktyvumas gali būti žymiai sustiprintas, panaudojant jį rūgščioje kompozicijoje, pvz. kartu su askorbinine rūgštimi.

Perėjimo agento aktyvumas nustatomas lervų išperėjimo iš kiaušinėlių lyginimu.

Šiam tikslui, cistos nuvalomos nuo šaknų fragmentų ir/arba nešvarumų ir išsijojamos per 0,5 mm ir 0,25 mm sietus. Atsveriami 32 mg frakcijos 0,5 ir 22,5 mg 0,25-0,5 frakcijos. Kartu tai sudaro apie 1200 cistų. Kieta tirinama medžiaga ištirpinama vandentiekio vandenyje iki koncentracijos lygios 125 mg/l pagal pradinę medžiagą. Iš šio bazinio tirpalo padaromi 10-kartiniai ir 100-kartiniai praskiedimai.

Kiaušinėlių suspensija supilama į 70 ml vandentiekio vandens, perpilama į matuojamąjį cilindrą, ir prapučiama oru (akvariumo pompos pagalba).

5 ml perėjimo agento tirpalo ir 0,5 ml kiaušinėlių suspensijos sulašinama pipete į polistirolo mėgintuvėlius ir po to izoliuojama nuo oro. Kontrolei 0,5 ml kiaušinėlių suspensijos sulašinama pipete į 5 ml vandentiekio vandens. Po to mėgintuvėliai paliekami suktis prie 20° C.

Kiaušinėliai ir nematodų kirminai yra suskaičiuojami prie $t=0$. Po to, kirminai yra skaičiuojami prie $t=4^{\circ}$, 5 ir/arba 6 dienas. Šiam tikslui mėgintuvėlis pirmiausia yra

stipriai purtomas vidutiniškai 4 sekundes ir po to su Vortex maišytuvu- kitas 10 sekundžių. Kai suspensija nusistovi, pipete paimama 0,5 ml, 1 cm žemiau skysčio paviršiaus lygio. Šis pavyzdys patalpinamas į skaičiavimo indą ir praskiedžiamas šviežiu vandentiekio vandeniu, kad vandens sluoksnis padengtų visą dugną. Kiaušinėliai ir kirmėlės skaičiuojamos per mikroskopą.

Skaičiavimai atliekami taip:

Absoliutus aktyvumas:

$$A_n = \left(\frac{\text{kirmėlės}_{t=\overline{t}} - \text{kirmėlės}_{t=0}}{\text{kiaušinėliai}_{t=0}} \right) \times 100 \%$$

A_n - tiriamojo pavyzdžio aktyvumas.

Laisvų kiaušinėlių reakcija, esant perėjimo agentui, gali būti aprašyta, panaudojant Monod kinetiką mikroorganizmų auginimui su nekonkuruojančiu substratu.

Pavyzdys

Apie 700 bulvių augalų (Mentor rūšies) buvo išaugintos hidrokultūrose, naudojant recirkuliuojantį maitinantį tirpalą, turintį kalio nitrato, kalcio nitrato, kalio dihidrofosfato, amonio sulfato, magnio sulfato, geležies (II) sulfato, mangano (II) sulfato, cinko sulfato, vario (II) sulfato ir natrio borato. Fosfatai ir nitratai maitinančiame tirpale yra matuojami ir, jeigu reikia, reguliuojami. Ph yra palaikomas mažesnis negu 4,2, pridedant 6% azoto rūgšties ir 4,25% fosforo rūgšties, jeigu reikia.

Praleidžiant recirkuliuojantį maitinantį tirpalą per kolonėlę, turinčią Amberlite XAD-2, perėjimo agentas buvo absorbuojamas kolonėlėje.

Keičiant maitinamąjį tirpalą, XAD-2 kolonėlė yra nuimama ir praplaunama distiliuotu vandeniu, pakol laidumas yra mažesnis negu 7×10^{-6} S. Absorbuota medžiaga yra desorbuojama iš XAD-2, sėkmingai etiliuojant 60% metanolio-vandens mišiniu ir metanoliumi. Eliuatas koncentruojamas ir džiovinamas rotacinio vakuuminio garintuvo ir šaldomojo džiovintuvo pagalba.

Šis perėjimo agento preparatas gryninamas remiantis:

- tirpumo skirtumais metanolyje ir vandenyje,
- pasiskirstymo koeficientu priešpriešinių srovių ekstrakcijoje,
- krūviu preparatyvinėje/analitinėje chromatografijoje, naudojant sefarozę,
- hidrofobiškumu grįžtamos fazės chromatografijoje,
- krūvio/hidrofobiškumo santykiu jonų pašalinimo chromatografijoje.

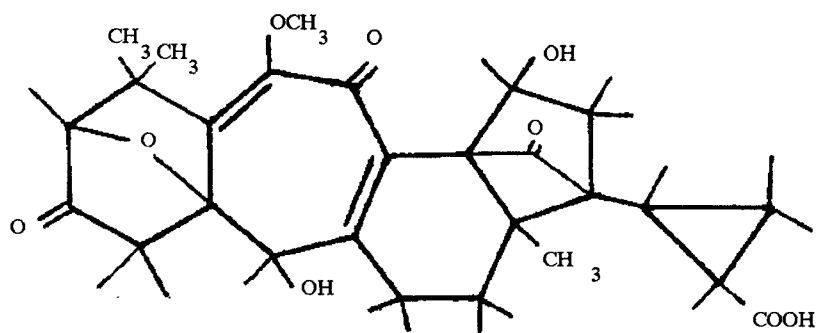
Šiam tikslui preparatas ištirpinamas metanolyje ir purtomas, kol gaunamas homogeninis mišinys. Nucentrifugavus, skaidrus paviršius šalinamas pipete, koncentruojamas, ir džiovinamas rotacinio vakuuminio garintuvo ir šaldomojo džiovinimo pagalba.

Droplet Priešpriešinių Srovių Chromatografas (DCCC) užpildomas viršutiniame sluoksnyje chloroformo, metanolio ir vandens (35:65:40) mišiniu. Perėjimo agento preparatas ištirpinamas viršutiniame mišinio sluoksnyje ir įvedamas į kolonėlę. Perėjimo agentas buvo eliuojamas apatiniu minėto mišinio sluoksniu ir surenkamas frakcijomis. Stacionari fazė išpumpuojama iš kolonėlės ir taip surenkama frakcijomis. Mobilų ir stacionarių fazių surinktose frakcijose aktyvumas nustatomas atskirai.

Po to frakcijos frakcionuojamos per anijoninį keitiklį, pvz. Q Sefarozė HP. Šiam tikslui perėjimo agentas ištirpinamas ir, įvedamas į kolonėlę buferyje (pvz. 5mM piperazino/acetinės rūgšties pH 6,0) ir eliuojamas gradiento pagalba kitu buferiu (pvz., 5 mM piperazino + 1M natrio acetato, pH 6,0) pakol nesurišta medžiaga palieka kolonėlę. Eliuatas surenkamas frakcijomis ir tiriamas.

Sujungtos aktyvios frakcijos iš anijoninio keitiklio buvo frakcionuojamos per preparatyvinę Rsil C18 kolonėlę (250x25 mm) gradientinio eliuavimo pagalba. Aktyvios frakcijos sujungiamos, koncentruojamos ir džiovinamos šalčiu. Ši medžiaga buvo ištirpinta 1 mM HCl ir frakcionuojama per HPX-87H kolonėlę. Aktyvios frakcijos sujungiamos ir eliuojamos per dvi eiles sujungtų Bakerbond C18 kolonelių. Tokiu būdu buvo gauta 245 μ g gryno perėjimo agento, kuris kristalinosi iš persotinto tirpalo.

Tokiu būdu gautas perėjimo agentas buvo analizuojamas įvairiais metodais, siekiant nustatyti jo cheminę struktūrą. Pagal tai buvo nustatyta tokia perėjimo agento struktūra:



Šis perėjimo agentas turi K_m reikšmę, kaip nustatyta pagal Monod kinetiką, apie 10^8 g/l. Naudojant šią reikšmę, perėjimo agento kiekis neišgrynintuose tirpaluose gali būti nustatytas, naudojant lygtį:

$$\text{Perėjimo agento kiekis} = \frac{10^{-8}}{K_m} \times 100 \%$$

kur K_m yra koncentracijos reikšmė, kuriai esant gaunama pusė maksimalaus perėjimo, naudojant negrynintą agentą.

Perėjimo agento spektrinė analizė

Masių spektrometrija

Išgryninto perėjimo agento analizės atliktos naudojant Finnigan MAT-95Q, Finnigan MAT TSQ 700 MS/MS ir Finnigan MAT Laser TOF masių spektrometrus.

Medžiagos rūgštinėje formoje masių spektras turi molekulinį joną su molekuline mase 498 ir eilę fragmentų su masės/ krūvio santykiu 480,470 ir 450 Daltonų. Natrio druskos elektropurškimo ir lazerinės desorbcijos masių spektras davė masės/krūvio santykį, lygų 521 Daltonų.

Protonų BMR

Perėjimo agentas ištirpinamas 0,5 ml D_2O ir patalpinamas į Varian 400 spektrometrą. Skleidimo laikas buvo apie 15 val. (4720 praėjimų). Spektras taip pat buvo užrašytas, naudojant palyginamąjį kontrolinį bandinį.

Protonų BMR spektre tokie poslinkiai ir sąveikų dydžiai buvo gauti, panaudojant Varian-Unity 400 MHz spektrometrą D_2O prie $5^\circ C$, išoriniu standartu naudojant 3-(metilsilil)-propijoninės rūgšties- d_4 natrio druską, kurios poslinkis 0,0 m.d.

Pavyzdys buvo naudojamas natrio druskos formoje:

Lentelė 1

Anglies atomo Nr.	Poslinkis (m.d.)	Sąveikos (Hz)	
2	4,09	-	
4	2,61	17,90 (4')	
4'	2,61	-	
6	4,04	-	
7 (Me)	1,20	-	
	1,21	-	
9 (OMe)	3,26	-	
13	4,32	7,68(14)	2,74(14')
14	2,18	7,54(13)	12,47(14')
14'	2,04	12,60(14)	3,02(13)
16 (Me)	1,34	-	-
17	1,95	4,94 (18')	14,47(17')
17'	1,43	5,21(18)	13,57(17') + ?(18')
18	2,48	5,21(17')	20,43(18')
18'	2,58		skaidymas neaiškus

Ciklopropano žiedas

1	1,78	multipletas
2	1,50	multipletas
3	0,85	dubletas
3'	0,84	dubletas dubletas

Infraraudonųjų spektrų analizė

Grynas perėjimo agentas ištirpinamas metanolyje ir perpilamas į mikrokiuvetę su KBr. Atsargiai išgarinus, užrašomas spektras. Palyginamojoje kiuvetėje grynas metanolis paruošiamas analogiškai. Spektrai buvo registruojami, naudojant Bruker IPS-85 FTIR spektrometrą, DTGS detektorių, optinis skyrimas 4 cm^{-1} , skleidimų skaičius 128/256. Spektras buvo transformuojamas, naudojant Kubelia-Munk transformaciją. Absorbcijos juostos buvo priskirtos taip:

Banginis skaičius (cm^{-1})

Funkcinė grupė

3379

- OH, įskaitant H_2O

2949/1470

- CH_3 , ir/ar CH_2 5-nariame žiede

2838	- OCH ₃
1765	>C=O 4-nariame žiede
1660	C=C
Sudėtingos juostos 1200-100 srityje	- įvairūs alifatiniai eteriniai deguonies atomai

UV

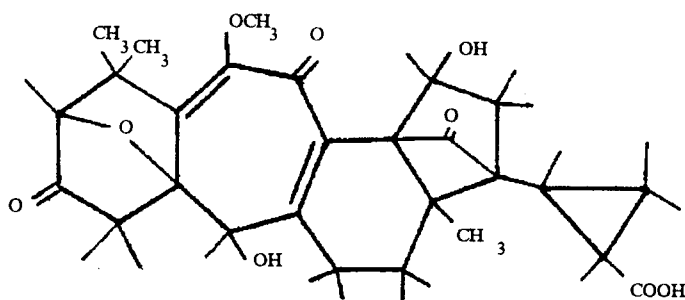
Perėjimo agento UV spektras yra charakterizuojamas absorbcijos maksimumu prie 267 nm ir prie apytiksliai 200 nm. Ekstinkcijų prie 225 nm ir 267 nm santykis yra apie 1,5 grynai perėjimo agentui. Ekstinkcijos koeficientas prie 267 nm yra 4550 ± 1250 l.mol⁻¹.cm⁻¹. Ši absorbcija nurodo, kad yra konjuguotų C=C ir/arba C=O jungčių sistema, kas atitinka šio išradimo perėjimo agento struktūrą.

Rentgeno difrakcijos analizė

Kristalas buvo matuojamas, naudojant Enraf-Nonius CAD-4 difraktometrą su grafito monochromuotu CuK α spinduliavimu ir ω - 2θ skleidimu. Iš viso buvo išmatuota 10551 atspindžių srityse - $13 \leq h \leq 13$, $-25 \leq k \leq 0$, $-14 \leq l \leq 14$, unikalūs rinkinys susideda iš 5257 atspindžių. Iš šių, 3721 buvo virš reikšmingo $2,5\sigma(I)$ lygio. Maksimali $(\sin \theta)/\lambda$ reikšmė buvo 0,61 Å⁻¹. Du palyginamieji atspindžiai (021,200) buvo matuoti kas valandą ir rodė 9% sumažėjimą 116 val. laikotarpyje, kas buvo pakoreguota. Mazgų parametrai surasti, naudojant mažiausių kvadratų metodą, panaudojus 23 atspindžius su $74 < 2\theta < 84^\circ$. Buvo panaudotos Lorencio ir poliarizacijos efektų korekcijos. Struktūra buvo gauta, panaudojant programą CRUNCH, kuri naudoja Karle-Hauptman matricas nustatant fazes. Vandens molekulės buvo rastos tolesnėje ΔF sintezėje. Anizotropinis blokdiagonalinis mažiausių kvadratų metodas ant F kverguoto į $R=0,126$, $R_w = 0,171$, $(\Delta/\sigma)_{\max} = 0,85$. Skaičiavimo tikslumas $S=0,548$. Buvo panaudota įvertinimo schema $W=(3,0+F_{\text{steb.}}+0,011 \cdot F_{\text{steb.}}^2)^{-1}$. Buvo panaudota empirinė absorbcijos korekcija (DIFABS, Walker ir Stuart 1983) su koeficientais 0,23-1,43 srityje. Išsibarstymo faktoriai buvo paimti iš Cromer ir Mann (1968): "International Tables for X-ray Crystallography" (1974). Visi skaičiavimai atlikti su XTAL (HALL ir Stewart 1990), jeigu neduota kitų nuorodų.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Perėjimo agentas, kurio struktūrinė formulė



mol.masė 498 ir
Brutto formulė
 $C_{27}H_{30}O_9$

ir jo esterių ir druskų dariniai, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad iššaukia *Globodera rostochiensis* ir *Globodera pallida* cistų nematodų perėjimą.

2.Perėjimo agentas pagal 1 punktą, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad gaunamas iš hidrokultūros arba bulvinių šeimos (*Solanaceae*) augalų dalių, audinių arba ląstelių kultūros, atskirai imant iš bulvių šaknų ir esant tinkamam maitinimo šaltiniui.

3.Perėjimo agentas pagal 2 punktą, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad gaunamas auginant ląstelių suspensinę kultūrą ir esant maitinimo terpei.

4.Perėjimo agentas pagal 2 arba 3 punktus, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad gautas negrynas tirpalas kultyvavimo būdu yra gryninamas.

5.Perėjimo agento gavimo būdas pagal 1-4 punktus, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad perėjimo agentą išskiria iš bulvinių šeimos (*Solanaceae*) augalų arba augalų dalių audinių arba ląstelių kultūros, esant tinkamai maitinimo terpei.

6.Būdas, kaip pareikšta 5 punkte, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad gautas perėjimo agentas yra gryninamas.

7.Perėjimo agento, iššaukiančio *Globodera rostochiensis* ir *Globodera pallida* cistų nematodų rūšių ir patotipų perėjimą, gavimo būdas, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad perėjimo agentą išskiria iš recirkuliuojančio maitinamo vandens substrato kultūrose, pvz., šiltnamiuose, iš pomidorų.

8.Perėjimo agentas, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad gaunamas pagal būdą išdėstytą 5-7 punktuose.

9.Perėjimo agento, iššaukiančio *Globodera rostochiensis* ir *Globodera pallida* cistų nematodų rūšių ir patotipų perėjimą, preparatas, **b e s i s k i r i a n t i s t u o**, kad gaunamas pagal 1-4, arba 8 punktus ir esant tinkamam nešėjui.

10. Perėjimo agento preparatas, kaip pareikšta punkte 9, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad duotasis nešėjas yra vanduo arba vandeninis tirpalas.

11. Būdas skirtas kovai su **Globodera rostochiensis** ir **Globodera pallida** cistų nematodais, sukeliančiais bulvių ligą, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad į žemės lauką, kuris bus užsodintas bulvėmis, įterpia perėjimo agentą, gaunamą kaip pareikšta 1-4 arba 8 punktuose, arba perėjimo agento preparatą, kaip pareikšta 9 arba 10 punktuose, pasirinktinai derinant su dirvos dizenfektoriais, tokiais kaip 1,3-dichloropropanas ir metam natriis.