

*C12N 1/14* (2006.01)  
*A01N 63/00* (2020.01)  
*A01N 63/30* (2020.01)  
*A01P 7/02* (2006.01)  
*A01P 7/04* (2006.01)  
*A01P 3/00* (2006.01)  
*C12R 1/645* (2006.01)

(19)  
 ČESKÁ  
 REPUBLIKA



ÚŘAD  
 PRŮMYSLOVÉHO  
 VLASTNICTVÍ

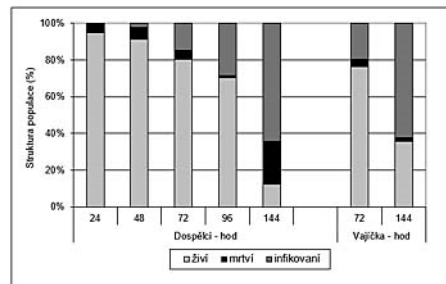
(21) Číslo přihlášky: **2022-125**  
 (22) Přihlášeno: **18.03.2022**  
 (40) Zveřejněno: **11.10.2023**  
**(Věstník č. 41/2023)**  
 (47) Uděleno: **31.08.2023**  
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **11.10.2023**  
**(Věstník č. 41/2023)**

(56) Relevantní dokumenty:  
 WANG, Dengke, et al. Identification and virulence characterization of entomopathogenic fungus *Lecanicillium attenuatum* against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 2017, Vol. 52, No. 3, p. 511-518, ISSN 0003-6862, celý dokument;  
 MONTALVA, Cristian, et al. *Lecanicillium attenuatum* isolates affecting the invasive cypress aphid (*Cinara cupressi*) in Chile. *BioControl*, 2017, Vol. 62, No. 5, p. 625-637, ISSN 1386-6141, celý dokument;  
 KIM, Jeong Jun. Influence of *Lecanicillium attenuatum* on the development and reproduction of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *BioControl*, 2007, Vol. 52, p. 789-799, ISSN 1386-6141, celý dokument.  
 CN 104195050 A; KR 20090038740 A.

(73) Majitel patentu:  
 Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,  
 České Budějovice, České Budějovice 2, CZ

(72) Původce:  
 Ing. Andrea Bohatá, Ph.D., Plzeň, Skvrňany, CZ  
 Ing. Jana Lencová, České Budějovice, České  
 Budějovice 5, CZ  
 doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D., Dubné, CZ  
 doc. Ing. Jan Mráz, Ph.D., České Budějovice,  
 České Budějovice 2, CZ

(74) Zástupce:  
 Mgr. Aleš Lang, č. p. 30, 382 03 Nová Ves



(54) Název vynálezu:  
**Kmen entomopatogenní houby  
*Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 a  
 způsob likvidace hmyzích škůdců, roztočů a  
 patogenů rostlin kmenem entomopatogenní  
 houby**

(57) Anotace:  
 Řešení se týká kmene CCM 9195 entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* pro ochranu pěstovaných rostlin, který dokáže být přírodní alternativou k chemickým pesticidům „insekticidům“ pro ochranu rostlin, zejména proti savému hmyzu a roztočům, přičemž vynález dokáže být i přírodní náhražkou chemických prostředků pro ochranu rostlin před chorobou padlí. Vynález pracuje na způsobu zanášení spor kmene houby na rostliny a jejich pěstební plochy.

## Kmen entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 a způsob likvidace hmyzích škůdců, roztočů a patogenů rostlin kmenem entomopatogenní houby

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká nasazení kmene entomopatogenní houby při ochraně pěstovaných rostlin pro biologickou likvidaci hmyzích škůdců, roztočů a patogenů rostlin.

10

### Dosavadní stav techniky

Zemědělství v původním slova smyslu vyjadřovalo vztah člověka k půdě. V současné době je hlavním rysem konvenčního zemědělství snaha o dosažení co největší produkce, potažmo výnosu s co nejnižšími vstupy (náklady). Značnou roli zde samozřejmě sehrávají i ekonomické požadavky na rentabilitu. Aby se dosáhlo těchto cílů (výnos, zisk), jsou na prvním místě používány chemické vstupy (pesticidy) a až na druhém místě alternativní metody, zejména agrotechnické, fyzikální a biologické metody.

Chemickými vstupy jsou jednak dodávání anorganických hnojiv, snaha o minimalizaci škod, které způsobuje zaplevelení a v neposlední řadě potlačení chorob a škůdců pěstovaných plodin. Tímto dochází při pěstování plodin k závislosti na vnějších vstupech, snížení biodiverzity krajiny, kontaminaci povrchových vod, degradaci půdy – erozi, narušení agroekosystémů, výskytu reziduí v potravinách a celkově ke znečištění životního prostředí.

25

Přestože je kladen velký tlak na rostlinnou produkci z pohledu potřeby co největší efektivity, vzhledem ke stále se zvyšující spotřebě populace, je brán ohled i na potřebu zachování tzv. „bio“ kvality. Spotřebitelé, stále častěji preferují rostlinné produkty, které nebyly chemicky ošetřovány. Dochází tedy k pečlivému zvažování použití prostředků v boji proti škodlivým činitelům, jež by měly za následek ohrožení lidského zdraví či životního prostředí.

30

To je jeden z důvodů, proč se rozvíjí alternativní metody ochrany rostlin. V současné době musí každý profesionální uživatel hospodařit na základě zásad integrované ochrany rostlin (Vyhláška 205/2012 Sb.). Zavedení Integrované ochrany rostlin se snaží omezit používání pesticidních látek, a tím chránit životní prostředí.

35

V minulosti se používaly širokospektrální, pro savce toxické a velmi perzistentní pesticidy, které způsobovaly vysokou mortalitu necílových druhů. Navíc vysoká intenzita chemické ochrany a opakované pesticidní zásahy měly podstatný vliv na vznik rezistentních populací škodlivých organismů. Rezistence vyvolává potřebu zvyšovat dávky nebo přecházet na jiné typy účinnějších insekticidů. V tomto směru jsou možnosti na hranici vyčerpání. Navíc zpřísnující se legislativa omezuje tento způsob boje.

40

Jednou z možností omezení nadměrného používání pesticidů v rostlinné výrobě je využití biologické regulace, tj. využití přirozených antagonistických vztahů mezi organismy za účelem potlačení patogenů způsobujících onemocnění rostlin a škůdců bez podstatného porušení přírodní rovnováhy, a tím přispění k udržení stability ekosystémů v antropogenně změněných podmínkách prostředí. Potvrdilo se, že tyto prostředky jsou pro necílové organismy včetně člověka většinou neškodné a na rozdíl od klasických insekticidů nepředstavují žádnou ekologickou zátěž pro životní prostředí a podstatně tak přispívají k ochraně druhové biodiverzity. Podstatou je, že se jedná o organismy, které se v prostředí přirozeně vyskytují, takže jejich uměle navýšená přítomnost v prostředí neohrožuje jiné živočišné druhy, kromě jejich přirozených hostitelů.

50

Na rozdíl od chemické ochrany se působení biologické ochrany obvykle dostavuje o něco později, ale účinky jsou dlouhodobé. Proto se s nimi ve světovém měřítku stále více počítá jako

55

s alternativními prostředky regulace patogenů rostlin a hmyzích škůdců. Biologickou ochranu v širším i užším smyslu slova považuje dnes většina odborníků za ekologicky, hygienicky i ekonomicky nejvhodnější metodu potlačování škůdců a to zejména ve skleníkových kulturách. Nelze ji chápat jako samospasitelný zázrak, ale jako vědecky propracovanou metodou, jejíž úspěch je založen na znalostech ekologických nároků, správného poměru škůdců a jejich přirozených nepřátel.

Biologická ochrana rostlin je nejvíce využívána ve sklenících, kde je možné regulovat podmínky prostředí, zejména pak udržovat stálou teplotu a relativní vzdušnou vlhkost, které vyžadují nejen pěstované plodiny, ale i použítá bioagens. Proto je v těchto podmínkách biologická ochrana nejrozšířenější, zejména na rychlené zelenině jako jsou okurky, rajčata, papriky, lilky, ale i na dalších kulturách (jahody, chryzantémy, gerbery, růže a jiné okrasné rostliny).

Cílem vynálezu je příprava a způsob použití kmene entomopatogenní houby, která by byla ekvivalentně účinná k doposud používaným chemickým prostředkům a nahradila je tak v rámci ochrany rostlin, a to zejména proti savému hmyzu, roztočům a patogenům rostlin. Příkladem takového postupu je například vynález z dokumentu CZ 300701 B6, ve kterém je zveřejněno nasazení specifického kmene entomopatogenní houby v boji proti vybraným hmyzím škůdcům a roztočům.

Vzhledem k širokému spektru chorob a škůdců kulturních rostlin není možné použití jediného kmene entomopatogenní houby. Zde vzniká prostor k dalšímu výzkumu a vývoji nových přirozených nepřátel „parazitoidů, predátorů, entomopatogenních, mykoparazitických nebo antagonistických mikroorganismů“ využitelných v ochraně rostlin.

#### Podstata vynálezu

Vytčený úkol je vyřešen kmenem entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* LAT 13 – CCM 9195 a způsobem ochrany pěstovaných rostlin podle dále uvedeného vynálezu.

Pro potřeby vynálezu je použit kmen entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195, díky jehož účinnosti na savý hmyz, vybrané roztoče a patogeny rostlin je umožněno nahrazení komerčně dostupných chemických prostředků.

Podstatou vynálezu je kmen entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* LAT 13 pro použití v ochraně pěstovaných rostlin uložený v CCM – České sbírce mikroorganismů, Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic, pod depozitním číslem vzorku CCM 9195.

V rámci vynálezu je prezentován způsob likvidace savého hmyzu, roztočů a patogenů rostlin, který zahrnuje ošetření pěstovaných rostlin sporami *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195. To je výhodné, neboť aplikace spor je jednoduchá činnost, kopírující známé šíření spor v přírodě, kdy se spory rozptylují kapkami kapaliny, popřípadě se spory rozptylují pomocí vzduchu, či jsou spory zaneseny do pěstebního substrátu. Je tedy výhodné, pokud jsou spory rozptýleny v kapalině, či v práškovém inertním nosiči, nebo v pěstebním substrátu.

Dále je v rámci vynalezeného způsobu ochrany rostlin výhodné využívání *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 na populace molic, mšic a trásněnek. Jedná o savý hmyz, který patří mezi nejčastěji rozšířené škůdce plodin. Vynález umožňuje účinnou redukci jejich populací a vzhledem k tomu je možná eliminace používání chemických přípravků.

Dalším způsobem výhodného využití *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 je použití na populaci roztoče svilušky chmelové, která způsobuje snížení výnosu rostlin pěstovaných jak v polních podmínkách, tak i ve skleníkových kulturách.

V neposlední řadě je v rámci vynalezeného způsobu ochrany rostlin výhodné, pokud se *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 použije proti chorobě padlí. Přestože je vynálezem kmen entomopatogenní houby, bylo v rámci praktických testů zjištěno, že kmen houby vykazuje statut mykoparazita, který účinkuje proti patogenům rostlin, zejména na chorobách padlí. Takto lze využít aplikaci spor kmene houby jako alternativu k chemické ochraně.

Mezi výhody vynálezu patří to, že jeden jediný kmen houby dokáže nahradit až několik různých chemických prostředků pro ošetření rostlin, a to proti různorodému spektru škodlivých činitelů od savých hmyzích škůdců, přes roztoče, až po patogeny rostlin. Je výhodné, že kromě primárního efektu entomopatogenního druhu sekundárně vykazuje rovněž mykoparazitický statut (ektoparazit).

### Objasnění výkresů

Uvedený vynález bude blíže objasněn na následujících vyobrazeních, kde:

obr. 1 znázorňuje graf s účinností kmene houby dle vynálezu na roztoče svilušku chmelovou,

obr. 2 znázorňuje grafické zobrazení hodnocení vlivu vývoje patogenu *Sphaerotheca fuliginea* na listech okurky seté po ošetření kmeny entomopatogenní houby rodu *Lecanicillium*.

### Příklady uskutečnění vynálezu

Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní případy uskutečnění vynálezu jsou představovány pro ilustraci, nikoliv jako omezení vynálezu na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zajistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním vynálezu, která jsou zde popsána.

Kmen CCM 9195 houby *Lecanicillium attenuatum* Zare & W. Gams patří do říše *Fungi*, oddělení *Ascomycota*, řádu *Hypocreales*, čeledi *Cordycipitaceae*, telemorfa *Cordyceps* spp., EPPO kód AKATAT. Synonymum druhu *Lecanicillium attenuatum* je *Akanthomyces attenuatus* (Zare & W. Gams) Spatafora, Kepler & B. Shrestha. Obecně druh *Lecanicillium attenuatum* je velmi dobře známá polyfágní entomopatogenní houba, která způsobuje primární onemocnění, a tím spontánní epizootie nejčastěji na širokém spektru svého hmyzu, jako jsou například mšice (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*), molice (např. *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *Aleyrodes proletella*), třásněnky (např. *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), puklice, červci, vrtalky aj. Způsobuje také infekci na druzích hmyzu náležejících do řádů *Orthoptera*, *Coleoptera*, *Heteroptera* a *Lepidoptera*. Spektrum parazitizmu *Lecanicillium attenuatum* však není omezeno pouze na hmyz. Spontánní epizootie způsobuje i v populacích některých druhů roztočů (např. *Tetranychus urticae* a vlnovníků z čeledi *Eryophidae*). Kromě parazitické asociace s uvedenými skupinami členovců bylo zjištěno, že se *Lecanicillium attenuatum* vyskytuje i jako ektoparazit na některých druzích fytopatogenních hub. Příkladem této ektoparazitické formy vývoje *Lecanicillium attenuatum* je výskyt na uredosporách různých druhů rzí (např. *Uromyces dianthi*, *Uromyces appendiculatus*, *Puccinia graminis*, *Puccinia horiana*) a na konidiích padlí *Sphaerotheca fuliginea*, *Podosphaera xanthii*, *Golovinomyces cichoracearum*. Parazituje i na patogenu *Botrytis cinerea* způsobujícím plíseň šedou.

Hlavní determinačním znakem *Lecanicillium attenuatum* je typická forma sporulace. V průběhu konidiogeneze se na vzdušném myceliu vytvářejí dlouhé úzké lahvicovité konidiofory, na jejichž koncích se postupně tvoří elipsoidní konidie. Konidiofory jsou na myceliu umístěny v přeslenech a z jedné zóny protilehle vyrůstají 2, 3 až 4 konidiofory. Na koncích hyf může být přeslen tvořen i více konidiofory. Konidie jsou vytvářeny postupně a vždy nová mladší konidie odtlačuje dříve vytvořenou konidii do postupně se tvořícího shluku, který má podobu kuličky. V závěrečné fázi

sporulace se kuličky pokrývají mucilaginí hmotou, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru.

5 V rámci způsobu použití jsou entomopatogenní houby aplikovány ve formě vodních suspenzí spor, a to buď preventivně, nebo kurativně. Při kurativní aplikaci je třeba respektovat kontaktní účinek preparátů. Při ošetření nadzemních částí rostlin je nutné pečlivě ošetřit niky, ve kterých se vyskytuje cílový druh škůdce. Suspenze by se měla připravovat těsně před postřikem, případně maximálně 4 až 6 hodin před aplikací. Důležité je spotřebovat celou dávku, která byla připravena, a to z toho důvodu, že po delší době smočení spory ve vodě ztrácí vitalitu a dochází k jejich odumření. Alternativou je aplikace rozprašování práškového inertního nosiče spor, např. tzv. studeným kouřem. Spory v práškovém nosiči, pokud nejsou vystaveny zvýšené teplotě, ztrácejí vitalitu pomaleji. Další možností je rozptýlit spory do pěstební substrátu, aby byly připraveny pro ochranu podzemních částí pěstovaných rostlin, jak ukazují probíhající experimenty s ochranou proti třásněnkám.

15 Klíčení konidií a sporulace vyžaduje většinou vysokou relativní vzdušnou vlhkost a vyšší teplotu (optimum 20 až 25 °C), což omezuje použitelnost tohoto druhu houby v polních podmínkách a zvyhodňuje použití ve sklenících. Optimální podmínky jsou důležité zejména v prvních 12 hodinách po aplikaci, kdy dochází ke klíčení a pronikání hyf do těla hostitele. V době, kdy patogen pronikne dovnitř těla hostitele, už není zapotřebí vysoká relativní vzdušná vlhkost. Uvnitř těla jsou vlhkostní podmínky zajištěny. Následně po usmrcení hostitele houba prorůstá zpět na povrch hostitele a sporuluje, vytváří tak sekundární konidie, které se mohou v prostředí samovolně šířit pomocí vody, vzduchu nebo pomocí přenosu spor pomocí jedinců v populacích škůdců.

25  
Příklad 1

Pro pokus byly použity kmeny CCM 9195 a kmene CZ LAT 001 entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* a kmen CZ LMU 002 entomopatogenní houby *L. muscarium*. Povrch plně vysporulované kultury každého kmene byl přelit 0,05% sterilním roztokem Tween 80. Získaná suspenze každého kmene byla filtrována přes gázu do samostatné Erlenmeyerovy baňky. V jednotlivých suspenzích byla pomocí vylepšené Neubauerovy počítací komůrky stanovena koncentrace spor na 1 ml. Titr každého kmene byl následně adjustován na koncentraci  $1,00 \times 10^7$  spor v 1 ml. Pokus na zjištění účinnosti kmenů *Lecanicillium* na mšici broskvoňovou byl realizován na rostlinách papriky roční. Rostliny paprik byly infestovány jedinci mšice broskvoňové a populace mšic se nechala na rostlinách adaptovat a vyvíjet po dobu 10 dnů. Po 10 dnech byly rostliny odděleně ošetřeny testovanými kmeny *Lecanicillium*. Kontrolní rostliny byly ošetřeny 0,05% roztokem Tween 80. V každé variantě byly ošetřeny 3 rostliny. Po oschnutí suspenzí byly rostliny umístěny do plastických izolátorů pro zajištění optimálních podmínek pro vývoj entomopatogenní houby. Účinnost jednotlivých kmenů *Lecanicillium* byla testována po 10 dnech od aplikace. Hodnocení bylo provedeno tak, že se detailně a přesně hodnotil stav každého jedince v populaci mšic. Stav každé mšice byl tedy rozlišován na úrovni kategorií živá, mrtvá (bez zjevné infekce na těle mšice) a infikovaná (houba proliferovala na povrch těla mšice, kde formovala mycelium, zjevná infekce).

45 V rámci příkladu 1 bylo provedeno porovnání působení kmene CCM 9195 houby *Lecanicillium attenuatum* s jinými známými kmeny hub rodu *Lecanicillium* na populaci mšice *Myzus persicae* jak je znázorněno v tabulce níže:

Kmen*	Průměrný počet mšic na 1 rostlině (průměr±Smodch)	Struktura populace mšice <i>Myzus persicae</i> (%)			Kumulovaná mortalita (%)
		živé	mrtvé	infikované	
Kontrola	219,12 ±23,45	97,51	2,49	0	2,49
CCM 9195	187,65 ±36,49	25,39	3,11	71,50	74,61
CZ Lat 001	159,26 ±19,32	35,26	3,02	61,71	64,73
CZ Lmu 002	205,89 ±33,93	27,15	6,96	65,89	72,85

Z tabulky vyplývá, že kmen CCM 9195 podle vynálezu měl nejvyšší účinnost. Kumulovaná mortalita dosahovala 74,61 %, což se přibližuje deklarované účinnosti insekticidů pohybující se dle specifik výrobců v rozmezí od 70 do 95 %. Oproti chemickým přípravkům je důležité zdůraznit, že se v populaci objevily mšice, které byly zjevně infikované, což zaručuje možnost spor se v prostředí roznášet na další zdravé jedince mšic vyskytující se na rostlinách v porostu.

Původci v době podání přihlášky vynálezu mají rozpracované další studie ohledně účinnosti vynálezu na další druhy, přičemž z letného nahlédnutí do průběžných dat je patrné, že kmen houby CCM 9195 podle vynálezu je účinný na další druh mšice např. *Aphis gossypii*.

#### Příklad 2

Pro pokus byly použity kmeny CCM 9195 a kmene CZ LAT 001 entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* a kmen CZ LMU 002 entomopatogenní houby *L. muscarium*. Povrch plně vysporulované kultury každého kmene byl přelit 0,05% sterilním roztokem Tween 80. Získaná suspenze každého kmene byla filtrována přes gázu do samostatné Erlenmeyerovy baňky. V jednotlivých suspenzích byla pomocí vylepšené Neubauerovy počítací komůrky (Neubauer Improved Chamber, Brand™ Blaubrand™) stanovena koncentrace spor na 1 ml. Titr každého kmene byl následně adjustován na koncentraci  $1,00 \times 10^7$  spor v 1 ml.

Pokus na zjištění účinnosti kmenů *Lecanicillium* na molici skleníkovou *Trialeurodes vaporariorum* byl realizován na rostlinách okurky seté. Na rostliny okurky seté byli vypuštěni dospělci molice skleníkové, kteří byli získáni z chovu. Dospělci se mohli volně pohybovat z rostliny na rostlinu a samičky kladly vajíčka na listy rostlin. Po dobu 7 dní byli pomocí exhaustoru všichni dospělci odstraněni a rostliny s částečně synchronizovanou populací vajíček *T. vaporariorum* byly použity pro experiment. 7 den po odstranění dospělců byly rostliny rozděleny do skupin po 3 rostlinách. Každá skupina byla ošetřena jedním kmenem houby *Lecanicillium*. Kontrolní rostliny byly ošetřeny 0,05% roztokem Tween 80. Po oschnutí suspenzí byly rostliny umístěny do plastických izolátorů pro zajištění optimálních podmínek pro vývoj entomopatogenní houby. Účinnost jednotlivých kmenů *Lecanicillium* byla testována po 14 dnech od aplikace. Hodnocení bylo provedeno tak, že se detailně a přesně hodnotil stav každého jedince v populaci molice. Stav každé nymfy, popřípadě vajíčka, byl rozlišen na úrovni kategorie živá, mrtvá (bez zjevné infekce na těle mšice) a infikovaná (houba proliferovala na povrch těla mšice, kde formovala mycelium, zjevná infekce).

V rámci příkladu 2 bylo provedeno porovnání působení kmene CCM 9195 houby *Lecanicillium attenuatum* s jinými kmeny hub rodu *Lecanicillium* na populaci molice skleníkové *Trialeurodes vaporariorum* jak je znázorněno v tabulce níže:

Kmen*	Celkový počet jedinců molice	Struktura populace molice <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (%)			
		živé	mrtvé	infikované	Kumul. mortality
Kontrola	564,33 ±69,51	93,21	6,79	0	6,79
CCM 9195	417,33 ±33,32	7,85	3,47	88,68	92,15
CZ Lat 001	647,67 ±56,05	14,26	9,52	76,22	85,74
CZ Lmu 002	508,67 ±46,76	9,53	5,87	84,6	90,47

Z tabulky vyplývá, že kmen CCM 9195 podle vynálezu měl nejvyšší účinnost, a to 92,15 %, což se přibližuje deklarované účinnosti insekticidů pohybující se dle specifik výrobců v rozmezí od 70 do 95 %. Kategorie infikovaných jedinců zajišťuje samovolné šíření spor houby v prostředí a tím možnosti způsobit další úmrtnost a infekci jedinců v populacích molice skleníkové.

Původci v době podání přihlášky vynálezu mají rozpracované další studie ohledně účinnosti vynálezu na další druhy molice, přičemž z letmého nahlédnutí do průběžných dat je patrné, že kmen houby CCM 9195 podle vynálezu je účinný na další druhy molice *Bemisia tabaci*, *Aleyrodes proletella*.

### Příklad 3

Pro pokus byla použita přesně adjustovaná suspenze konidií kmene CCM 9195 entomopatogenní houby *L. attenuatum*. Při přípravě suspenze byl použit standardní postup, při kterém byla z kultury (celoplošná inokulace, 14 denní kultivace na povrchu agarizované živné půdy bez osvětlení při konstantní teplotě 24 ±1°C) získána nejprve základní suspenze, která byla následně upravena a použita pro experimenty. Základní suspenze byla získána přelitím povrchu synchronizovaných kultur sterilním roztokem (0,05% Tween® 80) a přelitím přes sterilní gázu do skleněné baňky. Po stanovení výchozího titru (= počet spor/1 ml základní suspenze) byla základní suspenze adekvátním ředěním (0,05% Tween® 80) upravena na standardní koncentraci 1,0 x 10<sup>7</sup> spor/1 ml. Pro stanovení titru suspenze byl používán hemocytometr (Neubauer Improved Chamber, Brand™ Blaubrand™).

Pro monitorování interakčního systému sviluška chmelová – entomopatogenní houba bylo využito standardního laboratorního biotestu s využitím listových terčíků.

#### a) Test na jedincích svilušky chmelové

Z děložních listů hostitelské rostliny fazolu obecného *Phaseolus vulgaris* byly vyříznuty listové disky o průměru 2,5 cm, které byly ošetřeny ponořovací metodou (DIP test). Pro kontrolní variantu byla použita destilovaná voda a přidavkem detergentu (0,05% Tween 80), pokusnou variantu představovala standardní suspenze konidií 1,0 x 10<sup>7</sup> konidií/1 ml kmene CCM 9195 houby *L. attenuatum*.

#### b) Test na vajíčkách

Z děložních listů hostitelské rostliny *Phaseolus vulgaris* byly vyříznuty listové disky o průměru 2,5 cm, které byly přeneseny na povrch ovlhčeného filtračního papíru položeného na dno uzavíratelných plastových misek. Na každý terčík bylo umístěno 5 samic svilušky *T. urticae*, které byly na povrchu listových disků ponechány po dobu 16 až 24 hodin. Po vymezené době byly samičky z povrchů disků odstraněny a disky s vajíčky byly ošetřeny ponořovací metodou (DIP test). Pro kontrolní variantu byla použita destilovaná voda s přidavkem detergentu (0,05% Tween® 80), pokusnou variantu představovala standardní suspenze konidií 1,0 x 10<sup>7</sup> konidií/1 ml kmene CCM 9195 houby *L. attenuatum*.

Ošetřené disky z obou testů byly umístěny do uzavíratelných plastových misek na povrch ovlhčené buničiny. V testu na jedincích svilušky chmelové bylo na povrch každého disku po oschnutí přeneseno 5 jedinců svilušky chmelové *Tetranychus urticae*. Jednu pokusnou variantu u obou testů tak reprezentovalo 16 terčíků (4 x 4 v 1 misce). Uzavřené misky byly umístěny do klimaboxu (25 °C, fotoperioda 16/8). Hodnocení bylo prováděno za použití binokulární lupy po 24, 48, 72, 96 a 144 hodinách u jedinců svilušek, respektive po 72 a 144 hodinách u vajíček svilušky chmelové.

Stav každého jedince/vajíčka svilušky byl rozlišen na úrovni kategorie živí, mrtví (bez zjevné infekce na těle mšice) a infikovaní (houba proliferovala na povrch těla mšice, kde formovala mycelium, zjevná infekce).

Charakteristika akaropatogenní účinnosti kmene CCM 9195 houby *Lecanicillium attenuatum*; struktura populace svilušky chmelové *Tetranychus urticae* ošetřené kmenem CCM 9195. Je znázorněna na obr. 1.

Při hodnocení účinnosti kmene CCM 9195 houby *Lecanicillium attenuatum* na dospělce svilušky byla po 72 hod trvání testu zaznamenána 20% mortalita a sporulace na těle hostitele u 14,79 % dospělců. Při konečném hodnocení po 144 hod byla zaznamenána téměř 89% mortalita a sporulace byla pozorována u 64,36 % dospělců. Ve stejnou dobu byla zaznamenána téměř 62,52% mortalita vajíček.

#### Příklad 4

Pro pokus byly používány přesně adjustované suspenze konidií jednotlivých kmenů entomopatogenních hub *Lecanicillium attenuatum* a *Lecanicillium muscarium*. Při přípravě suspenzí hub byl používán standardní postup, při kterém byla ze synchronizovaných kultur (celoplošná inokulace, 14 denní kultivace na povrchu agarizované živné půdy bez osvětlení při konstantní teplotě 24 ±1°C) získána nejprve základní suspenze, která byla následně upravena a použita pro experimenty. Základní suspenze byla získána přelitím povrchu synchronizovaných kultur sterilním roztokem (0,05% Tween® 80) a přelitím přes sterilní gázu do zkumavky nebo skleněné baňky. Po stanovení výchozího titru (= počet spor/1 ml základní suspenze) byla základní suspenze každého kmene adekvátním ředěním (0,05% Tween® 80) upravena na standardní koncentraci 1,0 x 10<sup>7</sup> spor/1 ml. Pro stanovení titru suspenzí byl používán hemocytometr (Neubauer Improved Chamber, Brand™ Blaubrand™).

Pro monitorování interakčního systému sviluška chmelová – entomopatogenní houby bylo využito standardního laboratorního biotestu s využitím listových terčíků.

#### 40 c) Test na jedincích svilušky chmelové

Z děložních listů hostitelské rostliny fazolu obecného *Phaseolus vulgaris* byly vyříznuty listové disky o průměru 2,5 cm, které byly ošetřeny ponořovací metodou (DIP test). Jako kontrolní varianta byla využívána destilovaná voda a přísadkou detergentu (0,05% Tween 80), pro pokusné varianty byla použita standardní suspenze konidií 1,0 x 10<sup>7</sup> konidií/1 ml.

Ošetřené disky každého kmene byly umístěny do uzavíratelných plastových misek na povrch ovlhčené buničiny. Jednu pokusnou variantu reprezentovaly 4 terčíky (1 x 4 v 1 misce). Celkem byly připraveny 4 opakování s celkovým počtem 16 terčíků pro 1 testovaný kmen. Po oschnutí bylo na povrch každého disku přeneseno 5 samic svilušky chmelové *Tetranychus urticae*. Uzavřené misky byly umístěny do klimaboxu (25 °C, fotoperioda 16/8). Hodnocení mortality samic svilušky bylo prováděno za použití binokulární lupy po 24, 48, 72, 96 a 144 hodinách. Charakteristika akaropatogenní účinnosti různých kmenů entomopatogenních hub rodu *Lecanicillium* spp. (1 terčík/5 samic; 4 terčíky/1 opakování)

55



Kmen	Počet jedinců	24 hod	48 hod	72 hod	96 hod	144 hod
kontrola	20,00 ±0,00	0,00	0,00	3,75	6,27	7,49
CCM 9195	19,75 ±0,50	4,93	8,63	19,73	32,88	87,61
CZ Lat 001*	19,75 ±0,50	1,47	5,88	11,75	16,16	67,60
CZ Lmu 002**	19,50 ±0,58	3,89	6,49	18,16	28,55	86,77
NL Lmu 003	20,00 ±0,00	1,26	5,06	18,97	29,60	73,37
NL Lmu 004	20,00 ±0,00	2,30	3,44	8,04	19,52	65,47

\*Lat – *Lecanicillium attenuatum*;

\*\*Lmu – *Lecanicillium muscarium*

5 Kmen CCM 9195 podle vynálezu vykázal ve srovnání s ostatními kmeny entomopatogenních hub rodu *Lecanicillium* nejvyšší účinnost. Po 144 hodinách způsobil 87,61% mortalitu dospělců svilušek. Závěrem lze konstatovat, že všechny vybrané kmeny entomopatogenních hub rodu *Lecanicillium* vyvolávají primární onemocnění u dospělců svilušky chmelové a byla tak prokázána jejich akaropatogenní účinnost.

#### 10 Příklad 5

Testování účinnosti hub rodu *Lecanicillium* proti padlí okurkovému *Sphaerotheca fuliginea* byl realizován na rostlinách okurky seté. V pokusu byl testován kurativní efekt jednotlivých kmenů proti padlí, kdy byl sledován stupeň sporulace a šíření kolonií padlí okurkového *S. fuliginea* na listech okurky. Z každého kmene hub rodu *Lecanicillium* byla připravena suspenze z plně vysporulovaných kultur jednotlivých kmenů (celoplošná inokulace, 14 denní kultivace). Ze základní suspenze byl adjustován titr na koncentraci  $1,0 \times 10^7$  spor v 1 ml. Rostliny okurky seté byly záměrně inokulovány patogenem *S. fuliginea* a umístěny do fytotronu, po dobu 3 dnů. Po 3 dnech byly z rostlin odebrány listy, které byly následně ponořeny do suspenzí testovaných kmenů. Po usušení byl každý list vložen do samostatné vlhké komůrky. Vlhká komůrka se skládala z malé a velké jednorázové plastové krabičky. Menší krabička (110×85×30 mm), byla z 1/3 naplněna vodou a přikryta víčkem, ve kterém byl otvor. Do otvoru byl zasunut řapík listu tak, aby mohl přijímat vodu. Takto připravená krabička byla vložena do velké krabičky (145×120×65 mm), která byla zavřena víkem. Uvnitř velké krabičky se pohybovala vlhkost v rozmezí od 65 do 73 %. Pro porovnání účinnosti kmenů byl použit fungicidní přípravek Sulikol K (0,5 % roztok) na bázi síry, který se používá v ochraně rostlin proti padlí. Kontrolní varianta spočívala v tom, že listy okurky seté byly ponořeny do sterilního roztoku 0,05% Tween 80. Pro každý kmen bylo připraveno 5 opakování. Vlhké komůrky byly vloženy do fytotronu (25 °C; 65 až 73 % RVV, fotoperioda 12/12). Hodnocení účinnosti bylo provedeno 5., 10., 15. den. Závažnost onemocnění byla hodnocena pomocí 6stupňové stupnice: 1 = 0 % (bez přítomnosti patogena), 2 = <0 až 25 % (velmi nízká intenzita choroby), 3 = 25 až 50 % (nízká intenzita choroby), 4 = 50 % (střední intenzita choroby), 5 = 50 až 75 % (středně vysoká intenzita choroby), 6 = 75 až 100 % (vysoká intenzita choroby)

35 V rámci příkladu 5 bylo provedeno porovnání působení kmene houby *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 s jinými známými kmeny houby *L. attenuatum* a *L. muscarium* na růst a vývoj padlí okurkového *Sphaerotheca fuliginea* jak je znázorněno v tabulce níže:

Kmen	0. den	5. den	10. den	15. den
Kontrola	1,00	2,20	3,60	5,20
Sulikol K***	1,00	2,00	3,00	3,60
CCM 9195	1,00	1,40	1,80	2,20
CZ Lat 001*	1,00	1,80	2,40	2,60
CZ Lmu 002**	1,00	1,60	2,00	2,40
NL Lmu 003	1,00	1,80	2,40	2,60
NL Lmu 004	1,00	1,60	2,20	2,40

\*Lat – *Lecanicillium attenuatum*;

\*\*Lmu – *Lecanicillium muscarium*

\*\*\* Sulikol K, přípravek na bázi síry používaný k regulaci padlí

- 5 Hodnocení vlivu vývoje patogenu *Sphaerotheca fuliginea* na listech okurky seté po ošetření kmeny entomopatogenní houby rodu *Lecanicillium* je znázorněno graficky na obr. 2.

10 Z výše uvedené tabulky vyplývá, že kmen podle vynálezu zpomalil růst a vývoj choroby na koeficient 2,2 po 15 dnech testu. Tento koeficient byl nejnižší ze všech testovaných kmenů i komerčního přípravku Sulikol K.

15 Co se týče jiných druhů chorob padlí, tak v době podání přihlášky vynálezu jsou rozpracované další studie ohledně účinnosti vynálezu na různé druhy choroby padlí, přičemž z letného nahlédnutí do průběžných dat je patrné, že kmen houby CCM 9195 podle vynálezu je účinný na celé spektrum variant choroby padlí, zejména na druhy *Podosphaera xanthii*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Erysiphe alphitoides*, nebo na padlí angreštu.

20 Zároveň mají původci v době podání přihlášky vynálezu rozpracované testy na mykoparazitickou aktivitu kmene CCM 9195 proti patogenu *Botrytis cinerea* způsobující onemocnění plíseň šedou a na rzi *Puccinia graminis*.

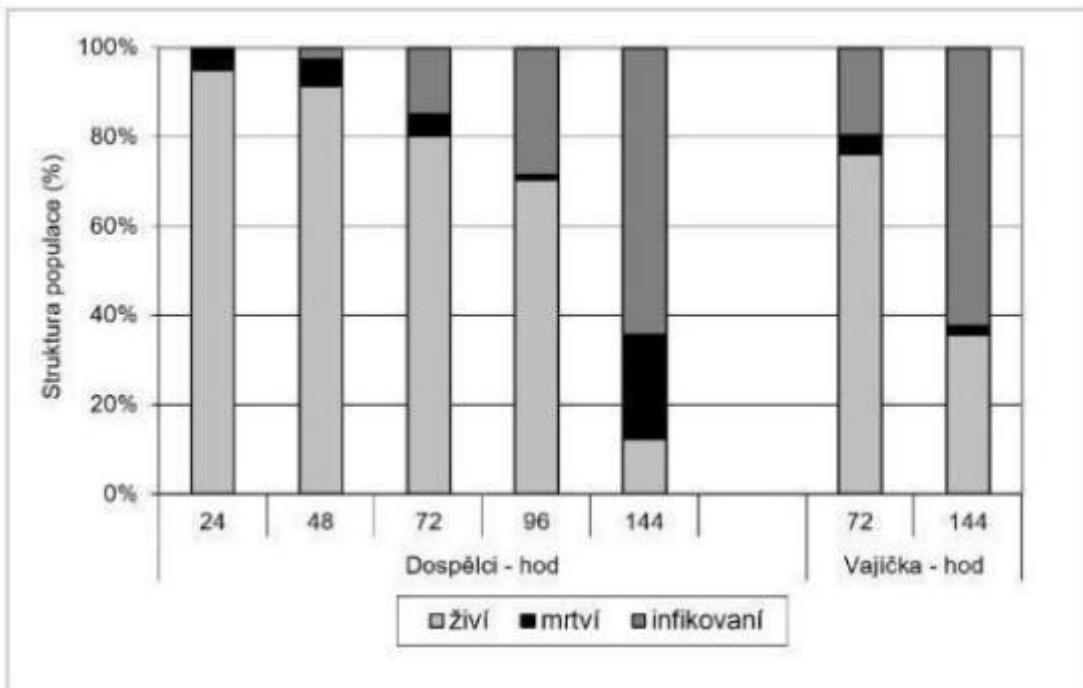
#### Průmyslová využitelnost

- 25 Kmen CCM 9195 entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* podle vynálezu nalezne uplatnění v integrované ochraně rostlin, zejména v plodinových programech pěstování plodin a okrasných květin proti hmyzím škůdcům, roztočům a patogenům rostlin.

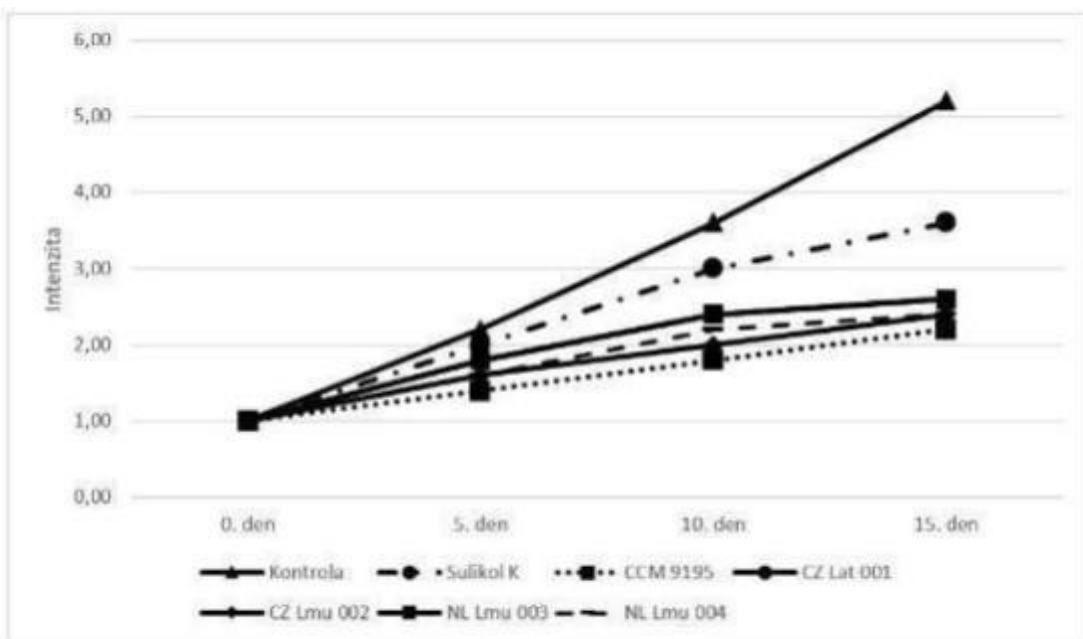
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kmen entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* LAT 13 k ochraně pěstovaných rostlin uložený v CCM – České sbírce mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic, pod depozitním číslem vzorku CCM 9195.
2. Způsob likvidace hmyzích škůdců, roztočů a patogenů rostlin kmenem entomopatogenní houby, **vyznačující se tím**, že se rostliny ošetří sporami *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 podle nároku 1.
- 10 3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že jsou spory rozptýleny v kapalině, či v práškovém inertním nosiči, či v půdním substrátu pro pěstování rostlin.
4. Použití entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 podle nároku 1 pro ošetření rostlin proti populaci molic nebo mšic nebo třásněnek.
5. Použití entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 podle nároku 1 pro ošetření rostlin proti populaci roztoče svilušky chmelové.
- 15 6. Použití entomopatogenní houby *Lecanicillium attenuatum* CCM 9195 podle nároku 1 proti chorobě padlí nebo patogenu *Botrytis cinerea* způsobujícímu onemocnění plíseň šedá nebo na rzi *Puccinia graminis*.

20 2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2