

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 310 080

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12N 1/14* (2006.01)  
*A01N 63/30* (2020.01)  
*A01N 63/38* (2020.01)  
*A01N 63/12* (2020.01)  
*A01P 3/00* (2006.01)  
*A01P 21/00* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-28**  
(22) Přihlášeno: **26.01.2023**  
(40) Zveřejněno: **24.07.2024**  
**(Věstník č. 30/2024)**  
(47) Uděleno: **13.06.2024**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **24.07.2024**  
**(Věstník č. 30/2024)**

(56) Relevantní dokumenty:  
GRONDONA I., et al. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology, 1997, Vol. 63, No. 8, p. 3189-3198, ISSN 0099-2240.  
CN 110272833 A; US 2012178624 A1; WO 0183706 A1; US 2023172212 A1.

(73) Majitel patentu:  
Biologické centrum AV ČR, v. v. i., České  
Budějovice, České Budějovice 2, CZ

(72) Původce:  
Ing. Jana Konopická, Ph.D., Veselí nad Lužnicí,  
Veselí nad Lužnicí I, CZ  
Ing. Rostislav Zemek, CSc., Staré Hodějovice, CZ  
MSc. Jiunn Luh Tan, Petaling Jaya, MY  
Dr. Eric Palevsky, Kefar Korazim, IL

(74) Zástupce:  
artpatent, advokátní kancelář s.r.o., Dukelských  
hrdinů 976/12, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:  
**Kmen houby *Trichoderma harzianum* CCM  
9213 a použití tohoto kmene v přípravku  
pro podporu růstu rostlin a pro ochranu  
rostlin proti houbovým patogenům**

(57) Anotace:  
Řešení se týká kmene houby *Trichoderma harzianum* pro podporu růstu rostlin a pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům, který je uložen v mezinárodní sbírce mikroorganismů CCM, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 9213. Spory kmene houby mohou být použity pro podporu růstu rostlin a pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům v přípravku, který obsahuje organický nosič, spory kmene houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213, spory kmene houby *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 a dále entomopatogenní hlístici *Steinernema feltiae* NFUST.

CZ 310080 B6

## Kmen houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 a použití tohoto kmene v přípravku pro podporu růstu rostlin a pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká kmene houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 a použití tohoto kmene v přípravku pro podporu růstu rostlin a pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům.

10

### Dosavadní stav techniky

Ochrana rostlin před houbovými chorobami se provádí převážně pomocí chemických fungicidů, které však představují riziko pro životní prostředí i zdraví lidí. Z tohoto důvodu je použití těchto přípravků postupně omezováno legislativou a hledají se šetrnější způsoby ochrany rostlin. Jednou z možností je využití přirozených antagonistických vztahů mezi organismy, konkrétně hub rodu *Trichoderma*, u nichž byl prokázán antagonistický efekt k celé řadě patogenních hub, jak je popsáno v dokumentu EP 2274414, který popisuje přípravek obsahující kmen *Trichoderma atroviride* jako aktivní složku. *Trichoderma* spp. jsou fakultativní parazité širokého spektra fytopatogenních hub včetně *Alternaria* spp., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem, *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium culmorum* W.G. Smith, *Fusarium graminearum* Schwabe a *Sclerotinia sclerotiorum*. Jakmile *Trichoderma* sp. v půdě rozpozná svého hostitele, její hyfy se začnou bohatě větvit a pomocí těchto hyf mykoparazit kontaktuje hostitele. Když mykoparazit dosáhne hostitele, jeho hyfy se často obtočí kolem hostitelských hyf a následně začnou kolonizovat celou stélku hostitelského druhu houby. Zástupci tohoto rodu jsou kosmopolitní a rostou v celé řadě substrátů. Kromě mykoparazitických účinků jsou známy i schopností žít jako saprotrofové, rozkládat organické zbytky a zvyšovat přístupnost živin pro rostliny. Některé kmeny *Trichoderma* mohou být také entomopatogenní.

30 Další možnost ošetření části rostlin je popsána v dokumentu CZ 307159, který popisuje způsob ošetření semen plazmatem spolu s kmenem houby *Trichoderma virens* CCM 8732, přičemž k ošetření dochází po sběru semen v plazmovém výboji za sníženého tlaku. Takové ošetření je sice efektivní, nicméně nepopisuje možnost ošetření rostliny ve fázi růstu, kdy je náchylná na houbové patogeny z půdy a tedy chybí ochrana rostlin proti houbovým patogenům a také není zajištěna podpora růstu rostlin.

Tato nevýhoda je částečně vyřešena v dokumentech EP 2320742 a EP 3194564, které popisují přípravky pro kontrolu chorob rostlin a podporu růstu rostlin pomocí kombinace druhů *Trichoderma harzianum* T22 a *Trichoderma virens* G41 nebo kombinace druhů *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma gamsii* a *Trichoderma asperellum*. Nevýhodou těchto přípravků však je, že poskytují ochranu a kontrolu růstu pouze u vybraných druhů rostlin a proti původcům chorob, jako je *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Pythium* a jiné. Jednou z nevýhod výše popsáných řešení je také nemožnost dlouhodobého skladování přípravků za pokojové teploty.

Úkolem vynálezu je proto najít vhodný, specializovaný kmen rodu *Trichoderma*, který by byl schopný zajistit zvýšenou ochranu rozmanitému počtu druhů rostlin proti houbovým patogenům a také by podporoval růst rostlin zajištěním potřebných živin, dále by byl kompatibilní s entomopatogenní houbou *Cordyceps fumosorosea*, přičemž jeho konidiospory nebo mikrosklerocia by bylo možné adjustovat do nosiče obsahujícího organickou hmotu, čímž by se připravil přípravek, který by bylo možné dlouhodobě skladovat i za pokojové teploty.

Podstata vynálezu

5 Vytčený úkol je vyřešen nalezením kmene houby *Trichoderma harzianum*. Tento kmen byl uložen v mezinárodní sbírce mikroorganismů CCM, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 9213. Druhá identita byla ověřena molekulárně-genetickou analýzou a sekvence je uložena v Genbank pod přírůstkovým číslem MN960375.1.

10 Tento kmen houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 je používán pro podporu růstu rostlin a/nebo pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům.

15 Vytčený úkol je dále vyřešen pomocí přípravku pro podporu růstu rostliny a/nebo pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům, který obsahuje organický nosič a spory kmene houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 o koncentraci nejméně  $1 \times 10^4$  na 1 ml nosiče. Takové složení přípravku patřičně zvyšuje objem kořenového systému a celkovou plochu, kterou může rostlina přijímat živiny, a tedy se zvyšuje rychlost růstu rostliny, dále tento symbiotický vztah *Trichoderma* s rostlinou zamezuje přístupu houbovým patogenům k rostlině.

20 Ve výhodném provedení obsahuje přípravek dále spory kmene houby *Cordyceps fumosorosea* uložený v mezinárodní sbírce mikroorganismů CCM, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 8367 v poměru 1:1 až 10:1 ke sporám kmene houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213. Takový poměr kmenů houby *Trichoderma harzianum* a *Cordyceps fumosorosea* v přípravku poskytuje synergický efekt v účinku přípravku na rostliny.

25 V dalším výhodném provedení obsahuje přípravek dále entomopatogenní hlístici *Steinernema feltiae* kmene NFUST o koncentraci minimálně  $1 \times 10^3$  invazních larev na 1 ml nosiče. Obohacení přípravku o hlístici zvyšuje množství produkované biomasy a zamezuje líhnutí a množení smutnic.

30 Výhodou kmene *Trichoderma harzianum* CCM 9213 je schopnost zajistit zvýšenou ochranu rozmanitému počtu druhů rostlin proti houbovým patogenům a také podpora růstu rostlin zajištěním potřebných živin. Další výhodou kmene *Trichoderma harzianum* CCM 9213 je, že je kompatibilní s entomopatogenní houbou *Cordyceps fumosorosea*, přičemž jeho konidiospory nebo mikrosklerocia je možné adjustovat do nosiče obsahujícího organickou hmotu, čímž se  
35 připravuje přípravek, který je možný dlouhodobě skladovat i za pokojové teploty.

Objasnění výkresů

40 Uvedený vynález bude blíže objasněn na následujících vyobrazeních, kde:

obr. 1 znázorňuje graf produkce spor kmenů hub *Trichoderma sp.* v interakci s patogenem *S. sclerotiorum*,

45 obr. 2 znázorňuje graf produkce spor kmenů hub *Trichoderma sp.* v interakci s patogenem *B. cinerea*,

obr. 3 znázorňuje graf produkce spor kmenů hub *Trichoderma sp.* v interakci s patogenem *R. solani*,

50 obr. 4 znázorňuje graf produkce spor kmenů hub *Trichoderma sp.* v interakci s patogenem *F. culmorum*,

55 obr. 5 znázorňuje graf produkce spor kmenů hub *Trichoderma sp.* v interakci s patogenem *F. graminearum*,

- obr. 6 znázorňuje graf produkce spor kmenů hub *Trichoderma sp.* v interakci s patogenem *F. oxysporum*,
- 5 obr. 7 znázorňuje graf produkce spor kmenů hub *Trichoderma sp.* v interakci s patogenem *F. poae*,
- obr. 8 znázorňuje graf změny koncentrace *Trichoderma harzianum* CCM 9213 a *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 v průběhu skladování půdního substrátu inokulovaného jedním  
10 či oběma druhy hub,
- obr. 9 znázorňuje graf vlivu ošetření půdního substrátu pomocí *Trichoderma harzianum* CCM 9213, *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 a *Steinernema feltiae* NFUST na nárůst  
15 biomasy bylin,
- obr. 10 znázorňuje graf vlivu ošetření půdního substrátu pomocí *Trichoderma harzianum* CCM 9213, *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 a *Steinernema feltiae* NFUST na snížení  
výskytu smutnic (Diptera: Sciaridae).

20

#### Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Rychlost růstu a intenzita parazitace *Trichoderma harzianum* CCM 9213 v interakci s  
25 houbovými patogeny rostlin v *in vitro* podmínkách ve srovnání s jinými kmeny rodu *Trichoderma*.

Pro testy byly vybrány tyto druhy houbových patogenů rostlin: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*  
a *Fusarium poae*.

30

Suspenze o standardním titru  $1 \times 10^7$  spor v 1 ml vybraného testovaného druhu hub rodu  
*Trichoderma sp.* byla inokulována ve formě kapky pomocí laboratorní kličky o objemu 10  $\mu$ l na  
okraj Petriho misky o průměru 90 mm. Terčik fytopatogenní houby o průměru 7 mm byl umístěn  
na protilehlou stranu. Kontrolní varianta byla připravena jak pro vybrané kmeny hub rodu  
35 *Trichoderma sp.*, tak i pro fytopatogeny. Fytopatogeny i mykoparaziti byli inokulováni zvlášť na  
oba protilehlé okraje Petriho misky. Petriho misky byly vloženy v plastických sáčcích do  
termostatu o teplotě  $25 \pm 1$  °C. Hodnocení interakcí bylo provedeno sedmý den pomocí  
fotodokumentace a stanovením zóny dotyku a zóny mykoparazitismu.

40 Výsledky ukázaly vysokou rychlost šíření kmene *Trichoderma harzianum* CCM 9213, tab. 1, i  
vysoký stupeň parazitace jednotlivých patogenů tímto kmenem, tab. 2.

45 *Tabulka 1: Průměr ± SE šířky zóny dotyku (v mm) kmenů rodu Trichoderma sp. v interakci s  
vybranými fytopatogenními houbami na Petriho misce 7. den po inokulaci, \*a,b,c: průměry ve  
sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (One way ANOVA,  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD  
test).*

Rostlinný patogen							
Kmen rodu Trichoderma	<i>S.sclerotiorum</i>	<i>B.cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>F.culmorum</i>	<i>F.graminearum</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>F. poae</i>
Kontrola	41,50±0,00 a	41,50±0,00 d	41,50±0,00 a	0,00±0,00 d	0,00±0,00 d	41,50±0,00 f	41,50±0,00 d
<b>ILGA301 – CCM 9213</b>	<b>39,75±0,50 b</b>	<b>54,50±0,58 b</b>	<b>37,00±0,00 bc</b>	<b>66,50±0,58 a</b>	<b>61,75±2,22 ab</b>	<b>56,75±0,50 ab</b>	<b>55,75±1,89 a</b>
ILGA402	35,25±0,50 c	53,50±1,00 b	38,25±0,50 b	65,75±0,50 ab	62,25±0,96 ab	55,00±1,15 ab	53,00±1,41 bc
ILGA501	39,25±0,96 b	53,00±0,82 b	37,00±0,00 bc	67,50±1,00 a	60,75±0,50 ab	55,25±0,96 ab	54,25±0,50 ab
CZKO302	45,75±0,50 a	53,25±0,96 b	37,00±0,00 bc	66,50±0,58 a	62,50±0,58 a	57,75±0,96 a	55,00±0,00 ab
CZRA4	36,75±1,50 b	56,50±1,00 a	38,75±1,50 b	64,50±0,58 b	58,50±1,73 c	51,75±0,50 e	49,75±0,50 c
CZKO4	39,75±0,96 b	50,50±0,58 c	35,25±0,96 d	62,25±0,96 c	59,75±1,50 ab	53,00±1,41 d	48,50±0,58 c
CZKA201	36,00±0,82 b	53,00±0,82 b	33,25±0,50 e	66,50±1,00 a	58,75±1,89 c	54,00±0,00 c	52,00±0,82 bc

5 Tabulka 2: Průměr±SE šířky zóny parazitace (mm) kmenů rodu *Trichoderma* sp. v interakci s vybranými fytopatogenními houbami na Petriho misce 7. den po inokulaci. \*a,b,c: průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné (One way ANOVA,  $\alpha=0,05$ ; Tukey HSD test).

Rostlinný patogen							
Kmen rodu Trichoderma	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. poae</i>
Kontrola	0,00±0,00 f	0,00±0,00 e	0,00±0,00 e	0,00±0,00 e	0,00±0,00 d	0,00±0,00 f	0,00±0,00 e
<b>ILGA301 – CCM 9213</b>	<b>16,00±0,82 c</b>	<b>28,50±0,58 b</b>	<b>18,00±0,82 a</b>	<b>16,50±0,58 ab</b>	<b>21,25±2,22 a</b>	<b>26,25±0,50 a</b>	<b>22,25±0,50 a</b>
ILGA402	17,00±1,15 b	29,50±1,00 b	19,25±0,96 a	17,25±0,50 a	20,75±0,96 a	8,25±1,26 c	20,25±1,71 b
ILGA501	4,50±0,58 de	30,00±0,82 b	14,25±0,50 c	15,50±1,00 bc	6,00±0,00 b	5,00±0,00 e	12,50±0,58 c
CZKO302	6,00±0,82 d	13,00±0,00 c	12,25±0,50 d	0,00±0,00 e	2,75±0,50 c	17,00±0,00 b	4,00±0,00 d
CZRA4	4,00±0,00 de	6,50±1,00 d	17,50±0,58 ab	0,00±0,00 e	3,00±0,00 c	6,50±0,58 d	3,25±0,50 d
CZKO4	26,50±0,50 a	32,50±0,58 a	19,00±0,00 a	3,25±0,50 d	3,50±0,58 c	7,00±0,82 cd	4,50±0,58 d
CZKA201	4,00±0,00 de	30,00±0,82 b	13,25±0,50 cd	16,50±1,00 ab	4,50±0,58 bc	4,50±0,58 e	3,75±0,50 d

10 Příklad 2: Produkce spor *Trichoderma harzianum* CCM 9213 v interakci s houbovými patogeny rostlin v *in vitro* podmínkách ve srovnání s jinými kmeny rodu *Trichoderma*.

Po 14. dnech inkubace hub rodu *Trichoderma* sp. v interakci s fytopatogeny byla stanovena produkce spor mykoparazitických kmenů. Cílem testu bylo stanovit množství vyprodukovaných spor mykoparazitů při interakci s fytopatogeny. Kultura kmenů mykoparazitických hub v interakci s fytopatogeny byly spolu s živnou půdou bramborového dextrózového agarů neboli PDA homogenizovány v mixéru s adekvátním množstvím vody. Pomocí Neubauerovy počítací komůrky byla stanovena produkce spor, která se vyjádřila na jednu Petriho misku. Kontrolní varianta byla připravena ze suspenze mykoparazitů. Mykoparazité byli inokulováni na protilehlé okraje Petriho misky. Výsledná produkce spor byla následně vydělena 2.

Výsledky ukázaly, že kmen *Trichoderma harzianum* CCM 9213 dosahoval vysoké produkce jak samostatně, tak v interakci s většinou rostlinných fytopatogenů, grafy jsou znázorněny na obr. 1 až obr. 7.

5 Příklad 3: Submerzní kultivace *Trichoderma harzianum* CCM 9213

Z konidiospor získaných ze sporulující kultury houby na pevném médiu (PDA) v Petriho miskách bylo připraveno inokulum tak, že se vytvořila suspenze konidiospor ve sterilním roztoku 0,05 % obj. smáčedla Tween 80®. Suspenze byla přefiltrována přes sterilní gázu pro odstranění zbytků mycelia a shluků spor. Pomocí Neubauerovy počítací komůrky byla stanovena koncentrace spor v suspenzi a na základě výsledku byla následně upravena na koncentraci  $1 \times 10^7$  spor na ml suspenze. Příprava suspenze probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu tzv. flow boxu. Do autoklávované Erlenmeyerovy baňky o objemu 1 l bylo odměřeno 380 ml sterilního kapalného média bramborovo-dextróзовého vývaru neboli PDB a pomocí sterilní pipety bylo inokulováno v laminárním boxu 20 ml suspenze houby. Baňka byla uzavřena sterilní kultivační zátkou a poté umístěna na orbitální třepačku. Kultivace probíhala při třepání rychlostí 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C po dobu 4 dnů. Po této době, během které se změnila barva média ze zelené na žlutozelenou, se vytváří mikrosklerocia houby. Výsledná koncentrace houby v médiu byla stanovena řadou ředění a kultivací na selektivním médiu speciálně navrženém pro houby rodu *Trichoderma*. Po 4 až 7 dnech se hodnotil počet kolonií v jednotkách CFU na misce a údaje byly přepočítány na 1 ml média. Výsledky ukázaly, že submerzní kultivací lze dosáhnout koncentrace minimálně  $1 \times 10^7$  CFU/ml média.

25 Příklad 4: Perzistence *Trichoderma harzianum* CCM 9213 v půdním substrátu samostatně a v kombinaci s entomopatogenní houbou *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367.

Bylo odměřeno 500 ml pěstebního substrátu, do kterého bylo naaplikováno postříkem v míchacím zařízení 5 ml suspenze konidiospor *Trichoderma harzianum* CCM 9213 o koncentraci  $1 \times 10^7$  v 1 ml. Ve druhé variantě bylo obdobně aplikováno do 500 ml pěstebního substrátu 5 ml suspenze blastospor *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 o koncentraci  $1 \times 10^7$  v 1 ml. Ve třetí variantě byly do 500 ml substrátu aplikovány obě houby po 5 ml o koncentracích  $1 \times 10^7$  v 1 ml. Ošetřený substrát byl uzavřen v PE sáčcích a uložen do termostatu s teplotou 20 °C. Všechny tři varianty byly provedeny ve třech opakováních. Jednou za měsíc byl odebírán vzorek o hmotnosti 25 g. Ze vzorku byl vytvořen výluh, který byl naaplikován na Petriho misky, pro každý vzorek byla připravena 2 sub-opakování. Houba *Cordyceps fumosorosea* byla kvantifikována pomocí média na bázi dodine a *Trichoderma harzianum* na selektivním médiu speciálně navrženém pro houby rodu *Trichoderma*. Po 4 až 7 dnech se hodnotil počet kolonií v jednotkách CFU na misce a údaje byly přepočítány na 1 ml substrátu.

40 Výsledky ukázaly, že koncentrace hub se v průběhu šesti měsíců jen mírně snížila a že půdní substrát je vhodným nosičem, zobrazeno na obr. 8. Výsledky rovněž potvrdily, že mykoparazitická houba *Trichoderma harzianum* CCM 9213 neměla negativní vliv na přežívání entomopatogenní houby *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367, zobrazeno na obr. 8. Oba druhy bioagens jsou proto kompatibilní a lze je ve výhodném uspořádání kombinovat v jednom přípravku.

Příklad 5: Využití *Trichoderma harzianum* CCM 9213 v kombinaci s *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 pro zlepšení vitality rostlin.

50 Byl proveden pokus s pokojovými rostlinami *Calathea makoyana*. Deset rostlin zakoupených v zahradnictví bylo přesazeno do větších květináčů a umístěno do skleníku s teplotou 20 °C. Rostliny byly chráněny před přímým sluncem a zalévány vodou s nízkou tvrdostí (tj. destilovanou vodou smíchanou s vodovodní vodou v poměru 1:1). Rostliny byly přihnojovány 1x měsíčně komerčním vodorozpustným hnojivem (Wuxal Super, AgroBio Opava s.r.o.) v ředění 1:2000. Pět náhodně vybraných rostlin bylo ošetřeno suspenzí *Trichoderma harzianum*

CCM 9213 o koncentraci  $5 \times 10^7$  v 1 ml suspenze a současně suspenzí *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 o koncentraci  $1 \times 10^7$  v 1 ml suspenze. Dávka ošetření byla 1 mililitr každé suspenze spor na jeden květináč. Zbývajících pět rostlin bylo ponecháno bez ošetření a sloužilo jako kontrola. Za jeden měsíc po ošetření byl stanoven počet zdravých a odumřelých listů u každé rostliny.

Výsledky ukázaly, že na konci pokusu měly ošetřené rostliny 86,7 % listů zdravých, zatímco u neošetřených rostlin bylo zdravých jen 70,2 % listů. Rozdíl je statisticky významný ( $\chi^2$  test.  $P=0,0296$ ).

Příklad 6: Využití *Trichoderma harzianum* CCM 9213 v kombinaci s *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 a hlísticí *Steinernema feltiae* NFUST pro zlepšení růstu rostlin.

Byl proveden skleníkový pokus s řeřichou a směsí bylin vysetých do pěstebního substrátu v květináčích. Čtyřicet květináčů o velikosti přibližně 0,74 l bylo naplněno přibližně 0,52 l organického substrátu pro výsadbu (Natura<sup>®</sup>, Agro CS, Česká republika). Dvacet ze 40 připravených květináčů bylo oseto *Lepidium sativum*, přibližně 30 semen na květináč. Zbývající květináče byly osety směsí bylin: bazalka, kopr, kerblík a petržel; přibližně 10 až 15 semen v papírovém pásku na květináč. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při teplotě 25 °C s dostatkem světla. Zalévaly se dle potřeby a týdně přihnojovaly komerčním kapalným hnojivem (NPK: 8-3,5-5, Wuxal Super, AgroBio Opava, sro) v ředění 1:1000.

Dvacet květináčů, 10 osázených *Lepidium sativum* a 10 směsí bylin, bylo ošetřeno 25. den po výsevu tak, že do každého květináče bylo aplikováno 1 ml suspenze *Cordyceps fumosorosea* CCM 8367 o koncentraci  $5 \times 10^7$  blastospor/ml, 1 ml suspenze *Trichoderma harzianum* CCM 9213 o koncentraci  $1 \times 10^7$  konidiospor/ml a 11 000 invazních larev *Steinernema feltiae* NFUST. Dalších 20 květináčů nebylo ošetřeno a sloužilo jako kontrola. *Lepidium sativum* bylo sklizeno 21 dní po ošetření, tj. 21 DAT. Rostliny byly uřezány co nejbližší substrátu a následně byly sušeny na vzduchu ve skleníku po dobu přibližně 5 dnů neboli 120 h a dále sušeny v sušárně při 60 °C po dobu 3 hodin. Hmotnost suché biomasy byla stanovena pomocí analytických vah (Sartorius, R160P, Německo). Rostliny směsi bylin byly sklizeny 35 dní po ošetření, tj. 35 DAT. Rostliny byly uřezány co nejbližší k substrátu a následně byly sušeny na vzduchu ve skleníku po dobu přibližně 4 dnů neboli 96 h a dále sušeny v sušárně při 60 °C po dobu 7,5 h. Sušení v sušárně bylo rozděleno do 3 relací, kde první dvě relace trvaly každá 3 hodiny a poslední 1,5 hodiny. Po vysušení byly rostliny zváženy na analytických váhách (Sartorius, R160P, Německo). Sklizené květináče byly zakryty průhlednými plastovými nádobami o velikosti přibližně 0,6 l. Na plastových nádobách byly dva boční otvory zakryté jemnou síťovinou pro snížení vlhkosti a zabránění kondenzaci v zakrytém prostoru. Pro zachycení dospělých smutnic (Diptera: Sciaridae), které se ze substrátu líhly byla použita bílá destička o velikosti přibližně 0,006 m<sup>2</sup> opatřená lepem, která byla umístěna do každého květináče. Počet smutnic byl stanoven po 28 dnech od sklizně.

Výsledky prokázaly statisticky průkazný nárůst biomasy, zobrazeno na obr. 9, i snížení počtu smutnic v ošetřeném substrátu oproti kontrolám, zobrazeno na obr. 10.

#### Průmyslová využitelnost

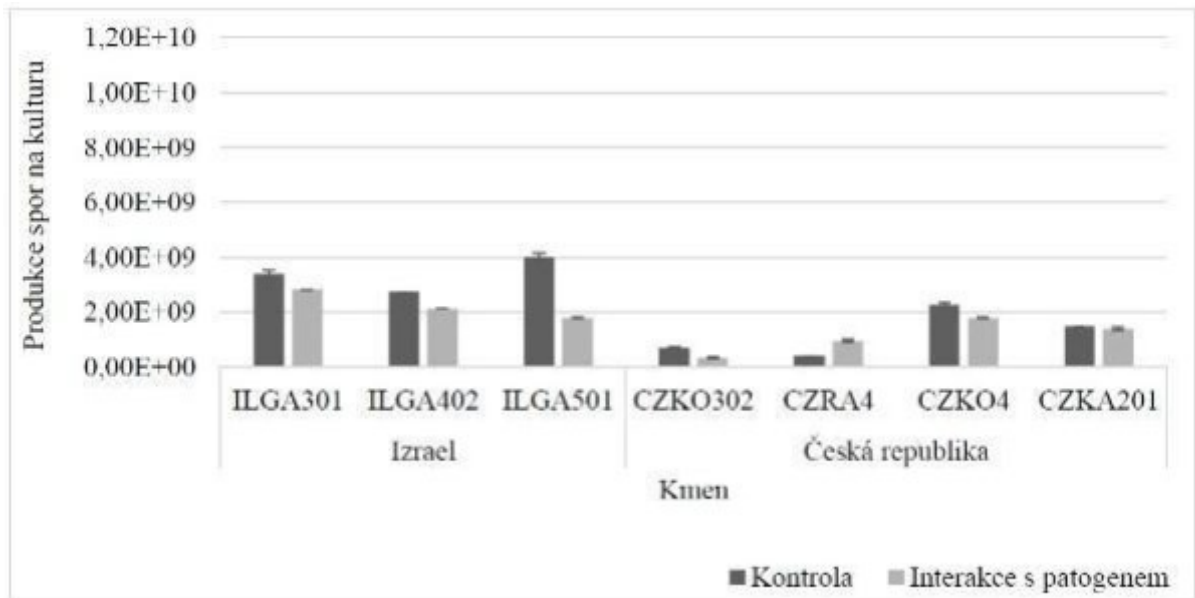
Kmen houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 a použití tohoto kmene pro podporu růstu rostlin a pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům podle tohoto vynálezu lze využít zejména ke zlepšení rozkladu organické hmoty v půdě, uvolnění živin a zvýšení vitality rostlin.

PATENTOVÉ NÁROKY

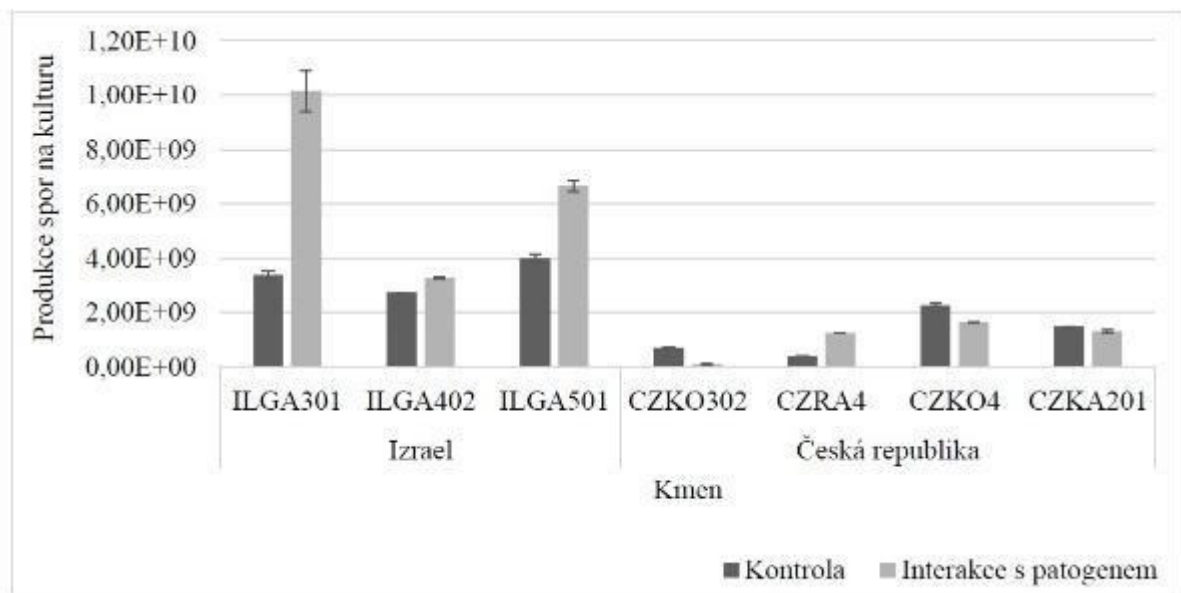
- 5 1. Kmen houby *Trichoderma harzianum* pro podporu růstu rostlin a pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům uložený v mezinárodní sbírce mikroorganismů CCM, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 9213.
2. Použití kmene houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 podle nároku 1 pro podporu růstu rostliny a/nebo pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům.
- 10 3. Přípravek pro podporu růstu rostliny a/nebo pro ochranu rostlin proti houbovým patogenům, **vyznačující se tím**, že obsahuje organický nosič a spory kmene houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 podle nároku 1 o koncentraci nejméně  $1 \times 10^4$  na 1 ml nosiče.
4. Přípravek podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje spory kmene houby *Cordyceps fumosorosea* uložený v mezinárodní sbírce mikroorganismů CCM, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 8367, v množstevním poměru 1:1 až 10:1 ke sporám kmene houby *Trichoderma harzianum* CCM 9213 podle nároku 1.
- 15 5. Přípravek podle nároku 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje entomopatogenní hlístici *Steinernema feltiae* o koncentraci minimálně  $1 \times 10^3$  invazních larev na 1 ml nosiče.

5 výkresů

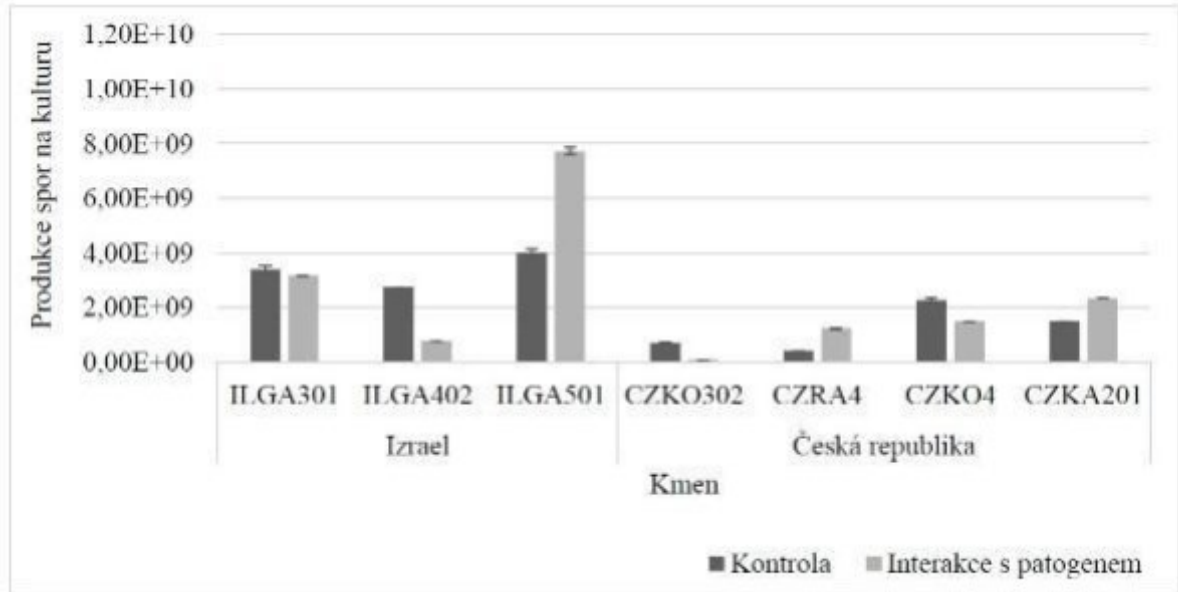




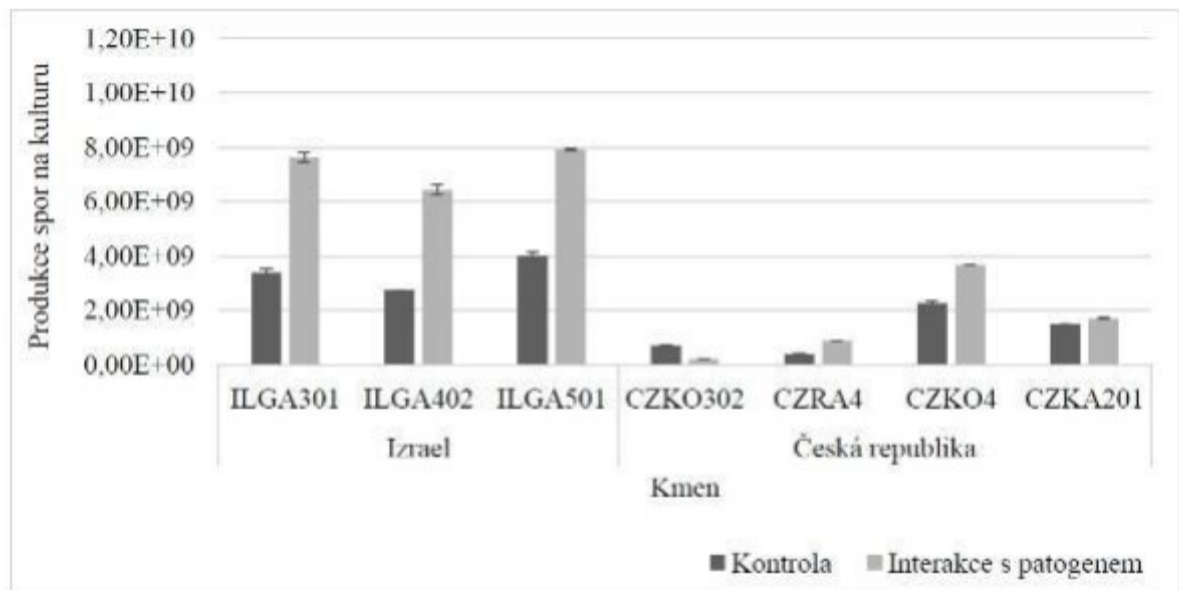
Obr. 1



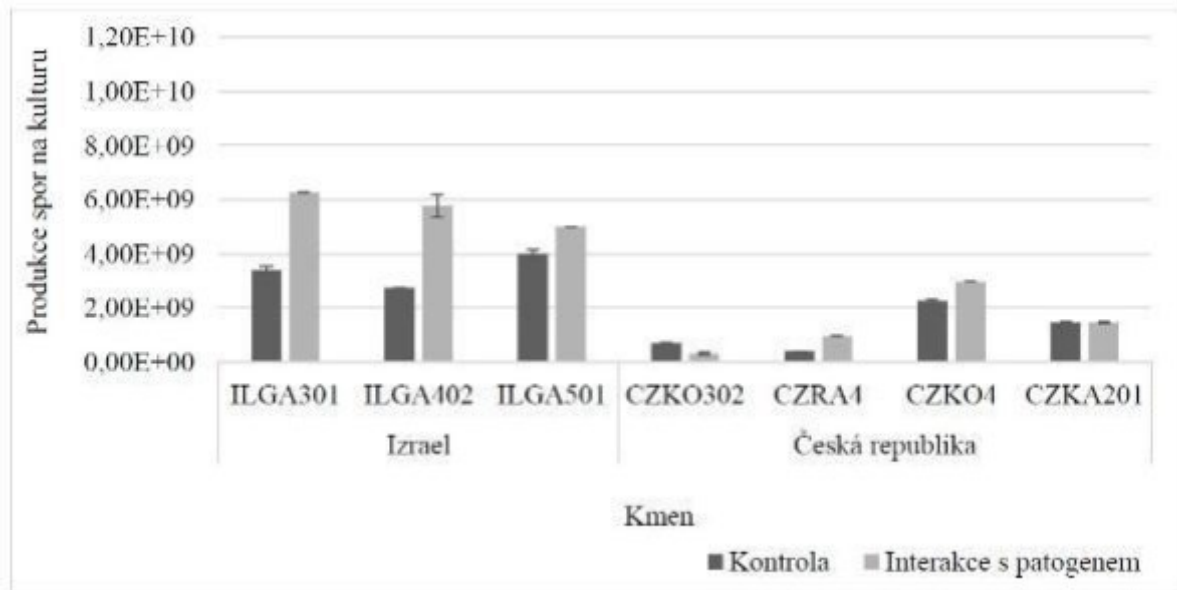
Obr. 2



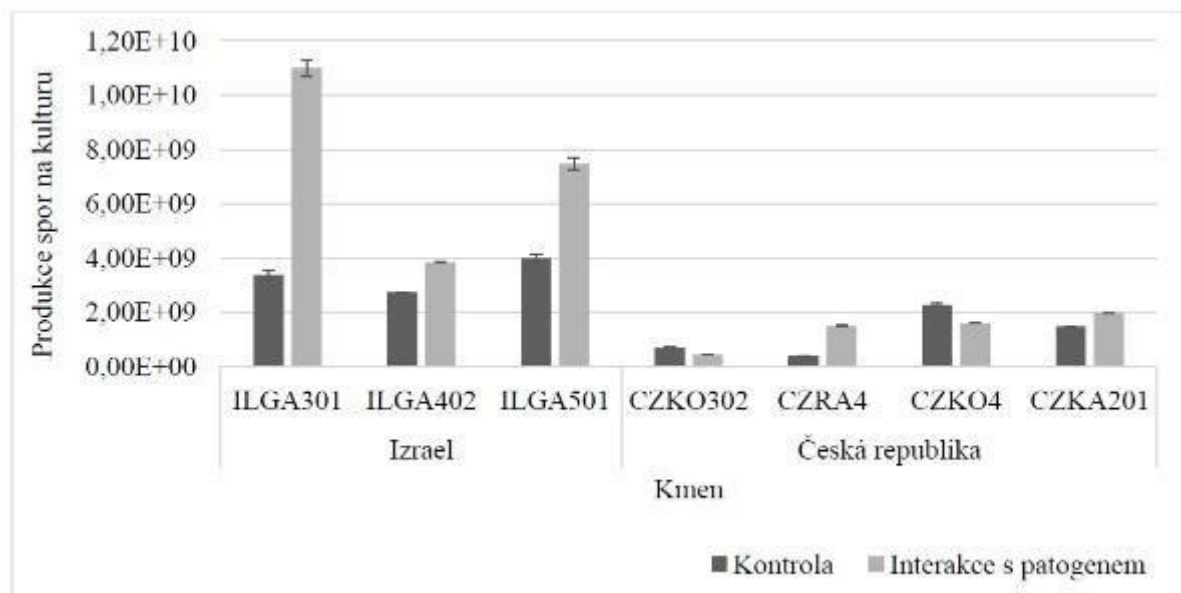
Obr. 3



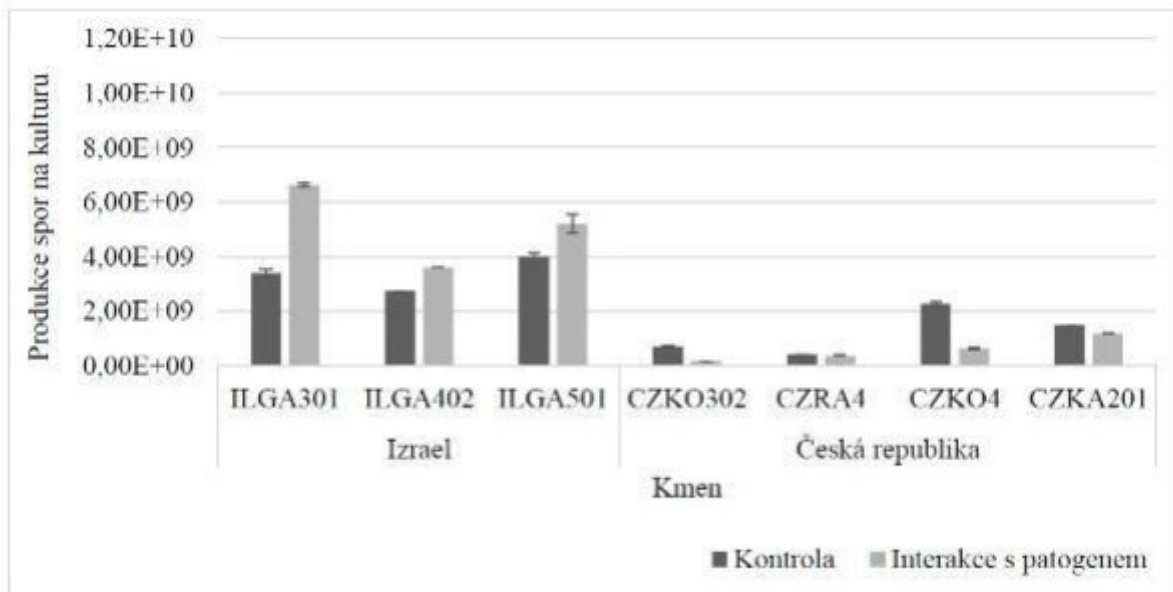
Obr. 4



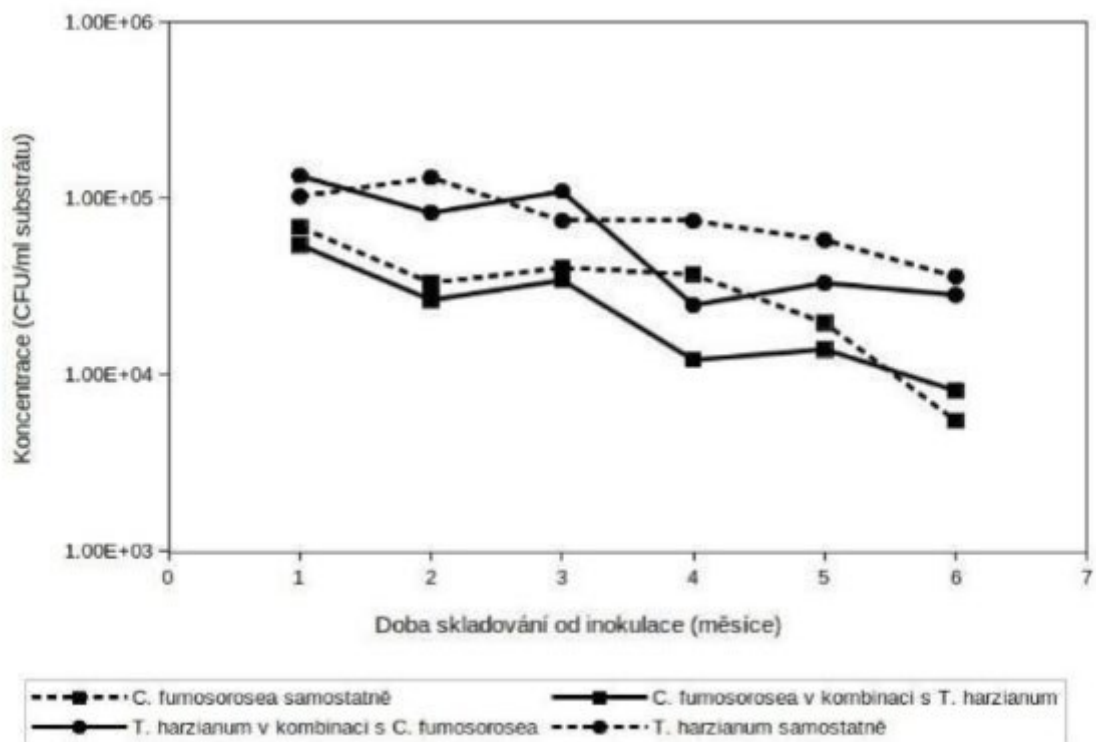
Obr. 5



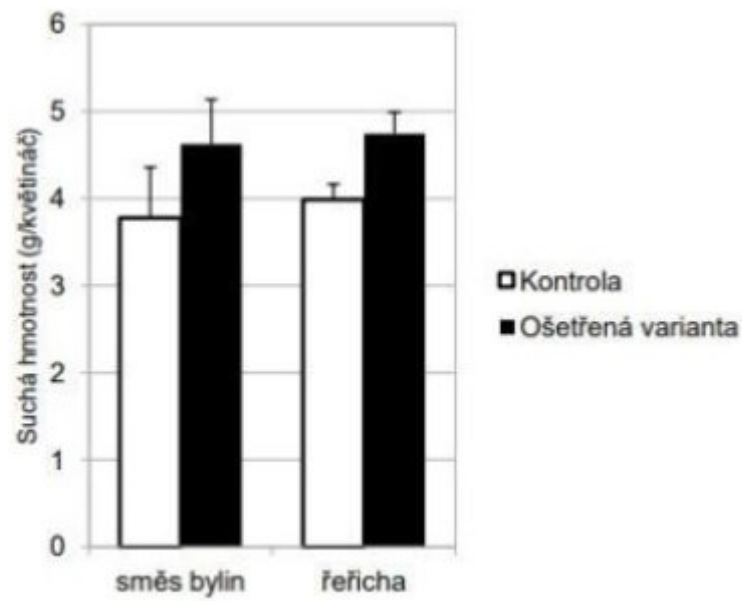
Obr. 6



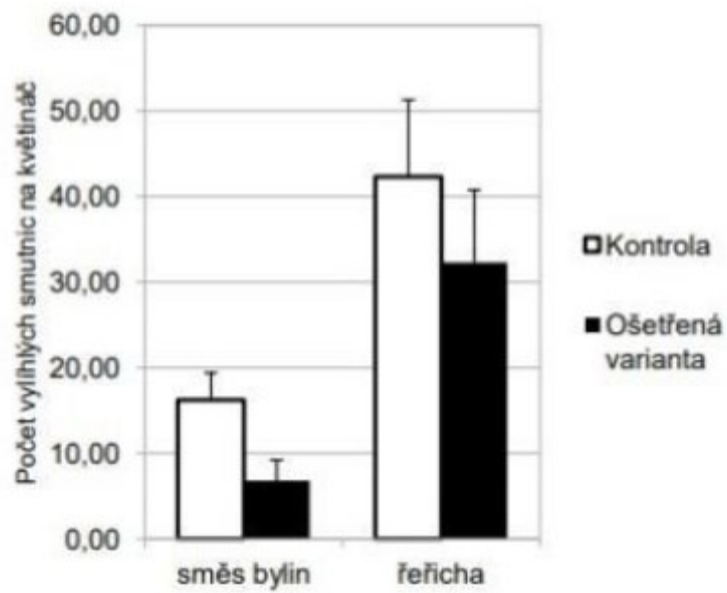
Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10