

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 247

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A01P 3/00 (2006.01)
A01N 63/20 (2020.01)
A01N 25/02 (2006.01)
A01N 25/22 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-41076**
(22) Přihlášeno: **15.06.2023**
(47) Zapsáno: **21.08.2023**

(73) Majitel:
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ

(72) Původce:
Ing. Kateřina Štůsková, Vracov, CZ
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ

(54) Název užitého vzoru:
**Fungicidní přípravek na bázi suspenze
bakterie *Saccharothrix espanaensis* pro
ošetření révy vinné**

CZ 37247 U1

Fungicidní přípravek na bázi suspenze bakterie *Saccharothrix espanaensis* pro ošetření révy vinné

5 Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká fungicidního přípravku inhibujícího růst a množení patogenních hub révy vinné, postihující zejména dřevo a vodivé svazky kmínku révy vinné, zejména houbových patogenů způsobujících onemocnění komplexu grapevine trunk diseases (GTD). Fungicidní přípravek využívá bakterie *Saccharothrix espanaensis* pro inhibici růstu houbových patogenů.

15 Dosavadní stav techniky

Onemocnění komplexu grapevine trunk diseases (GTD) v současné době představují jedno z nejzávažnějších onemocnění révy vinné (*Vitis vinifera* L.). Škody způsobené tímto komplexem se celosvětově odhadují na 1,5 miliardy dolarů. V České republice se škody odhadují na 150 milionů korun.

20 Celosvětově bylo s GTD spojeno 133 druhů hub patřících do 34 rodů a představují největší skupinu patogenních hub, které infikují vinnou révu. Tyto patogeny se velmi snadno šíří a jsou silně virulentní. Do rostliny se dostávají skrze řezné rány (zimní řez, osečkování), rostliny následně chřadnou a odumírají (Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R., Sosnowski, M. R. Managing Grapevine Trunk Diseases with Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. *Plant Disease*, 102(1), 2018, 12–39).

Ochrana vůči GTD je velmi obtížná, zvláště poté, co byl zakázán arsenitan sodný kvůli své toxicitě. Úplná eradikace není možná, proto je kontrola primárně zaměřena na prevenci a zmírnění onemocnění. V současné době se proti GTD používá chemický přípravek na bázi mědi (Talo-Sint®). Dále je v EU registrován přípravek Folicur s účinnou látkou tebuconazol a Beltanol L, který obsahuje 8-hydroxychinolin (8-HCH) sulfát. Měď negativně ovlivňuje mikrobiální společenství spojená s révou vinnou a látky tebukonazol a 8-HCH jsou vysoce toxické pro životní prostředí. Tyto přípravky jsou proto povoleny používat pouze v révových školkách vůči Petriho chorobě. V zapěstovaných vinohradech je kontrola GTD založena zejména na likvidaci symptomatických rostlin.

40 Aktinobakterie (*Actinobacteria*) nebo také aktinomycety jsou gram-pozitivní půdní bakterie schopné kolonizovat rostliny. Jsou známé svojí schopností produkovat mnoho sekundárních metabolitů včetně metabolitů fungicidních. Tyto metabolity mohou poskytovat benefiční účinek hostitelským rostlinám, jako potlačení patogenity některých houbových patogenů (Álvarez-Pérez, J. M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M. Á., Ibanez, A., Díen-Galán, A., Garzón-Jimeno, E., Coque, J. J. R. Use of Endophytic and Rhizosphere Actinobacteria from Grapevine Plants To Reduce Nursery Fungal Graft Infections That Lead to Young Grapevine Decline. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(24), 2017, 01564–17).

Některé půdní bakterie lze použít k inokulaci rostlin s cílem stimulovat růst, a to přímým účinkem, tj. např. produkcí látek stimulujících růst, či nepřímým účinkem, tj. např. antagonistickým účinkem vůči fytopatogenním houbám ke zlepšení zdravotního stavu rostlin.

50 Mezi aktinomycety patří například bakterie *Saccharothrix espanaensis*, izolovaná ze vzorků měkkýšů *Anadara addedoni* odebraných v Japonském moři v Rusku.

Podstata technického řešení

Předkládané technické řešení se týká fungicidního přípravku pro ošetření révy vinné, který eliminuje či omezuje růst patogenních hub způsobujících onemocnění komplexu grapevine trunk diseases (GTD). Fungicidní přípravek obsahuje druh bakterie *Saccharothrix espanaensis*, s výhodou v koncentraci 4×10^6 CFU·ml⁻¹ (Colony Forming Units).

Jako kmen bakterie *Saccharothrix espanaensis* lze použít *Saccharothrix espanaensis* uložený ve sbírce DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Leibniz Institute, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Německo, pod označením DSM 42033.

Předmětem předkládaného technického řešení je tedy fungicidní přípravek pro ošetření révy vinné, který obsahuje kmen bakterie *Saccharothrix espanaensis* a vodu, přičemž koncentrace bakterií *Saccharothrix espanaensis* v přípravku je v rozmezí od 2×10^6 CFU·ml⁻¹ do 6×10^6 CFU·ml⁻¹, s výhodou 4×10^6 CFU·ml⁻¹.

V jednom provedení může přípravek dále obsahovat živné médium ISP2, které stimuluje růst bakterií a usnadňuje bakteriím kolonizaci kořenů sazenic révy vinné.

Množství ISP2 ve fungicidním přípravku je s výhodou v rozmezí od 5 % hmotn. do 10 % hmotn., vztaheno na celkovou hmotnost přípravku.

Fungicidní přípravek podle předkládaného technického řešení je vhodný k aplikaci prostřednictvím hydratace sazenic po dobu 24 hodin před výsadbou tak, aby byl ponořen celý kořenový systém rostliny ve fungicidním přípravku.

Vysvětlivky zkratk a pojmů:

semi-solid PDA = polotuhý bramborový dextrózový agar (potato dextrose agar)

ISP2 (International Streptomyces Project 2) = živné médium běžně používané pro kultivaci bakterií. Obsahuje sladový a kvasinkový extrakt a dextrósu. Litr uvedeného média lze připravit smícháním 4 g kvasničného extraktu, 10 g agaru se sladovým extraktem, 4 g glukosy, 20 g agaru a doplněním do 1 litru vodou.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Velikost inhibiční zóny okolo disků s bakterií *Saccharothrix espanaensis* (S.E.)

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklady uvedené níže dokládají inhibiční působení fungicidního přípravku, obsahující bakterie *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033 na růst a množení houbových patogenů způsobujících onemocnění komplexu grapevine trunk diseases (GTD).

Příklad 1: Příprava fungicidního přípravku na bázi suspenze bakterie *Saccharothrix espanaensis* pro ošetření révy vinné

Fungicidní přípravek dle předkládaného technického řešení byl připraven dle následujícího postupu. Kultura *Saccharothrix espanaensis* byla připravena na ISP 2 médiu (International Streptomyces Project 2), které se skládá ze 4 g·l⁻¹ kvasničného extraktu (yeast extract dextrose; YED), 10 g·l⁻¹ agaru se sladovým extraktem (malt extract agar; MEA), 4 g·l⁻¹ D(+) glukózy a 20 g·l⁻¹ agaru. Inkubace probíhala po dobu 7 dnů při 28 °C a ve tmě. Mycelium rostoucí na

povrchu média bylo seškrabáno sterilní kličkou a přeneseno do 5 ml sterilního PBS pufru. Byly přidány sterilní keramické kuličky, aby se suspenze homogenizovala pomocí vortexu (3 minuty). Homogenizovaná suspenze (5 ml) byla přidána k 500 ml tekutého média ISP2 v 1L Erlenmeyerově baňce a inkubována na orbitální třepačce při 28 °C a rychlosti 120 otáček za minutu po dobu 7 dní.

5 Sedmidenní tekuté kultury byly homogenizovány pomocí mixéru (BlendForce II BL4358, Tefal) na rychlostní stupeň 2 po dobu 60 s. Homogenizovaná kapalná kultura (470 ml) byla zředěna kohoutkovou vodou (4 030 ml) a byla změřena optická hustota ($OD_{600}=0,523$). Pro vyčíslení jednotek tvořících kolonie (CFU) bylo připraveno 100 ml suspenze o stejné optické hustotě za sterilních podmínek. Suspenze byla zředěna metodou desítkového ředění ($100\times - 100\,000\times$) ve

10 sterilním PBS pufru. 100 μ l každého ředění bylo nanášeno na médium ISP2 v duplikátech za použití L-kličky. Misky byly inkubovány při 28 °C po dobu 7 dnů a poté byly spočítány viditelné kolonie. Získaná koncentrace suspenze byla 4×10^6 CFU \cdot ml $^{-1}$ a množství ISP2 v přípravku bylo 10 % hmotn.

15 Příklad 2: *In vitro* testování inhibičního účinku *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033

Nejdříve byly dle Příkladu 1 připraveny kultury bakterie *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033 na ISP 2 médiu a patogenních hub na PDA agaru. Inkubace probíhala po dobu 7 dnů při 28 °C a ve tmě.

20

Pro *in vitro* test inhibičního účinku *Saccharothrix espanaensis* bylo připraveno živné médium semi-solid PDA (24 g \cdot l $^{-1}$ potato dextrose broth + 7.5 g \cdot l $^{-1}$ agaru), do kterého byly přidány homogenizované roztoky s patogeny (Tabulka 1). Všechny testované patogeny jsou komerčně dostupné. Jejich homogenizované roztoky byly připraveny tak, že z připravených kultur houbových

25 patogenů byly vyřezány disky o průměru 10 mm. Disky byly sterilně přeneseny do 5 ml fyziologického roztoku a roztoky byly homogenizovány na míchačce Vortex. Po čtyřicetiminutové inkubaci Petriho misek se semi-solid PDA a roztoky patogenů v laboratorní teplotě byly do středu každé misky aplikovány disky s bakterií *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033 o průměru 5 mm. Následovala aktivace bakterií při teplotě 4 °C po dobu 2 h. Inkubace probíhala ve tmě a konstantní

30 teplotě 25 °C. Všechny varianty byly založeny ve třech opakováních. Kontrolní varianty byly založeny také ve třech opakováních a obsahovaly semi-solid PDA médium s přidávanými homogenizovanými roztoky patogenů a disky ISP2 agaru bez bakterie. Poté, co mycelia patogenů v kontrolních variantách dosáhla okraje misky, byla změřena inhibiční zóna okolo disků s bakteriemi. *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033 vykazovala inhibiční účinky vůči všem

35 testovaným GTD patogenům s výjimkou *Phaeoacremonium minimum*, u kterého nebyla pozorována žádná inhibiční zóna (Obr. 1).

Tabulka 1: Seznam testovaných patogenů komplexu GTD

Patogen	Izolát	Označení
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MEND-F-196	BD I
	MEND-F-0760	BD II
<i>Eutypa lata</i>	MEND-F-0552	EL I
	MEND-F-0759	EL II
<i>Diaporthe ampelina</i>	MEND-F-0754	DA I
	MEND-F-0766	DA II
<i>Dactylonectria torresensis</i>	MEND-F-175	DT I
	MEND-F-174	DT II
<i>Diplodia seriata</i>	MEND-F-0190	DS
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	MEND-F-0176	PC

<i>Phaeoacremonium minimum</i>	MEND-F-0013	PM
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	MEND-F-0454	CLO

Příklad 3: *In planta* testování inhibičního účinku *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033

Pro *in planta* test inhibičního účinku *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033 byla dle Příkladu 1
 5 připravena bakteriální suspenze (koncentrace 4×10^6 CFU·ml⁻¹), která byla aplikována na kořeny
 sazenic révy vinné po dobu 24 hodin před výsadbou. Následovala aplikace patogenu
Dactylonectria torresensis (DT), který na mladých sazenicích způsobuje černání kořenových
 krčků, které je zahrnuto mezi onemocnění GTD komplexu. Pětimilimetrové disky s patogenem
 10 byly aplikovány do oblasti kořenového krčku. Místo aplikace bylo obaleno vlhkou vatou
 a Parafilmem a následovala výsadba sazenic do třilitrových kontejnerů. Po šesti měsících proběhlo
 hodnocení velikosti nekrotizace, výšky sazenic a délky kořenů. *S. espanaensis* DSM 42033 pozitivně
 ovlivnila velikost nekrotizace a délku kořenů, což potvrdilo fungicidní vlastnosti *Saccharothrix*
espanaensis vůči patogenním houbám révy vinné. V případě výšky sazenic nebyl prokázán
 15 statisticky významný rozdíl vůči negativní ani pozitivní kontrole (Tabulka 2).

15 Tabulka 2: Naměřené hodnoty výšky rostlin, délky kořenů a velikosti nekrotizace: bez = sazenice bez
 aplikace mikroorganismu, DT = sazenice s aplikovaným patogenem *Dactylonectria torresensis*,
 S.E. = sazenice s aplikovanou bakteriální suspenzí *S. espanaensis*, a – statisticky významný rozdíl
 20 vůči kontrolám

Bakterie	Patogen	Výška rostliny [cm]	Délka kořenů [cm]	Velikost nekrotizace [cm]
bez	bez	107,60	18,20	21,40
bez	DT	110,40	19,80	22,20
S.E.	bez	129,60	27,40 ^a	0,60 ^a
S.E.	DT	134,80	32,40 ^a	12,80 ^a

Průmyslová využitelnost

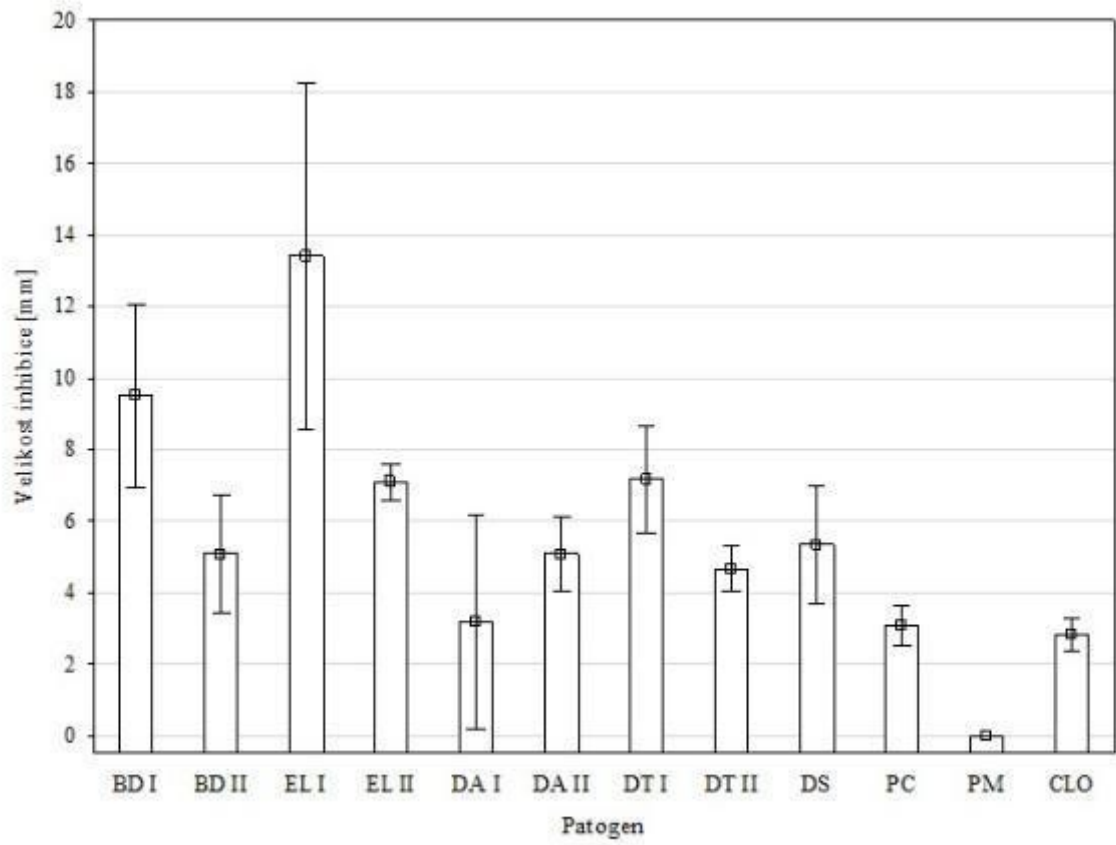
25 Suspenze bakterií *Saccharothrix espanaensis* ve formě antifungálního přípravku nebo pomocného
 přípravku na ochranu rostlin může sloužit k omezení šíření patogenů komplexu GTD nacházejících
 se na révě vinné. Pěstitelé révy vinné by tento přípravek mohli využívat jako preventivní ošetření
 při zakládání nových výsadeb. Dále by přípravek byl využitelný ve školkách produkujících
 sazenice révy vinné.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Fungicidní přípravek pro ošetření révy vinné, **vyznačený tím**, že obsahuje kmen bakterie *Saccharothrix espanaensis* a vodu, přičemž koncentrace bakterií *Saccharothrix espanaensis* v přípravku je v rozmezí od 2×10^6 CFU·ml⁻¹ do 6×10^6 CFU·ml⁻¹.
2. Fungicidní přípravek podle nároku 1, **vyznačený tím**, že koncentrace bakterií *Saccharothrix espanaensis* v přípravku je 4×10^6 CFU·ml⁻¹.
3. Fungicidní přípravek podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že dále obsahuje živné médium.
- 10 4. Fungicidní přípravek podle nároku 3, **vyznačený tím**, že obsah živného média je v rozmezí od 5 % hmotn. do 10 % hmotn., vztaženo na celkovou hmotnost přípravku.
5. Fungicidní přípravek podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 4, **vyznačený tím**, že kmenem bakterie *Saccharothrix espanaensis* je kmen *Saccharothrix espanaensis* DSM 42033.

1 výkres

15



Obr. 1