

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLICA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008-394**
(22) Přihlášeno: **23.06.2008**
(40) Zveřejněno: **22.07.2009**
(Věstník č. 29/2009)
(47) Uděleno: **10.06.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **22.07.2009**
(Věstník č. 29/2009)

(11) Číslo dokumentu:

300 701

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)
A01N 63/04 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 6 660 290.

Zemek R. et al. : Perspectives for the biological control of *Cameraria ohridella*", *Commun Agric. Appl. Biol. Sci.*, Vol. 72(3), 521-526, 2007; Vega F.E. et al. : " Entomopathogenic fungal endophytes", *Science Direct - Biological Control*, Vol. 46, 72-82, 2008.

(73) Majitel patentu:

Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice,
CZ

Prenerová Eva Ing. CSc., Bernartice u Milevska, CZ

(72) Původce:

Prenerová Eva Ing. CSc., Bernartice u Milevska, CZ

Zemek Rostislav Ing. Ph.D., Staré Hodějovice, CZ

Weyda František Doc. RNDr. CSc., České Budějovice,
CZ

Volter Lubomír Mgr., Plzeň, CZ

(74) Zástupce:

Středisko společných činností AV ČR, v. v. i. Patentové
a licenční služby, Národní 1009/3, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

Kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.001.PFR) a způsob likvidace hmyzích škůdců a roztočů

(57) Anotace:

Kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) uložený ve sbírce CCM (Czech Collection of Microorganisms) v Brně, využitelný pro biologickou ochranu substrátů napadených hmyzími škůdci a roztoči. Napadené dřeviny, rostliny apod. se ošetřují blastosporami či konidiosporami tohoto kmene.

CZ 300701 B6

**Kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR)
a způsob likvidace hmyzích škůdců a roztočů**

5 Oblast techniky

Mykoinsekticid, který je využitelný jako šetrný biologický prostředek pro ochranu rostlin a dřevin před hmyzími škůdci a roztoči.

10

Dosavadní stav techniky

15 Ochrana rostlin před hmyzími škůdci se provádí převážně pomocí konvenčních chemických insekticidů. Jejich používání je však z hlediska ochrany životního prostředí a bezpečnosti práce problematické. Hmyz se vůči nim stává postupně stále více rezistentní, což vyvolává potřebu zvyšovat dávky nebo přecházet na jiné typy účinnějších insekticidů. V tomto směru jsou možnosti na hranici vyčerpání. Rovněž zpříšňující se legislativa omezuje tento způsob boje.

20 V České republice má pro svůj vývoj vhodné podmínky hmyzí škůdce klíněna jírovcová, *Cameraria ohridella* (Deschka et Dimič) (Lepidoptera: Gracillariidae). Klíněnka jírovcová byla poprvé zjištěna v roce 1984 u Ochridského jezera v Makedonii mezi Albánií a Řeckem. Tento významný škůdce jírovce se následně začal invazivně šířit celou Evropou. V tomto prostředí má pro svůj vývoj vhodné podmínky a není dostatečně regulována přirozenými mechanismy. Způsobené požerové škody na listech vedou k výraznému oslabení většiny napadených stromů. Dosavadní způsoby regulace spočívají buď v aplikaci neselektivních insekticidů nebo shrabování a spalování opadaného listí. Tyto metody však zároveň hubí i užitečné organismy včetně přirozených nepřátel.

30 Šetrnějším způsobem je využití prostředků biologické regulace, tj. využití přirozených antagonistických vztahů mezi organismy za účelem potlačení populací škůdce bez podstatného narušení 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. Proto se s nimi ve světovém měřítku stále více počítá jako s alternativními prostředky regulace hmyzích škůdců.

40 Takovýmto biologickým prostředkem jsou mykoinsekticidy, které jsou založeny na bázi entomopatogenních hub. Z hlediska praktické biologické ochrany mají dominantní význam zástupci několika klíčových deuteromycet (Hyphomycetes: Moniliales). K nejznámějším patří entomopatogenní houby sdružované v rodech *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria* (*Paecilomyces*), *Tolyocladium* a *Verticillium* (*Lecanicillium*). V těchto rodech je zastoupena řada druhů, z nichž přibližně 25 je v současnosti již využíváno ve formě standardních biopreparátů. Použití mykoinsekticidů v ochraně rostlin před hmyzími škůdci je jedním z potenciálních přístupů v moderní aplikované entomologii a v mnoha zemích dospěl jejich vývoj už do stadia výroby komerčních bioinsekticidů.

50 Entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) (WIZE) Brown & Smith patří v porovnání s ostatními druhy entomopatogenních deuteromycet (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* aj.) k doposud poměrně málo studovaným druhům. Houba *I. fumosorosea* (syn. *P. fumosoroseus*), často uváděna pod zkratkou PFR, je kosmopolitně rozšířený druh široce polyfágní entomopatogenní houby. Většina záznamů týkajících se izolace této houby z různých druhů hmyzích hostitelů (v přirozených podmínkách) uvádí mezi nejčastějšími hostiteli různé zástupce z řádů Lepidoptera, Diptera a Coleoptera. Poprvé byl PFR zjištěn jako patogen přirozeně se vyskytující v populacích molice až v roce 1983, kdy se

55

v populacích molice *T. vaporariorum* ve sklenicích v oblasti Pekingu objevily velmi silné spontánní epizootie, které dočasně zcela decimovaly populace tohoto škůdce. Tento kmen PFR byl odizolován a jako vysoce virulentní vůči molici skleníkové byl označen jako subspecies trinomiálním označením „beijingensis“, tedy jako *P. fumosoroseus* var. *beijingensis*.

5

K podstatné explozi zájmu o tohoto patogena došlo v souvislosti s výrazným vzestupem škodlivosti molice *Bemisia tabaci* v polních agroekosystémech na jihu USA. Od roku 1987 byly v populacích molice bavlníkové na různých hostitelských rostlinách/lokality na Floridě zaznamenávány pravidelné spontánní epizootie vyvolané tímto pato genem a v roce 1988 byl odizolován kmen *P. fumosoroseus* (dále PFR), který vykázal schopnost vyvolávat dramatické epizootie nejen v populacích molice bavlníkové, ale i dalších druhů škůdců. Odizolovaný kmen byl označen jako PFR 97 – kmen Apopka (Apopka – jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen PFR 97 v roce 1987 poprvé zachycen a odizolován Dr. Lance S. Osbornem). Kmen PFR 97 způsobil rozsáhlé epizootie v populacích molice bavlníkové jak ve sklenicích, tak i na polních kulturách. Další experimenty s tímto kmenem prokázaly široce polyfágní základ kmene a vysokou virulenci i vůči mšicím, třásněnkám, larvám některých druhů motýlů, larvám a kuklám vrtalek, a dokonce i vynikající účinnost vůči svlušce chmelové. Na rozdíl od houby *Verticillium lecanii* je druh PFR schopen vyvolávat i nákazu vajíček molic a svlušek. Monosporový izolát původní kultury PFR 97 je v současnosti uložen jak v Centrální sbírce mikroorganismů USA, tak i v kolekci mikroorganismů University Florida Gainesville (UFG).

20

Podstata vynálezu

Jedním z východisek je výzkum a vývoj nových ochranných prostředků založených na ovlivňování fyziologických pochodů v organismu škůdce (tzv. bioracionální insekticidy, tj. prostředky založené na přírodních modelech), nebo na principech biologického boje, při nichž se využívají přirození nepřátelé škůdců, jako jsou predátoři, parazité nebo patogenní organismy. Prostředky biologické regulace využívají přirozených antagonistických vztahů mezi organismy za účelem potlačení populací škůdce bez podstatného narušení přírodní rovnováhy a tím přispívají 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. Proto se s nimi ve světovém měřítku stále více počítá jako s alternativními prostředky regulace hmyzích škůdců. Vhodným biologickým prostředkem je mykoinsekticid na bázi virulentního kmene entomopatogenní houby. Jedná se o kmen houby *Isaria fumosorosea* s vysokou virulencí proti hmyzím škůdcům a roztočům. Kmen *Isaria fumosorosea* je uložen pod označením CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) jako patentová kultura ve sbírce CCM (Czech Collection of Microorganisms) v Brně. Spory tohoto mikroorganismu napadají hmyzí škůdce či roztoče a usmrcují je.

40

Preparát na bázi spor kmene CCM 8367 houby *Isaria fumosorosea* se pro likvidaci hmyzích škůdců (z řádu Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera a Homoptera) a roztočů připravuje submerzní nebo povrchovou kultivací. Pro aplikaci je z koncentrátu biomasy připravena homogenní suspenze spor nebo se spory používají ve směsi s inertním nosičem. Z těch se houba rozrůstá a infikuje hmyzí škůdce a roztoče, kteří odumírají. Výhodou je, že se jedná o přírodní mikroorganismus, takže nedochází k žádnému narušení ekosystému.

45

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad 1

Použití konidiospor kmene CCM 8367 *I. fumosorosea* proti kuklám klíněnky

10 Z kmene houby *Isaria fumosorosea* narostlé na agarové misce (Sabouraudův agar) byly do 50 ml sterilní destilované vody s 10 µl smáčedla Tween setřeny konidiospory. Použitím homogenizéru byla vytvořena homogenní suspenze, která byla naředěna na koncentraci 5×10^7 konidiospor/ml.

15 Ze spadlého listí jírovce bylo vypreparováno 100 hibernujících kukel klíněnky jírovcové. Každá kukla byla na 1 sekundu ponořena do připravené suspenze konidiospor 100 kukel bylo použito pro negativní kontrolu a ty byly ponořeny do destilované vody s obsahem smáčedla Tween. Po té byly kukly položeny na filtrační papír pro odstranění přebytečné suspenze a uloženy do misek s vysokou vlhkostí a inkubovány ve tmě v termostatu při teplotě 23 °C. Ve 12 hodinových intervalech pomocí mechanické stimulace pod binokulárním mikroskopem byla kontrolována životnost kukel napadených houbou. Stanovená mortalita kukel ošetřených konidiosporami je znázorněna na grafu. Je zde i porovnání s negativní kontrolou, tedy mortalitou neošetřených kukel.

Příklad 2

25 Použití blastospor kmene CCM 8367 *I. fumosorosea* proti kuklám klíněnky

30 Kmen houby *Isaria fumosorosea* byl kultivován na orbitální třepačce při 140 cyklech za minutu a teplotě 23 °C na kultivačním médiu o složení o složení: 2% glukóza, 2% maltóza, 2% pepton pro bakteriologii, pH = 5,5. Po 120 hodinách byla kultivace ukončena a z kultivačního média byla izolována biomasa narostlých blastospor a to odstředováním při 2500 ot/min. po dobu 20 min. Z biomasy byla připravena suspenze blastospor ředěním destilovanou vodou na koncentraci 5×10^7 blastospor/ml. Ze spadlého listí jírovce bylo vypreparováno 100 hibernujících kukel klíněnky jírovcové. Každá kukla byla na 1 sekundu ponořena do připravené suspenze blastospor. 100 kukel bylo použito pro negativní kontrolu a ty byly ponořeny do destilované vody s obsahem smáčedla Tween. Po té byly kukly položeny na filtrační papír pro odstranění přebytečné suspenze a uloženy do misek s vysokou vlhkostí a inkubovány ve tmě v termostatu při teplotě 23 °C. Ve 12 hodinových intervalech pomocí mechanické stimulace pod binokulárním mikroskopem byla kontrolována životnost kukel napadených houbou. Stanovená mortalita kukel ošetřených blastosporami je znázorněna na grafu. Je zde i porovnání s negativní kontrolou, tedy mortalitou neošetřených kukel.

Příklad 3

45 Použití konidiospor kmene CCM 8367 houby *I. fumosorosea* proti vajíčkům klíněnky

50 Z kmene houby *Isaria fumosorosea* narostlé na šikmém agaru (Sabouraudův agar) byly do 100 ml sterilní destilované vody s 20 µl smáčedla Tween setřeny konidiospory. Použitím homogenizéru byla vytvořena homogenní suspenze, která byla naředěna na koncentraci 5×10^7 konidiospor/ml. Do této suspenze byl na dobu 1 vteřiny ponořen list jírovce maďalu, *Aesculus hippocastanum*, s naloženými vajíčky klíněnky jírovcové, *Cameraria ohridella* (Deschka et Dimič) (Lepidoptera: Gracillariidae). Další list s vajíčky klíněnky byl ponořen do destilované vody s přidavkem smáčedla Tween a sloužil jako negativní kontrola. Po odsátí přebytečné suspenze pomocí filtračního papíru byly listy uloženy do misek s vysokou vlhkostí a inkubovány ve tmě v termostatu při teplotě 23 °C. Po týdnu byla pod binokulárním mikroskopem kontrolována mortalita vajíček.

Bylo sledováno 102 ošetřených vajíček a 314 jich bylo použito jako negativní kontrola. Mortalita vajíček ošetřených suspenzí s konidiosporami byla 52,94 %. Tedy o 40 % vyšší než u neošetřených vajíček použitých jako negativní kontrola.

5

Příklad 4: Použití blastospor kmene CCM 8367 houby *I. fumosorosea* proti vajíčkům klíněnky

Kmen houby *Isaria fumosorosea* byl kultivován na orbitální třepačce při 140 cyklech za minutu a teplotě 23 °C na kultivačním médiu o složení: 2% glukóza, 2% maltóza, 2% pepton pro bakteriologii, pH = 5,5. Po 120 hodinách byla kultivace ukončena a z kultivačního média byla izolována biomasa narostlých blastospor a to odstředováním při 2500 ot/min. po dobu 20 min. Z biomasy byla připravena suspenze blastospor ředěním ve 100 ml destilované vody s 20 µl smáčedla Tween na koncentraci 5×10^7 blastospor/ml. Do této suspenze byl na dobu 1 vteřiny ponořen list jírovce maďalu, *Aesculus hippocastanum*, s nakladenými vajíčky klíněnky jírovcové, *Cameraria ohridella* (Deschka et Dimič) (Lepidoptera: Gracillariidae). Po odsátí přebytečné suspenze pomocí filtračního papíru byly listy uloženy do misek s vysokou vlhkostí a inkubovány ve tmě v termostatu při teplotě 23 °C. Jako negativní kontrola sloužil list s vajíčky ponořený do destilované vody s přídatkem smáčedla Tween. Po týdnu byla pod binokulárním mikroskopem kontrolována mortalita vajíček. Bylo sledováno 143 ošetřených vajíček a 314 jich bylo použito jako negativní kontrola. Mortalita vajíček ošetřených suspenzí s blastosporami byla 88,81 %. Tedy o 76 % vyšší než u neošetřených vajíček použitých jako negativní kontrola.

25

Průmyslová využitelnost

Biologická ochrana rostlin a dřevin a jiných organických substrátů proti hmyzím škůdcům a roztočům.

30

PATENTOVÉ NÁROKY

35

1. Kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) uložený ve sbírce CCM (Czech Collection of Microorganisms) v Brně.

40

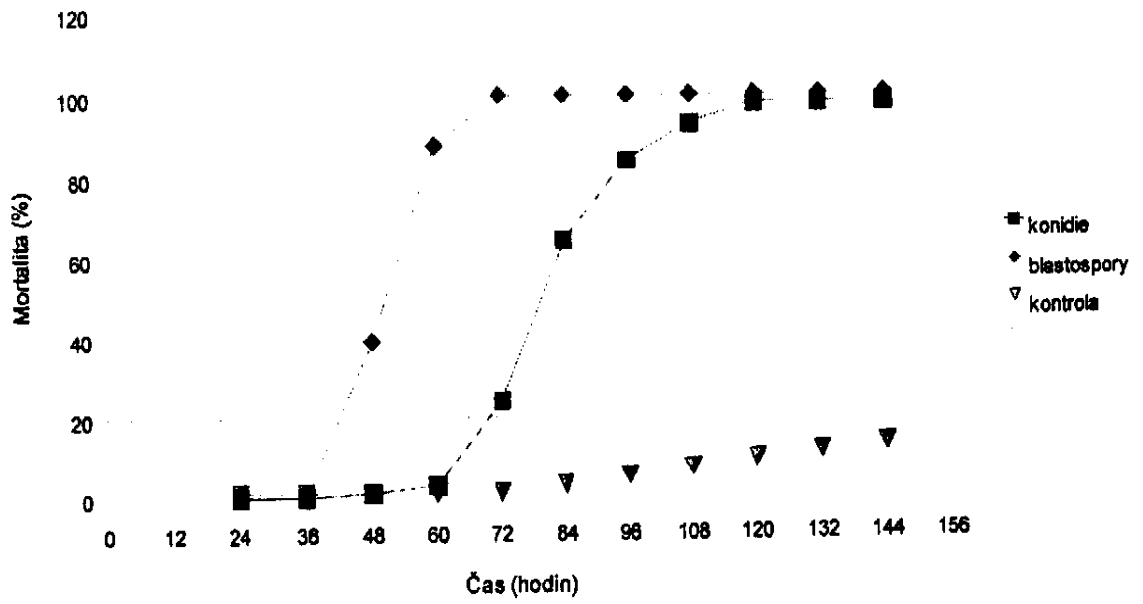
2. Způsob likvidace hmyzích škůdců a roztočů pomocí entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že jejími spory se ošetří napadené rostliny nebo dřeviny nebo substrát organického původu.

45

3. Způsob likvidace hmyzích škůdců a roztočů podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že spory jsou v kapalině nebo v pevném inertním nosiči.

I výkres

Kumulativní mortalita kukel



Konec dokumentu