

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2022-463
(22) Přihlášeno: 10.11.2022
(40) Zveřejněno: 31.01.2024
(Věstník č. 5/2024)
(47) Uděleno: 21.12.2023
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 31.01.2024
(Věstník č. 5/2024)

(56) Relevantní dokumenty:
BARTA, Marek, et al. Hypocrealean fungi associated with populations of Ips typographus in West Carpathians and selection of local Beauveria strains for effective bark beetle control. *Biologia*, 2018, Vol. 73, No. 1, p. 53-65, ISSN 0006-3088; KOCACEVIK, Seda, et al. Virulence and horizontal transmission of Beauveria pseudobassiana S.A. Rehner & Humber in Ips sexdentatus and Ips typographus (Coleoptera: Curculionidae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2016, Vol. 40, No. 2, p. 241-248, ISSN 1303-6173; KREUTZ, J., et al. Efficacy of Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. against spruce bark beetle, Ips typographus L., in the laboratory under various conditions. *Journal of Applied Entomology*, 2004, Vol. 128, No. 6, p. 384-389, ISSN 0931-2048.
CZ 308112 B6, CN 112920956 A.

(73) Majitel patentu:
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České
Budějovice, České Budějovice 2, CZ
MycoTech s.r.o., Opava, Jaktář, CZ
(72) Původce:
Alexandr Jegorov, Rudolfov, CZ
RNDr. Petr Šimek, CSc., České Budějovice, České
Budějovice 7, CZ
RNDr. Josef Satke, Ph.D., Hradec nad Moravicí,
CZ
(74) Zástupce:
artpatent, advokátní kancelář s.r.o., Dukelských
hrdinů 976/12, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Kmen entomopatogenní houby Beauveria pseudobassiana CCM 9191 a použití tohoto kmene jako bioinsekticidu proti lýkožroutu smrkovému a/nebo lýkožroutu severskému

(57) Anotace:
Řešení se týká kmene entomopatogenní houby Beauveria pseudobassiana uloženého v národní sbírce mikroorganismů CCM (Czech Collection of Microorganisms) Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 9191, který je izolovaný přímo z infikovaného těla brouka lýkožrouta smrkového přítomného v lesním porostu. Kmen entomopatogenní houby Beauveria pseudobassiana CCM 9191 může být použit jako bioinsekticid proti lýkožroutu smrkovému a/nebo lýkožroutu severskému ve formě aplikačního roztoku obsahujícího spory ve vodné suspenzi s koncentrací alespoň 10⁶ spor/ml.

Kmen entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a použití tohoto kmene jako bioinsekticidu proti lýkožroutu smrkovému a/nebo lýkožroutu severskému

5 Oblast techniky

Vynález se týká kmene entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a jeho použití pro ochranu lesa proti napadení lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) a lýkožroutem severským (*Ips duplicatus*) a pro kontrolu jeho populace ve směru rozšiřování napadených zón.

10

Dosavadní stav techniky

V důsledku globální klimatické změny dochází v Evropě i na jiných kontinentech k delším obdobím sucha, které mají za následek narušení přirozené rovnováhy lesních ekosystémů, zejména v pěstovaných smrkových monokulturách. Tento jev vede ke snížení vitality lesních porostů a jejich nepřímému oslabení v důsledku nežádoucích změn v ekosystému, mimo jiné i významných změn ve výskytu symbiotických, mykorhizních i entomopatogenních hub. V důsledku těchto jevů dochází ke kalamitnímu přemnožení populace kůrovců z podčeledi *Scolytinae*, kteří jsou schopni zlikvidovat lesní porost včetně zdravých stromů, a to buď radiálním rozšiřováním napadených ložisek nebo frontálním rozšiřováním celé napadené zóny. Velké hospodářské škody způsobují tito kůrovci v České republice, např. v oblasti Česko-moravské vrchoviny a Beskyd.

Nejčastějším způsobem ochrany proti kůrovci je aktivní, mechanické mýcení napadeného lesa spojené s odkorněním stromů a s tím spojená mechanická likvidace vývojových stadií škůdce. Alternativních způsobů ochrany smrkových porostů existuje řada. Převažující metodou ochrany je chemický postřik, který se uplatňuje zejména na skládkách dřeva. Nevýhodou chemického ošetření je častá toxicita pesticidů vůči mnoha dalším necílovým organismům, zanesení nežádoucích reziduí pesticidních přípravků do životního prostředí, vývoj rezistentní populace škůdce vůči účinným chemikáliím, a rovněž jejich poměrně vysoká cena. Další metodou je monitoring a odchyt kůrovců pomocí feromonových pastí (tzv. lapače) nebo tzv. lapáků, pokácených zdravých stromů atraktivních pro brouky. Po napadení se lapáky opět ošetřují insekticidy, které zavrtaný hmyz zahubí a kmen se odkorní.

35

Moderní a perspektivní způsob biologického boje s kůrovci představují aplikace tzv. biopesticidů, které jsou založeny na působení jejich přirozených patogenů, jako jsou entomopatogenní bakterie, houby nebo různé druhy hlístic. Výhodou použití biopesticidů je zejména šetrnější postup k přírodě, protože jde o mikroorganismy přirozeně se vyskytující, které nepředstavují nepředvídatelnou zátěž lesního ekosystému.

40

Mnoho publikací popisuje izolace a charakterizace entomopatogenních hub z různých druhů lýkožroutů. Navzdory řadě slibných laboratorních testů však existuje dosud jen velmi málo příkladů jejich úspěšné aplikace v biologické kontrole těchto škůdců (Mann AJ, Davis TS 2021, Pest Sci Manag <https://doi.org/10.1002/ps.6364>). U většiny popsanych kmenů není navíc uváděna podoba izolátů. Ty se mohou lišit ve způsobu růstu a sporulace, což jsou vlastnosti klíčové pro jejich kultivaci v průmyslovém měřítku. Dále není prakticky známo jejich hostitelské spektrum. To zásadně omezuje použitelnost dosud publikovaných kmenů houbových patogenů kůrovce, které mohou být potenciálně škodlivé pro užitečné druhy hmyzu, zejména pak pro včelu medonosnou v úlech umístěných v lesním porostu.

50

Příkladem použití entomopatogenní houby jako bioinsekticidu je např. použití kmene *Beauveria bassiana* CCM 8382 podle EP 3708003 A1. Kmen *Beauveria bassiana* CCM 8382 je použit ve formě spor aplikovaných v kapalném postřiku a/nebo v rozptýleném prášku. Kmen CCM 8382 *B. bassiana* je účinný proti celé řadě škůdců lesních porostů z podčeledi *Scolytinae* a *Molytinae*,

55

zejména pak klikoroha borového. Čeleď *Molytinae* zahrnuje více jak třicet různých druhů. Čeleď *Scolytinae* jich zahrnuje více jak šest tisíc, čímž se řadí mezi jednu z nejrozmanitějších. Použití citovaného kmene CCM 8382 je tedy obdobně jako v případě jiných popsáných houbových patogenů používaných pro kontrolu populací škůdců toxické pro celou řadu dalších členovců běžně se vyskytujících v prostředí.

Vzhledem k neselektivnímu působení kmenu *B. bassiana* CCM 8382 podle EP 3708003 A1 ho nelze považovat za šetrný k životnímu prostředí, protože může významně ovlivnit biodiverzitu a biologickou rovnováhu lesního ekosystému nežádoucím a neznámým způsobem. Obdobně působí i další kmeny rodu *B. bassiana*, které jsou popsány v patentech CN 110004069 A, KR 101158476 B1 a v řadě literárních publikací jako užitečné k hubení velmi různorodých druhů škůdců. Za významnou nevýhodu hub z rodu *Beauveria bassiana* lze tedy považovat její necílené působení na jiné organismy, zejména na jiné členovce, které také tvoří přirozenou součást ekosystému (Ortiz-Urquiza A, mSystems 6(4), e00766-21, 2021). Nízká specifita tohoto rodu byla potvrzena tím, že v rámci jedné lokality je možno tuto houbu izolovat z mnoha druhů hmyzu (viz např. Hyblerová S., Medo J., Bárta M.: Ann. For. Res. 64(1), 129-145, 2021) nebo (Draganová S.A., Doychev D.D., Pilarska D.K., Takov D.I.: Acta Zool. Bulg., 69(3), 411-419, 2017). Podobně málo specifické jsou i globálně používané kmeny *Isaria* (*Paecilomyces*) nebo *Metarrhizium* (WO 2010/006563 A1) s širokým hostitelským spektrem. Je patrné, že hlavním omezením dosavadních chráněných řešení je nežádoucí působení uvedených bioinsekticidů vůči poměrně širokému souboru mnoha druhů hmyzu. Tím se svými vlastnostmi přibližují chemickým insekticidům, které jsou toxické vůči mnoha dalším necílovým organismům a poškozují přirozené prostředí.

Úkolem vynálezu je proto najít vhodný, specializovaný kmen entomopatogenní houby, který by byl schopen účinně a rychle působit selektivně na cílového hostitele, v tomto případě na dva hlavní druhy kůrovce, lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a lýkožrouta severského (*Ips duplicatus*), vyskytujících se ve středoevropských ekosystémech a omezit jejich populační hustotu, a který by nebyl škodlivý vůči jiným druhům organismů v přírodě, nenarušoval by tedy přirozené prostředí v daném ekosystému.

Podstata vynálezu

Vytčený úkol je vyřešen pomocí kmene entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 uloženého v Mezinárodní sbírce mikroorganismů CCM (Czech Collection of Microorganisms) Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 v Brně, Česká republika, pod přírůstkovým číslem CCM 9191. Tento kmen je izolovaný přímo z dospělce lýkožrouta smrkového, na kterém se přirozeně vyskytuje, tedy jehož je přirozeným patogenem a dále byl vybrán na základě růstových vlastností monosporických izolátů houby. Tento kmen se v laboratorních a polních experimentech nejlépe osvědčil v aplikacích určených k primárnímu omezení výskytu dvou kmenů kůrovce, a to lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a lýkožrouta severského (*Ips duplicatus*), v lesních smrkových monokulturách.

S výhodou je kmen entomopathogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 izolovaný přímo z infikovaného těla brouka lýkožrouta smrkového, který je přítomen v lesním porostu zdravé smrkové monokultury, kde vzájemné působení houbového patogenu a kůrovce je v přírodní rovnováze. Jedná se tedy o kmen, který se přirozeně vyskytuje na konkrétním škůdci, proti kterému má být kmen houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 použit.

Předmětem vynálezu je rovněž použití kmene entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 jako bioinsekticidu proti lýkožroutu smrkovému a/nebo lýkožroutu severskému k omezení jeho výskytu směrem k přírodní rovnováze, která udržuje lesní smrkové monokultury v převážně zdravém stavu. Jedná se cílenou strategii, kdy kmen entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 působí specificky s vysokým účinkem proti lýkožroutu smrkovému

(*Ips typographus*) a lýkožroutu severskému (*Ips duplicatus*) nikoli proti jiným druhům. Tato cílená selektivní strategie v boji proti lýkožroutu smrkovému a lýkožroutu severskému představuje nový přístup s významným ekologickým přínosem, neboť představuje minimální riziko pro necílové druhy hmyzu včetně dalších druhů kůrovců, klikoroha borového a zejména včel, na jejichž ochranu je kladen stále větší důraz.

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž způsob použití entomopatogenní houby jako bioinsekticidu proti lýkožroutu smrkovému a/nebo lýkožroutu severskému v lesních ekosystémech, zejména smrkových monokulturách. Podstata spočívá v použití kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 ve formě aplikačního roztoku obsahujícího spory ve vodné suspenzi s koncentrací alespoň 10^6 spor/ml. Aplikační roztok se může aplikovat, např. v postřiku na lesní porost, který je infikovaný lýkožroutem smrkovým a/nebo lýkožroutem severským.

Výhodou kmene entomopathogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 podle vynálezu je jeho přímá izolace z přírodní populace *Ips typographus* (lýkožrout smrkový) a/nebo *Ips duplicatus* (lýkožrout severský) z lokality jihočeské vrchoviny, kde byl pozorován přirozený výskyt a dlouhodobá rovnováha mezi populací *Ips typographus* a/nebo *Ips duplicatus* a výskytem tohoto kmene, a které naznačují přirozenou adaptaci a hostitelskou specializaci kmene na tento druh škůdce, se specifickým a vysoce virulentním účinkem na *Ips typographus* a pouze na jeden další druh lýkožrouta, konkrétně *Ips duplicatus* (lýkožrout severský).

Kmen *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 byl selektován z přírodních kmenů pomocí monosporických izolátů a jeho vitalita byla systematicky testována pomocí:

a) růstových charakteristik umožňujícím kultivaci kmene v průmyslovém měřítku, tj. kmeny byly testovány paralelně a byla porovnávána velikost mycelia po 5 dnech kultivace. Zároveň byla paralelně testována schopnost kultivace kmenů v submerzní kultivaci, tj. vzájemně byla porovnávána masa mycelia po 10denní submerzní kultivaci. Jako kritérium pro výběr kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 byla vybrána jeho růstová schopnost jak v povrchové, tak submerzní kultivaci;

b) schopnosti masivní produkce spor, standardně kolem 10^{10} spor/ml, tj. kmeny byly testovány paralelně, mycelium narostlé po 20 dnech bylo homogenizováno a titr spor byl určen pomocí Bürkerovy komůrky;

c) virulence vůči vybraným kmenům lýkožroutů, konkrétně lýkožroutu smrkovému *Ips typographus* a lýkožroutu severskému *Ips duplicatus*. Kvantitativně byl tento parametr stanovován jako doba, kdy dojde k nejméně 50% mortalitě brouků po expozici houbových spor. Jako velmi významné a specifické kritérium výběru kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 byla jeho schopnost způsobovat tuto mortalitu u kmene *Ips typographus* za 3 dny, zatímco u všech ostatních kmenů se mortalita začala projevovat po 5 a více dnech. Viz dále příklad 3;

d) vysoké specifitě vůči cílovým organismům dvou druhů kůrovce, lýkožroutu smrkovému a lýkožroutu severskému a statisticky nevýznamné vůči lýkožroutu lesklému, klikorohovi borovému a včele medonosné;

e) vysoké biologické aktivitě kultivátů houby uchovávaných při teplotě 10 °C, přesahující období více než 12 měsíců, ověřovanou v laboratorních pokusech;

f) analýzou odstředěného extraktu buněčných partikulí houby, ve kterém byly pomocí techniky HPLC-MS v myceliu a sporách entomopatogenní houby identifikovány jako biologicky aktivní látky cyklické depsipeptidy, které jsou obvykle exprimovány na povrchu spor a jimž je přiřítána úloha při překonání imunity hostitele a jsou považovány za markery virulence. Jako významné a specifické kritérium pro výběr kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 byla jeho schopnost

produkovat beauverolidu M, zatímco u ostatních kmenů byla produkce tohoto markeru nižší nebo vůbec žádná.

Monosporický izolát kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 byl v souhrnu vybrán po pečlivém zhodnocení kritérií a) až f) u souboru 12 izolátů hub kultivovaných za stejných podmínek.

Výhodou kmene entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 podle vynálezu je jeho přirozený původ, přičemž nebyl pozorován jeho výskyt na necílených organismech a následně byla jeho druhová specifita ověřena v laboratorních pokusech. Specifickou výhodou kmene entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 je vysoká virulence vůči lýkožroutu smrkovému *Ips typographus* a lýkožroutu severskému *Ips duplicatus*. Další výhodou kmene entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 je prokázaná absence virulence vůči včele medonosné. Další výhodou tohoto kmene entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 je výběr monosporického izolátu umožňujícího kultivaci kmene v průmyslovém měřítku.

Způsob aplikace postřikem umožňuje reintrodukcí houby do lesního prostředí, cíleně do lesní padanky po období, kdy došlo k jejímu vymizení vlivem vysokých teplot, sucha nebo jiných vnějších vlivů. Přírodní houbový preparát je do prostředí vnášen za účelem obnovení rovnováhy mezi výskytem kůrovce a houby v přírodním ekosystému. Její spory se roznášejí přenosem na prachových částicích v životním prostředí nebo jsou roznášeny infikovanými brouky a zůstávají usazeny v půdním lesním podrostu (typicky v hrabance). Kmen entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 vykazuje vysokou stabilitu, celoročně přežívá v lesním ekosystému stejným způsobem jako tomu bylo před zásahem porostu extrémními klimatickými podmínkami. Po kontaktu s tělem jedince cíleného škůdce lýkožrouta dochází k naklíčení spor a průniku hyfy do jeho tělní dutiny, kde začnou tvořit blastosporu houby, které hostitele během dní usmrtí. Tento proces omezuje populaci škůdce a přispívá tak k obnovení přirozené rovnováhy mezi populací kalamitního hmyzího škůdce a entomopatogenní houbou.

Příklady uskutečnění vynálezu

Charakterizace kmene

Izoláty entomopatogenních hub byly získány pečlivým sběrem brouků lýkožrouta smrkového ze zdravých smrkových kmenů sloužících jako horizontální lapáky v nezasazeném lese, kde panovala přírodní rovnováha mezi výskytem patogenu a zdravého lesního ekosystému. Následná izolace byla poté provedena z kultivací na Petriho miskách na chudém agarovém médiu.

Fenotypické znaky kmene

Pro hodnocení fenotypových znaků izolátů hub kmene entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 byl použit agar se sladovým extraktem (MEA). Inkubace probíhala při 25 °C. Mikroskopické preparáty byly pozorovány v kyselině mléčné s bavlníkovou modří. Identifikace byla provedena především na základě mikromorfologických znaků (Domsch K.H., Gams W., Anderson T. H. 2007, Compendium of soil fungi. 2nd ed. – IHW-Verlag., Rehner SA et al 2011, Mycologia 103, 1055-1073). Mikrofotografie byly pořízeny na mikroskopu Olympus BX51 s kamerou DP72 v programu QuickPHOTO MICRO 3.0. Pro stanovení velikosti bylo měřeno vždy 30 konidií.

Pro hodnocení molekulárních dat byla z čisté kultury mikroskopické houby kmene entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 izolována DNA pomocí komerčního kitu ZR Fungal/Bacterial DNA kit (Zymo Research, USA). Následně byla amplifikována oblast ITS1-5,8S-ITS2 rDNA (dále jako ITS rDNA) a částečná 28S rDNA univerzálními houbovými primery ITS1F/NL4 (White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J 1990,

Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (eds.): PCR protocols: a guide to methods and applications, pp. 315 až 322. Academic Press, San Diego, California, USA). Purifikované produkty byly sekvenovány pomocí primeru ITS1F. Získané sekvence byly manuálně ořezány od nečitelných úseků v programu Geneious a byla hledána největší podobnost získané sekvence se sekvencemi v databázi GenBank pomocí programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvence byly zadávány do databáze opakovaně, s různým nastavením, přičemž jako první bylo provedeno vyhledávání omezené na sekvence z typového materiálu. Určení na druhové úrovni bylo provedeno na základě 100% sekvenční shody, případně shody vyšší než 99 % na minimálně 300 párech bází s pojmenovanou sekvencí (nebo s několika sekvencemi z nezávislých zdrojů) v databázi.

Mikroskopické znaky

Konidiogenní buňky v bazální části zduřelé, lahvicovitého tvaru. Pozorovány i nepříliš zduřelé a dlouhé konidiogenní buňky. Vyrůstají v kulovitých nebo nepravidelných shlucích. Konidie jednobuněčné, hladké, široce elipsoidní až apikulární, $2,2 \text{ až } 3,1 \times 1,6 \text{ až } 2,3 \text{ } \mu\text{m}$ (střední hodnota a směrodatná odchylka: $2,5 \pm 0,2 \times 1,9 \pm 0,2$).

Molekulární analýza

Sekvence ITS rDNA u izolátu *B. pseudobassiana* CCM 9191 byla 100 % shodná se sekvencí z izolátu ARSEF3405, který je typový pro druh *Beauveria pseudobassiana* a s řadou dalších sekvencí tohoto druhu.

25

Příklad 1: Kultivace houby

Kultura *B. pseudobassiana* CCM 9191 byla kultivována na agarem ztuženém médiu ME (HiMedia), obohaceném o 0,05 % K_2HPO_4 a 0,015 % thiamin HCl po dobu 12 dnů při teplotě 23 °C při zachování režimu světlo/tma 12/12 hodin. Po skončení sporulační fáze byla připravena suspenze inokulačních částic v Ringerově roztoku. Suspenze obsahovala buněčné partikule, zejména spory, hyfy a hyfové zlomky. Touto suspenzí z agaru setřeného mycelia bylo naočkováno 25 ml média v 250 ml Erlenmeyerových baňkách s bočními výstupky s inokulačním médiem o složení (% hmotn.) glukóza 2, maltodextrin 1, tryptone (Scharlau, Německo) 2, KH_2PO_4 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05, pH 5,4, a provedena kultivace na rotační třepačce po dobu 120 až 144 hodin při teplotě 23 °C, 150 otáčkách za minutu a excentricitě 6,0 cm.

Homogenní inokulum po skončení inokulační fáze bylo přeočkováno vždy 10 % objemem do 150 ml čerstvě připraveného produkčního média o složení (% hmotn.) glukóza 2, Sorbidex P 16612 (Brenntag) 1, *D*-mannosa 1, hydrolyzát hrachové bílkoviny (Focus Ingredients) 1,5, glycin 0,5, KCl 0,3, NaCl 0,15, CaCl_2 0,01, KH_2PO_4 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,01, $\text{FeSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ 0,005, pH 5,4, a kultivováno za stejných kultivačních podmínek jako při přípravě inokula po dobu 5 až 8 dnů.

Produkčním médiem o stejném složení s dvojnásobným množstvím zdrojů uhlíku a komplexních zdrojů dusíku byl připraven substrát pro stacionární kultivaci na pevném nosiči. Loupané proso bylo promýváno trojnásobně do mírného nabobtnání po dobu 20 minut v teplé demineralizované vodě. Po separaci pevné a kapalné složky bylo proso zalito v celém objemu produkčním médiem a pomalu promícháno po dobu 10 minut. Vlhké proso bylo separováno a rozděleno do 2000 ml Erlenmeyerových baněk, vždy 400 g prosa na 1 baňku. Takto připravený pevný substrát s produkčním médiem byl dvojnásobně sterilizován po dobu 20 minut a teplotě 121 °C se 24h prodeuvou.

Submerzním kultivátem byly naočkovány 2000 ml Erlenmeyerovy baňky s pevným nosičem, vždy 100 ml na 1 baňku a důkladně promíchány, aby byla zajištěna homogenita rozvrstvení

buněčné biomasy v celém objemu. Po 12 hodinách, po naklíčení a aklimatizaci kultury na pevném substrátu bylo provedeno ještě jedno krátké rozmíchání obsahu v baňce. Stacionární kultivace při teplotě 24 °C ve tmě. Po 6 dnech kultivace snížena kultivační teplota na 21 °C. Dále kultivace ještě 12 dnů za stejných kultivačních podmínek.

Příklad 2: Příprava aplikačního roztoku z houbové suspenze

Obsah dvoulitrové Erlenmeyerovy banky byl přenesen do homogenizátoru spolu s 10 litry vody a 20 ml Tween 80. Suspenze byla homogenizována po dobu 2 min (Waring WSB70 5000 otáček/minutu). Vzniklá suspenze byla filtrována sítí (velikost oka 0,7 mm) umožňujícím následnou aplikaci mechanickým rozprašovačem s velikostí trysky (04 – červená nebo 05 – hnědá dle barevného značení ISO). Před aplikací v terénním testování byl roztok naředěn 1:1 vodovodní vodou. Aplikace byla prováděna do 12 h po přípravě aplikačního roztoku, jehož teplota byla udržována v rozmezí 10 až 18 °C. Při průběžných kontrolách na Bürkerově komůrce dosahoval obsah houbových spor průměrné koncentrace 10^{10} buněčných partikulí na 1 litr aplikačního roztoku.

Příklad 3: Specifická účinnost pro cílové organismy

Cílem laboratorních experimentů bylo porovnání účinnosti a rychlosti patogeneze kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 vedoucí k usmrcení brouka hostitelského kůrovce. Pokus byl proveden na Petriho miskách, do které byly dány vždy čtyři vrstvy filtračního papíru z toho spodní navlhčený destilovanou vodou, mezi třetí a čtvrtou vrstvou byli umístěni pokusní brouci a přiklopeni čtvrtou vrstvou, po které byl mechanicky rozetřen houbový materiál tak, aby došlo ke snadnému kontaktu. Celý experiment byl prováděn ve flow boxu, jež byl mezi pokusy vymyt methanolem a sterilizován UV zářením (> 5 min) tak, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci. Kontrolní skupina byla vždy připravena první. Úhyn byl kontrolován po 72 h a následně každých 24 h. Uhynulí brouci byli z misek odstraněni. Laboratorní pokus s lýkožroutem byl proveden v několikanásobném ($n > 15$) opakování počtem 35 až 55 jedinců v každé experimentální skupině.

Laboratorní pokusy s brouky lýkožrouta smrkového a lýkožrouta severského prokázaly 100% mortalitu brouků při kontaktu s kmenem *B. pseudobassiana* CCM 9191 do 3 až 5 dnů při koncentraci spor 10^7 a 10^6 /ml. Viz tabulka 1.

Naproti tomu obdobné testy s lýkožroutem lesklým (*Pytiogenes chalcographus*) a klikorohem borovým (*Hylobius abietis*) nevedly k prokazatelné, statisticky významné infekci těchto lesních škůdců testovaným kmenem *B. pseudobassiana* CCM 9191. Viz tabulka 1.

Brouci použiti pro laboratorní testování byli získáni odchylem za asistence odborných pracovníků Lesů ČR; *Ips typographus* čerstvě vyloupaný z napadené kůry (Ing. Radek Kordač, lesní správa Vyšší Brod), *Hylobius abietis* z cílených pastí (Ing. Karel Říha a Ing. Michal Toufar, lesní správa Telč); *Pityogenes chalcographus* (RNDr. Petr Doležal, Ph.D. z vlastního chovu na Entomologickém ústavu AV ČR).

Tabulka 1: Porovnání vlivu kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 na přežití dospělých brouků druhu *Ips typographus*, *Hylobius abietis* a *Pityogenes chalcographus* (přežití brouků v %). Účinnost je dále statisticky ověřena pomocí Welchova T-Testu, kdy za statisticky průkazné jsou považovány hodnoty < 0.05 ; tato účinnost byla potvrzena pouze pro *Ips typographus*.

	<i>Ips typographus</i>			<i>Pityogenes chalcographus</i>			<i>Hylobius abietis</i>		
	Kontrola	CCM 9191	T-Test	Kontrola	CCM 9191	T-Test	Kontrola	CCM 9191	T-Test
Nominální počet brouků	91	82		40	40		8	24	
Den 0	100%	100%	x	100%	100%	x	100%	100%	x
3	90%	72%	0.003	80%	80%	1.000	100%	92%	0.162
4	78%	49%	0.000	78%	78%	1.000	100%	92%	0.162
5	71%	41%	0.000	60%	55%	0.656	100%	92%	0.162
6	60%	33%	0.000	55%	40%	0.184	100%	75%	0.011
7	45%	17%	0.000	28%	23%	0.611	100%	75%	0.011
8	29%	6%	0.000	-	-	-	50%	75%	0.259
9	13%	0%	0.000	-	-	-	50%	75%	0.259
10	-	-	-	-	-	-	50%	67%	0.450
11	-	-	-	-	-	-	50%	67%	0.450
12	-	-	-	-	-	-	50%	67%	0.450
13	-	-	-	-	-	-	38%	67%	0.187
14	-	-	-	-	-	-	38%	58%	0.341
Směrnice:	-0.1072	-0.1549	-	-0.13	-0.1514	-	-0.0558	-0.031	-

Příklad 4: Testování v uzavřených systémech v přirozeném prostředí lesa

- 5 Houbový kmen *B. pseudobassiana* CCM 9191 byl testován v terénních podmínkách za přirozené denní teplota/humidity v uzavřených venkovních experimentech. Jako základ byly použity zahradní fóliovníky (NOHEL GARDEN Foliovník GREENHOUSE 1,8 x 1,4 x 0,9 m), v němž bylo umístěno 4 až 6 čerstvých smrkových polen o průměru přibližně 15 cm. Spodní 1 m výšky stromu byl z experimentu vyřazen stejně jakožto vrcholová část, zbylá část byla zkrácena na 1 m délky. Polena byla vypodložena tak, aby nedocházelo k přímému kontaktu se zemí. Brouci byly navíc od okolního přírodního lesního prostředí fyzicky odděleni přilepením foliové podlahy. Tím byl zajištěn lepší monitoring brouků, kteří se do polen nezavrtali. Do každého stanu bylo umístěno cca 1000 dospělých jedinců *Ips typographus*, kteří byli infikováni postříkem aplikačního roztoku připraveným dle příkladu 2. Vyhodnocení probíhalo pomocí součtu brouků (infikovaných vs. neinfikovaných) po oloupání polen na konci experimentu za 9 až 21 dní.

Experiment prokázal, že významná část brouků umírá před nebo při zavrtání. Dále bylo prokázáno, že pokud polena byla napadena v přírodě ještě před pokusem, došlo vzájemným kontaktem s infikovanými brouky k následnému odumření všech dospělých jedinců (charakteristicky obalení bílým myceliárním povlakem). Následná reizolace houby kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 z těchto jedinců prokázala zavlčení houby pomocí infikovaných brouků pod kůru smrkového polena. Celková mortalita u brouků druhu *Ips typographus* byla vyšší než 90 %.

25 Příklad 5: Specifická účinnost pro necílové organismy

Cílem testu bylo zjištění virulence kmene *B. pseudobassiana* CCM 9191 vůči včele medonosné (*Apis mellifera*). Test akutní kontaktní toxicity byl proveden podle normy OECD Test No. 214 (1998). Pro experiment bylo použito celkem 90 dospělých dělnic rozdělených do třech skupin po třech, každá s trojitým opakováním. Včely byly umístěny do síťovaných klecí 14x16x16 cm s přístupem k potravě ve formě cukerného roztoku. Každá skupina zvlášť byla vystavena buď aplikačnímu roztoku, aplikačnímu roztoku bez obsahu houbových spor, anebo byla bez expozice

(kontrolní). Roztok byl pipetou nanesen přímo na hřbet hrudi za pomoci pipety. Kontrola úhynu byla provedena po 4, 24, 48 a 72 h.

Tabulka 2: Výsledky testu akutní kontaktní toxicity na včelu medonosnou

5

Skupina	Celkem ve skupině	Přežilo	Uhynulo	% Úhynu	% Po Abbottově korekci
Kontrola	30	27	3	10,0	-
TWEEN 80 0.5 %	30	29	1	3,3	0,0
CCM 9191: 0.5 % TWEEN	30	28	2	6,7	0,0

Kmen *B. pseudobassiana* CCM 9191 nezpůsobuje infekci včely medonosné v přímém kontaktu.

10 Průmyslová využitelnost

Kmen entomopatogenní houby *B. pseudobassiana* CCM 9191 podle tohoto vynálezu může být použit pro specifickou biologickou kontrolu výskytu brouků druhů *Ips typographus* a *Ips duplicatus*. Kontrola populace kmene může být prováděna různými způsoby na základě přímé ochrany napadeného lesa nebo na základě reintrodukce tohoto kmene do ekosystémů, které byly přechodně narušeny klimatickými změnami.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kmen entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* uložený v Mezinárodní sbírce mikroorganismů CCM, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, pod přírůstkovým číslem CCM 9191 izolovaný z lýkožrouta smrkového.
2. Kmen entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 podle nároku 1, který je izolovaný z infikovaného těla brouka lýkožrouta smrkového přítomného v lesním porostu.
3. Použití kmene entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 podle nároku 1 nebo 2 jako bioinsekticidu proti lýkožroutu smrkovému a/nebo lýkožroutu severskému.
- 10 4. Použití kmene entomopatogenní houby *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 podle nároku 3 ve formě aplikačního roztoku obsahujícího buněčné partikule, zejména spory, ve vodné suspenzi s koncentrací alespoň 10^6 spor/ml.