



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 226

(21) PV 1040-88.H
(22) Přihlášeno 18 02 88

(40) Zveřejněno 12 07 90
(45) Vydáno 20 01 92

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
A 01 N 63/02

(75) Autor vynálezu

PÁTEK MIROSLAV ing.,
KUDELA VÁCLAV ing. CSc.,
HOCHMANNOVÁ JITKA RNDr. CSc.,
NEŠVERA JAN RNDr. CSc., PRAHA,
BUČKO MICHAL ing. DrSc., BANSKÁ BYSTRICA,
KRUMPHANZL VLADIMÍR, člen korespondent
CSAV, PRAHA

(54)

Prostředek na ošetření rostlin
napadených koryneformními
bakteriemi

(57) Řešení se týká prostředku bránícího vzniku a rozvoji chorob kulturních rostlin působených koryneformními bakteriemi. Jako účinnou látku obsahuje tento prostředek glutamicin CBII, který je produktem kultivace bakteriálního kmene *Bacillus licheniformis* CBII GCM 4005 ve stacionární fázi růstu. Glutamicin CBII má skupinově specifický baktericidní účinek na koryneformní bakterie. Tuto biologickou aktivitu si uchovává i po působení proteolytických enzymů, po zahřívání na 100 °C 30 min a při skladování při 4 °C po dobu nejméně 3 měsíců. Kromě ochrany vojtěšky proti bakteriálnímu vadnutí je glutamicin CBII využitelný i proti chorobám způsobovaným koryneformními bakteriemi u bramboru, rajčete, kukuřice a některých okrasných rostlin.

Vynález se týká prostředku na ošetření rostlin, které jsou napadány koryneformními bakteriemi způsobujícími onemocnění, projevující se formou vaskulárního vadnutí nebo zakrslosti, proliferace pletiv, slizovitosti (gumovitosti) a deformace květenství, listové mozaiky a skvrnitosti, listové spály a nekrózy stonku. Nalezení a použití prostředků ničících původce těchto chorob a bránících vzniku a rozvoji onemocnění u kulturních rostlin je závažným problémem rostlinné výroby s výrazným hospodářským dopadem.

Z celkového počtu více než 250 původců bakteriálních chorob rostlin patří 16 ke skupině koryneformních bakterií. Největší ztráty na rostlinné produkci způsobují choroby označované souborně jako vaskulární (cévní) vadnutí (tracheobakteriózy). Představují potenciálně nebezpečí pro důležité zemědělské plodiny jako je brambor (choroba vyvolávaná bakterií *Corynebacterium michiganense* pv. *sepedonicum*), kukuřice (*C. michiganense* pv. *nebraskense*), vojtěška (*C. michiganense* pv. *insidiosum*), fazol (*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) a cukrová třtina (*Clavibacter xyli*). Napadené rostliny vadnou, usychají nebo jsou zakrslé a nakonec předčasně odumírají. U brambor může být výnos snížen o 12 až 51 %. Jediný napadený trs bramboru je důvodem pro zamítnutí porostu pro účely množení sadby. V oblastech výskytu snižuje bakteriální vadnutí vojtěšky výnosy v průměru ročně až o 20 %, bakteriální vadnutí rajčete o 10 až 30 %. Za národohospodářsky méně významné se považují proliferace pletiv, slizovitost květenství a mozaika ozimé pšenice, způsobované dalšími druhy koryneformních bakterií. Ochrana rostlin proti bakteriózám je založena hlavně na profylaktických opatřeních. U chorob způsobovaných koryneformními bakteriemi se používají následující alternativní metody ochrany: karanténní opatření, používání osiva a sadby prostého nákazy, šlechtění na rezistenci. V praxi se jen výjimečně využívá moření osiva chemickými látkami nebo fyzikálními metodami k odstranění nákazy na povrchu nebo uvnitř semen. Spektrum baktericidů používaných v ochraně rostlin je velmi úzké. Uplatnění měďnatých přípravků je omezené pro jejich částečnou fyto toxicitu a neuspokojivou účinnost. Z antibiotik se v některých státech využívá streptomycin a oxytetracyklin. Ve většině evropských států (i v ČSSR) jejich používání není dovoleno z obav, že získané rezistence k antibiotiku u fytopatogenních bakterií se může přenést na bakterie patogenní pro člověka. V Austrálii, USA a některých evropských zemích našel v ochraně rostlin uplatnění komerčně vyráběný neproteinový bakteriocin nazvaný agrocin 84. Producentem jsou bakterie nefytopatogenního druhu *Agrobacterium radiobacter*, kmene 84. Bakteriocin aplikovaný na semena nebo kořeny sazenic zabrání vzniku nádorovitosti, jejímž původcem je bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Kromě agrocinu 84 nebyla od éry antibiotik vyvinuta žádná nová sloučenina, která by našla uplatnění v ochraně rostlin. Nový systémový bakteriocid techloflatan je účinný pouze proti původci listové spály rýže, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Naprosto chybí účinné látky schopné penetrovat do rostliny a zasáhnout bakteriální koryneformní patogeny kolonizující vodivý systém.

Výše uvedený nedostatek se odstraní pomocí prostředku podle vynálezu, působícího bakteriálně na koryneformní bakterie, způsobující vaskulární a jiné choroby kulturních rostlin, který jako účinnou látku obsahuje produkt kultivace kmene mikroorganismu *Bacillus licheniformis* CBII CCM 4005.

Uvedená účinná látka, která byla pojmenována glutamicin CBII, je produkována bakteriálním kmenem *Bacillus licheniformis* CBII CCM 4005 při jeho kultivaci ve stationární fázi růstu. Při aplikaci vodného roztoku glutamicinu CBII prostřednictvím kořenového systému nebo na list vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.) předcházející infekci (záměrné inokulaci) této rostliny bakterií *Corynebacterium michiganense* pv. *insidiosum* je účinně potlačován rozvoj bakteriálního vadnutí vojtěšky tím, že glutamicin CBII proniká dovnitř rostliny, kde znemožňuje pomnožení buněk fytopatogena a následnou tvorbu trombů (ucpávek) v cévách rostliny. Glutamicin CBII

působí baktericidně i na koryneformní bakterie vyvolávající proliferaci pletiv, listovou mozaiku - skvrnitost, spálu, slizovitost a deformaci květenství kulturních rostlin.

Glutamicin CBII má skupinově specifický baktericidní účinek na koryneformní bakterie včetně *Corynebacterium michiganense* pv. *insidiosum*. Při jeho preventivní kořenové i foliární aplikaci u vojtěšky seté se výrazně (asi o 50 %) snižuje intenzita choroby (tracheobakteriomy) vyvolávané tímto patogenem. Výhody prostředku podle vynálezu spočívají v tom, že:

- po aplikaci na rostlinu penetruje glutamicin CBII do vnitřních pletiv a svazky cévními je translokován po celém systému rostliny. Rostlinolékařství takový systémový baktericid účinný proti koryneformním bakteriím kolonizujícím cévy xylému a vyvolávajícím vaskulární vadnutí doposud postrádá
- při aplikaci na rostliny nepotlačuje glutamicin CBII ostatní rhizosferní a fyloplanní mikroflóru zahrnující mnohé pro rostlinu prospěšné a saprofytní bakterie
- protože glutamicin CBII je látka bakteriocinového typu s úzkým spektrem účinku, lze předpokládat, že nepředstavuje potenciální nebezpečí pro životní prostředí a pro zdraví člověka. Vzhledem k jeho odlišnosti od antibiotik používaných v humánní a veterinární medicíně, při používání glutamicinu CBII v ochraně rostlin nepřichází v úvahu možnost negativních důsledků přenosu determinanty rezistence k němu na bakterie patogenní pro člověka.

Účinná látka - glutamicin CBII - se připraví tak, že se buňky kmene *Bacillus licheniformis* CBII CCM 4005 kultivují ve 100 ml tekuté půdy CY (obsahující na 1 l destilované vody 10 g Bacto-casitone (Difco), 5 g kvasničného extraktu (Difco), 3 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 a 1 ml zásobního roztoku o obsahu 0,5 g $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ a 0,5 g $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ na 100 ml destilované vody) při 30 °C 30 h za třepání. Potom se buňky oddělí centrifugací (6 000 x g, 20 min) a k supernatantu se přidá síran amonný do 70 % saturace roztoku. Tato suspenze se drží při teplotě 4 °C přes noc, vzniklá sraženina se shromáždí centrifugací (6 000 x g, 30 min) a rozpustí v 0,05 M Tris-CHl pufru (pH 8,0; 2 % původního objemu); nerozpustný materiál se odstraní centrifugací. Roztok se zahřívá na 100 °C 10 min a vytvořená sraženina se odstraní centrifugací. U finálního čirého roztoku, obsahujícího látku nazvanou glutamicin CBII, se stanoví inhibiční aktivita vůči indikátorovému kmenu *Brevibacterium flavum* 2117 upravenou metodou popsanou pro bakteriociny (Fredericq P. Ann. Rev. Microbiol. 11, 7 až 22 (1957)). Arbitrární jednotka (AU) aktivity glutamicinu CBII byla definována jako převrácená hodnota nejvyššího ředění, při kterém je ve spojitém nárůstu indikátorové kultury na pevné půdě ještě zřetelná inhibiční zóna.

Glutamicin CBII purifikovaný běžnými chromatografickými technikami nejprve na koloně s gelem Sephadex G-50 (eluce 0,05 M Tris-HCl puforem pH 8,0) a potom na koloně s DEAE-celulózou (eluce nejdříve 0,05 M Tris-HCl puforem pH 8,0 a dále gradientem 0 až 1 M NaCl) vykazuje následující charakteristiky:

- difunduje celofánovou membránou propustnou pro molekuly o maximální hmotnosti 10 000 g/mol
- jeho sedimentační koeficient $s_{20,w}^0$ odpovídá 1,1 S (stanovení ultracentrifugační metodou)
- jeho aktivita se nemění při zahřívání na 100 °C 30 min ani při uchování při 4 °C během 3 měsíců
- je rezistentní k působení chloroformu, trypsinu, chymotrypsinu, pronasy a subtilismu
- je aktivní v intervalu pH 3 až 11, optimum je při pH 7 až 8

- poskytuje barevnou reakci typickou pro glykoproteiny
- podle výsledků elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a spektra $^1\text{H-NMR}$ obsahuje jen velmi málo bílkovinné složky.

Glutamicin CBII má specifický baktericidní účinek na koryneformní bakterie, tedy i na bakteriálního původce vadnutí vojtěšky *Corynebacterium michiganense* pv. *insidiosum*. Preventivní ošetření rostliny roztokem glutamicinu CBII jako ochrana před infekcí tímto fytopatogenem bylo provedeno u vojtěšky seté (*Medicago sativa* L.), kmene 534, a to jednak prostřednictvím kořenového systému (1), jednak aplikací na list (2).

Glutamicin CBII jako prostředek na ošetření rostlin napadených koryneformními bakteriemi je využitelný zejména:

- ve šlechtění a množení rostlin k získání a uchování bakterií prostých klonů rostlin z infikovaných hlíz nebo matečných rostlin, majících hospodářsky mimořádně cenné vlastnosti. Tento způsob využití přichází v úvahu hlavně u rostlin bramboru (infikovaných bakteriemi *Corynebacterium michiganense* pv. *sepedonicum*) a u vojtěšky (infikované *C. michiganense* pv. *insidiosum*) při tvorbě tzv. syntetických odrůd
- k moření semen rajčete proti *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* a obilí kukuřice proti *C. michiganense* pv. *nebraskense*
- k ošetření kořenů sazenic rajčete před výsadbou a k foliárním postřikům na ochranu proti bakteriálnímu vadnutí rajčete
- k ochraně okrasných rostlin (*Chrysanthemum*, *Lathyrus*, *Pelargonium*, *Asparagus*, *Lilium*, *Verbascum* aj.) proti růstovým deformacím způsobovaným bakteriemi *Corynebacterium fascians* a k ochraně tulipánů proti skvrnitosti, jejímž původcem je *C. flaccumfaciens* subsp. *oortii*.

Kromě doporučeného využití glutamicinu CBII v ochraně hospodářsky významných rostlin jsou reálné předpoklady (založené na skupinové specifičnosti baktericidního účinku glutamicinu CBII) pro využití glutamicinu CBII v oblasti taxonomie bakterií.

Příklad 1. Preinfekční kořenová aplikace

49 rostlin vyrostlých ve skleníku bylo ve stáří 56 dní ponořeno svými kořeny do sterilního vodného roztoku glutamicinu CBII o aktivitě 6,5 AU po dobu 12 h a ihned potom do suspenze *Corynebacterium michiganense* pv. *insidiosum* (inokulace) také po dobu 12 h. Po inokulaci byly rostliny umístěny v japanu. Hodnocení účinnosti glutamicinu CBII proti bakteriálnímu vadnutí vojtěšky bylo provedeno po 65 dnech růstu pokusných rostlin od inokulace stanovením intenzity choroby (u každé rostliny byl stanoven stupeň napadení podle histologických příznaků na příčném řezu kořenem a vypočítán index choroby (Kúdela V., Rostl. Výr. 16, 1 041 až 1 050 (1970)) a hmotnosti rostlin v čerstvém stavu (byla vypočtena průměrná hmotnost jedné rostliny a její směrodatná odchylka). Byl zjištěn index choroby 14,35 a průměrná hmotnost 1 rostliny $2,26 \pm 1,30$ g, zatímco paralelně sledovaný soubor 55 pokusných rostlin neošetřených před inokulací patogenní bakterií glutamicinem CBII vykazoval index choroby 27,77 a průměrnou hmotnost 1 rostliny $1,56 \pm 0,86$ g. Intenzita bakteriálního vadnutí rostlin, u nichž byl před inokulací *C. michiganense* pv. *insidiosum* aplikován glutamicin CBII, se tedy snížila o 48 %.

Příklad 2. Preinfekční foliární aplikace

Všechny rostliny rostly po dobu celého pokusu v klimaboxu Conviron při režimu: 16 h světlo, 8 h tma, teplota při světle 18 °C, ve tmě 16 °C, relativní vlhkost vzduchu 70 %.

U 99 rostlin ve stáří 7 dnů byl na děložní lístky postříkem aplikován sterilní vodný roztok glutamicinu CBII o aktivitě 6,5 AU. (a) 42 takto ošetřených rostlin bylo po 1 h infikováno odstřížením vrcholu děložních lístků nůžkami namočenými v inokulu *C. michiganense* pv. *insidiosum* a postříkem tímto inokulem, (b) 57 rostlin ošetřených glutamicinem CBII bylo infikováno stejným patogenem týmž způsobem až po 24 h. Hodnocení účinnosti glutamicinu CBII proti bakteriálnímu vadnutí vojtěšky bylo provedeno po 57 dnech růstu pokusných rostlin od inokulace stejným způsobem jako v případě (1). U rostlin (a) inokulovaných patogenem 1 h po aplikaci glutamicinu CBII byl zjištěn index choroby 19,89 a průměrná hmotnost 1 rostliny $0,32 \pm 0,18$ g, glutamicinem CBII ošetřené rostliny (b) infikované až po 24 h vykazovaly index choroby 10,26 a průměrnou hmotnost 1 rostliny $0,37 \pm 0,19$ g. Kontrolní soubor 53 rostlin neošetřených před inokulací patogenem glutamicinem CBII měl index choroby 22,16 a 1 rostlina průměrnou hmotnost $0,43 \pm 0,27$ g. Při variantě (a) tedy preinfekční foliární aplikace glutamicinu CBII snížila intenzitu choroby o více než 10 %, při variantě (b) téměř o 54 %. Z porovnání variant (a) a (b) lze usuzovat, že foliárně aplikovaný glutamin CBII byl rostlinami přijat do vnitřních pletiv a translokován do xylému, kde jsou lokalizovány patogenní korynebakterie.

Při kořenové aplikaci glutamicinu CBII byly u rostlin vojtěšky pozorovány některé neobvyklé histologické nálezy na řezu kořenem, průměrná hmotnost rostlin oproti kontrolním rostlinám však nebyla snížena. Folíárně aplikovaný glutamin CBII nevyvolával na rostlinách zjevné nekrózy ani chlorózy, pouze u mladých rostlin mírně snižoval jejich průměrnou hmotnost v porovnání s kontrolními rostlinami.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Prostředek na ošetření rostlin napadených koryneformními bakteriemi, vyznačující se tím, že jako účinnou látku obsahuje produkt kultivace kmene mikroorganismu *Bacillus licheniformis* CBII CCM 4005.