



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

204208

(11)

(B3)

/61/ Autorské osvědčení je závislé na autorském
osvědčení č. 199906
/22/ Přihlášeno 17 03 78
/21/ /PV 1718-78/

(51) Int. Cl.³
A 01 N 63/00

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno 15 11 82

(75)

Autor vynálezu

VESELÝ DÁŠA ing. CSc., PRAHA a HEJDÁNEK SLAVOMIL, ROZTOKY u Prahy

(54) Způsob výroby prostředku stimulujícího při aplikaci na semena řepy
cukrové růst vzházejících rostlin a chránícího je proti spále

1

Předmětem čs. autorského osvědčení č. 199906 prvního ze spoluautorů je prostředek stimulující při aplikaci na semena řepy cukrové růst vzházejících rostlin a chránící je proti spále. Tento prostředek obsahuje suspenzi oospor mikromycety druhu *Pythium oligandrum* v kapalné, obsahující živiny a látky podporující klíčení oospor a růst mycelia, jako je kvasniční výtažek.

Přípravek se velmi dobře osvědčil i v polních pokusech, avšak jeho původní způsob výroby stačil jen pro výzkum a vývoj, pro použití ve velkém měřítku byl méně vhodný jak z důvodů ekonomických, tak i technických.

Předmětem vynálezu je nový způsob výroby přípravku stimulujícího při aplikaci na semena řepy cukrové růst vzházejících rostlin a chránícího je proti spále, obsahujícího jako účinnou složku propagační orgány mikromycety druhu *Pythium oligandrum*. Při tomto novém způsobu se pomnožené kultury *Pythium oligandrum* kultivují submerzně za větrání ve sporulační půdě obsahující 1 až 3 % chloridu vápenatého za ozařování viditelným světlem, výhodně světlem modrým nebo zeleným, načež se po skončeném větrání pevné látky oddělí, např. tak, že se obsah tanku nechá sedimentovat, supernatant se oddělí a sediment, obsahující propagule, zejména oospor a gemmy, se konzervuje výhodně šetrným odvodněním. To lze provést např. sprayováním, sušením ve vznosu apod., výhodně za přidání práškovitých látek vázajících vodu a obsahujících živiny, jako jsou cukry, síran amonný apod.

Takto získaný přípravek je vhodný pro dopravu a distribuci. Těsně před aplikací na semena se převede smíšením s roztoky, obsahujícími živiny a látky podporující adhezi, např. s kvasničním autolýzátem nebo výtažkem za přidání roztoku želatiny, peptonu apod. na suspenzi propagulí mikromycety *Pythium oligandrum*. Tato suspenze se pak aplikuje na semena vhodným

způsobem, např. sprayováním, nebo skrápěním ve vznosu v proudu suchého teplého vzduchu v sušárně. Koncentrace roztoků živin, do nichž se sušený přípravek rozmíchá, se volí podle zamýšleného způsobu aplikace na semena, obvykle v rozmezí asi 0,1 až 5 %.

Postup lze v rámci vynálezu různým způsobem obměňovat. Tak např. lze přidávat chlorid vápenatý buď najednou, na začátku nebo v průběhu kultivace, nebo postupně. Výhodné je přidávat chlorid vápenatý až po skončení hlavní části růstové fáze, na začátku nebo před začátkem sporulace. Výhodné postupy jsou popsány v následujících příkladech provedení.

Na většině obvyklých půd se sporulace *Pythium oligandrum* daří buďto špatně, nebo se vůbec nedaří. Vhodné půdy obsahují kromě běžných živin především chlorid vápenatý a příměšený zdroj aminokyselin, např. v podobě kukuřičného výluhu.

Účinnou složkou biopreparátu jsou všechny propagační orgány mykoparazita *Pythium oligandrum*, hlavně oospory a gemmy. Tyto propagule nanesené na semena zaručují potřebnou životnost mykoparazita od nanesení prostředku až do zasetí semen do půdy. Živiny obsažené v preparátu umožňují rychlejší rozvoj mykoparazita, než tomu je u jednoduché vodné suspenze, kde propagule jsou suspendovány v destilované vodě. Parazitární vlákna mykoparazita vyrůstají rychle z těchto zárodků a napadají mikromycety, které jsou přítomny jak na osivu řepy, tak i v půdě a jsou zároveň původci spály (*Aphanomyces* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Phoma betae*, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp.). Velmi důležité je, že účinná složka preparátu, tj. propagule *Pythium oligandrum*, inhibují všechny tyto původce ochrnutí.

Kromě nich inhibují i širší okruh hostitelských mikromycet, které jsou v rhizosféře řepy přítomny a mohly by svým případným antagonismem znemožnit ochrannou úlohu mykoparazita naneseného na semena *Pythium oligandrum* po potřebnou dobu šesti týdnů nebo dobu, kterou rostliny potřebují, aby dosáhly růstové fáze 2 až 4 pravých listů, kdy již akutní spála vzházející řepy neohrožuje. Zjistilo se, že přípravkem jsou inhibovány i houby, které produkují antibiotika, např. *Trichoderma viride*, *T. koningii* a *T. glaucum*.

Protože jsou zárodky *P. oligandrum* inokulací semen introdukovány do půdy v hojnější míře a mohla by vyvstat námitka, že se tím do určité míry narušuje biologická rovnováha tohoto ekosystému, jsou důležitá zjištění o tom, že *P. oligandrum* účinně inhibuje *Gaeumannomyces graminis*, známého původce černání pat stébel obilnin, zejména ozimé pšenice (DEACON, J. W., 1976: Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi. Trans. Brit. mycol. Soc. 66, 383-391. BENDÁŘOVÁ, M. - VESELÝ, D., 1977: Change of Microbial Population in Wheat Rhizosphere in the Presence of *Gaeumannomyces graminis* and *Pythium oligandrum*. Folia Microbiologica. Vol. 22, Mo. 6.

Zásadní význam má však originální zjištění autorů vynálezu o tom, že rhizosféru řepy cukrové osidluje antagonisté, např. *Drechslera* sp. (konidiové stadium od *Cochliobolus sativum*). Tato mikromyceta *P. oligandrum* v půdě rychle ničí. Osídlení semen řepy druhem *Helminthosporium sativum* zjistil první GAMBOGI, 1964 (GAMBOGI, P.: Sulla micoflora dei glomeruli di barbabietola. Università di Pisa. Estratto da Annali della Spezzimentazione Agraria N. S. XVIII, 1964, 56, 815-849).

Autor se však nezmiňuje o antagonistických vlastnostech tohoto organismu. Rovněž tak ani u *P. oligandrum*, které tento autor také našel jako první na semenech řepy, nehovoří o mykoparazitických vlastnostech. Naopak uvádí, že přítomnost *P. oligandrum* na semenech řepy nemá žádný fytopatologický význam a že je považováno jen za kontaminační houbu. Zjištění hyperparazitických vlastností *Drechslera* sp. bylo potvrzeno a ověřeno jak mikrobiologickými analýzami půdy, tak i dalšími modelovými pokusy in vitro. V rhizosféře řepy tak vzniká řetězec fytopatogenních a hyperparazitických hub, který uzavírá *Drechslera* sp. Tuto závislost je možno vyjádřit jednoduchým schématem, kde směr šípek vyznačuje organismus hostitele.

Řepná rostlina ← patogenní houby ← mykoparazit ← antagonisté
(*P. oligandrum*) (Drechslera sp.)

Uvedená závislost znemožňuje, aby po ošetření semen řepy biopreparátem podle vynálezu docházelo v půdě k nadměrnému hromadění na semenech introdukovaných zárodků *Pythium oligandrum*.

Při technologickém postupu submerzní kultivace *P. oligandrum* se dosáhne vysokého stupně fruktifikace a vytváření propagačních orgánů, ozařováním v průběhu kultivace v oblasti viditelného záření, přičemž nejlepších výsledků se dosáhne při použití světlemodrého filtru. Bez přítomnosti světla je fruktifikace poměrně malá. Dokazují to srovnávací pokusy. Byl-li počet oospor při kultivaci bez osvětlení považován za 100 %, pak vzrostl při osvětlení denním světlem na 195 %, při osvětlení zeleným světlem na 247 %, při osvětlení tmavěmodrým filtrem na 257 %, při osvětlení světlemodrým světlem na 333 %.

P ř í k l a d 1

500 g loupaného prosa se důkladně promyje tekoucí studenou vodou a přebytek vody se slije.

Ve 200 ml vody se rozpustí:	ZnSO ₄	50 mg
	KH ₂ PO ₄	150 mg
	MnSO ₄	50 mg
	CaCl ₂	250 mg

Roztok se zahřeje k bodu varu a nalije na promyté proso a za mírného míchání se sporulační médium nechá vstřebat do prosných zrn. Správně připravené proso je nelepivé a každé zrno je jednotlivě oddělené.

Po povaření se nádoba s prosem přikryje a zabalí do izolační vrstvy, kde se ponechá 20 až 30 minut. Po této době se proso rozprostře na filtrační papír v tenké vrstvě a nechá vychladnout a oschnout. Takto připravené proso se rozplňuje po 25 až 30 g (objem 50 ml kádinky) do 500 ml Erlenmayerových baněk. Zátky jsou z buničité vaty a jsou chráněny kalikem nebo gázou.

Sterilizace je provedena v parním autoklávu při teplotě 120 °C po dobu 40 minut. Sterilizace je po 24 hodinách opakována za stejných podmínek. Po každé sterilizaci se proso lehce protřepe.

Vysterilizované proso se očkuje 3 až 4 ml inokula, připraveného z vybrané a ověřené kultury. Je možno očkovat přímo suspenzí oospor nebo vegetativním inokulem.

Kultivace vegetativního inokula je provedena na pomnožovací půdě tohoto složení:

škrob bramborový	30 g
síran amonný	15 g
fosforečnan dras. kys.	5 g
síran hořečnatý	0,5 g
kvasnice sušené	10 g
uhličitan vápenatý	10 g
sójová mouka	50 g
voda	1 000 ml

pH 6,0; sterilizace 120 °C 30 minut

Kultivace je provedena na reciproké třepačce, rozkvy 10,5 cm, 96 kyvů za minutu při teplotě 20 °C, 48 hodin.

Po naočkování se prosa důkladně protřepe a nakonec mírným poklepem vyrovná do stejnoměrné vrstvy.

Kultivace se provádí v termostatu při 18 až 20 °C při relativní vlhkosti vzduchu 80 až 90 % po dobu 10 až 14 dnů. V případě očkování prosa suspenzí oospor je tato připravena z vysporulovaných sporulačních agarů, 2 až 3 kusů smytím do 100 ml sterilní destilované vody.

Po skončení sporulaci prosných konzerv je proveden test sterility a spočítáno množství oospor na 1 g prosa. Prosné konzervy po skončení kultivaci jsou uskladněny při teplotě -10 °C.

Submerzní sporulace:

Pro očkování první vegetativní generace je použita ověřená prosná konzerva, z které byla za aseptických podmínek připravena oosporová suspenze ve 100 ml vody. V očkovacím tanku je připravena pomnožovací půda tohoto složení:

kukuřičný výluh zahuštěný	3 %
sacharóza	3 %
uhličitán vápenatý	0,5 %
pH před sterilizací	5,5-6,0
sterilizace	120 °C 30 minut

Na každých 100 l půdy v očkovacím tanku je použito k naočkování 2 až 3 kusů prosných konzerv a kultivace je provedena při 20 °C 48 hodin při vzdušnění 0,8-1 objem. Během kultivace je sledován nárůst a sterilita.

Po dosažení vhodných fyziologických znaků je pomnožená kultura přeočkována do další generace, která obsahuje sporulační půdu tohoto složení:

škrob bramborový	3 %
dusičnan sodný	0,6 %
fosforečnan dras. prim.	0,15 %
chlorid vápenatý	2,5 %
síran hořečnatý	0,05 %
uhličitán vápenatý	1 %
sójová mouka	2 %
pH	5,0-5,5
sterilizace	120 °C 30 minut

Půda je očkována 10 až 15 % inokula z očkovacího tanku, kultivace je prováděna při 20 °C 120 hodin při vzdušnění 1 objemem. Obsah reaktoru (tanku) se přitom ozařuje žárovkou 500 W s modrým filtrem propouštějícím paprsky od 435 do 480 nm. Během kultivace je sledována v pravidelných intervalech sterilita a tvorba oospor. Při skončení kultivace a před konzervací je provedeno vyhodnocení počtu oospor ve 100 ml kultivované kapaliny.

Po sedimentaci byla kapalina oddělena, sediment částečně vysušen při 20 až 30 °C ve vakuové sušárně, smíšen s 20 až 40 % práškovité sacharózy. V takto upraveném stavu podržely oospory klíčivost po několik měsíců. Před aplikací na semena řepy byl přípravek suspendován v jednoprocenním sterilním roztoku želatiny.

P ř í k l a d 2

Submerzní sporulaci je možno provést na půdě tohoto složení:

sacharóza	3 %
dusičnan sodný	0,6 %
fosforečnan dras. prim.	0,15 %
síran hořečnatý	0,05 %
uhličitan vápenatý	1 %
sójová mouka	2 %

pH 5,5-6,0
sterilizace 120 °C 30 minut

Inokulace 10 až 15 % pomnožovací půdy, 48hodinová kultivace, vzdušnění 0,8 až 1 objem, kultivační teplota 18 až 20 °C a doba kultivace 96 až 120 hodin. Ozařování žárovkou se zeleným filtrem propouštějícím paprsky od 500 do 560 nm. Jinak bylo postupováno jako v příkladu 1.

P ř í k l a d 3

Vhodná submerzní půda s optimálními výsledky ve sporulaci má složení:

kukuřičný výluh zahuštěný	3 %
sacharóza	3 %
chlorid vápenatý	2,5 %

pH 5,5 až 6,0
sterilizace 120 °C 30 minut

Inokulační podmínky jsou stejné jako v předchozích příkladech, kultivační doba je zkrácena na 72 hodin, vzdušnění minimálně 1 objemem. V ostatním bylo postupováno podle příkladu 1.

P ř í k l a d 4

kukuřičný výluh zahuštěný	3 %
sacharóza	3 %
chlorid vápenatý	2,5 %
síran zinečnatý	0,05 %
síran manganatý	0,02 %

pH 5,5 až 6,0
sterilizace 120 °C 30 minut

Inokulace 20 % pomnožovací půdy 48 hodin staré, vzdušnění 0,5 až 0,8 objemu, kultivační doba 96 až 120 hodin a kultivační teplota v rozmezí 20 až 22 °C. V ostatním byl postup jako v příkladu 1.

Ve všech případech po dosažení maximální tvorby oospor je provedena separace kultivační kapaliny a získaný sediment je konzervován vhodnými způsoby tak, aby byla zachována maximální vitalita biopreparátu. Např.: sušení při -10 až +50 °C, sprayováním, odejmutí vlhkosti cukry nebo anorganickými solemi.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby prostředku stimulačního při aplikaci na semena řepy cukrové růst vzcházejících rostlin a chránícího je proti spále, obsahujícího jako účinnou složku propagační orgány mikromycety *Pythium oligandrum* podle autorského osvědčení č. 199906, vyznačený tím, že se pomnožené kultury *Pythium oligandrum* kultivují submerzně za větrání ve sporulační půdě obsahující 1 až 3 % chloridu vápenatého za ozařování viditelným světlem, výhodně světlemodrým nebo zeleným, načež se pevná hmota oddělí, např. tak, že se obsah tanku nechá sedimentovat, supernatant se oddělí a sediment obsahující propagule, zejména oospor a gemmy se konzervuje, výhodně šetrným odvodněním, a takto konzervovaný přípravek se před aplikací na semena smísí s vodným roztokem obsahujícím živiny a látky podporující adhezi, např. kvasničný autolyzát nebo výtažek, želatinu, pepton nebo jejich směsi.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se ke sporulaci použije půd obsahujících kromě 2 až 3 % chloridu vápenatého a minerálních živin zároveň kukuřičný výluh.

3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačený tím, že se šetrné odvodnění provádí sušením za mírné teploty -10 až +50 °C a za přidání práškovitých látek schopných vázat vodu a obsahujících živiny, jako jsou cukry, síran amonný nebo jejich směsi.