

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1997 - 2759

(22) Přihlášeno: 12.03.1996

(30) Právo přednosti:
14.03.1995 US 1995/404076

(40) Zveřejněno: 15.07.1998

(Věstník č. 7/1998)

(47) Uděleno: 10.01.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 12.03.2003
(Věstník č. 3/2003)

(86) PCT číslo: PCT/US96/03376

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 96/028031

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

A 01 N 63/02

A 01 N 43/60

(73) Majitel patentu:

VALENT BIOSCIENCES CORP., Libertyville, IL, US;

(72) Původce vynálezu:

Liu Chi-li, Decatur, IL, US;
Starnes Robert L., Sacramento, CA, US;
Macmullan Anita M., Davidson, NC, US;
Manker Denise C., Davis, CA, US;
Lufburrow Patricia A., Davis, CA, US;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou 12, Praha 7,
17000;

(54) Název vynálezu:

**Kmen *Bacillus thuringiensis* s pesticidním
účinkem**

(57) Anotace:

Kmeny *Bacillus thuringiensis*, NRRL B-21093, NRRL B-21090, NRRL B-21091, NRRL B-21092 a NRRL B-21094, které produkují účinnou látku mající pesticidní účinek a u kterých je v podstatě všechna pesticidní účinnost v supernatantu. Látka je účinná vůči hmyzím škůdcům řádu Coleoptera a podporuje pesticidní účinnost pesticidů, produkovaných rodem *Bacillus*. Způsob potírání hmyzích škůdců řádu Coleoptera, způsob potenciace pesticidní účinnosti pesticidů produkovaných mikroorganismy rodu *Bacillus* a způsob získávání v podstatě čisté uvedené účinné látky.

Kmen *Bacillus thuringiensis* s pesticidním účinkemOblast techniky

5

Vynález se týká nového kmene (kmenů) *Bacillus thuringiensis*, jehož v podstatě veškerá pesticidní účinnost se projevuje v supernatantu směsi, ve které je fermentován. Kmen produkuje látku, která je účinná vůči hmyzímu škůdci (škůdcům) řádu Coleoptera, a která zvyšuje účinnost pesticidů, které tvoří mikroorganismy rodu *Bacillus* (dále „pesticidy *Bacillus*“). Dále se vynález

10

týká konkrétního složení pesticidních prostředků, založených na této látce, které obsahují spolu s touto účinnou látkou nosič nebo pesticid *Bacillus*, chemický pesticid a/nebo virus s pesticidními vlastnostmi. Vynález se také týká způsobů aplikace těchto prostředků za účelem potírání škůdců.

15

Dosavadní stav techniky

Vynález navazuje na udělené patenty US 5 976 563 a US 5 976 564. Oba patenty se tak zařazují do popisu formou citace.

20

Každým rokem se ztrácí značná část světové obchodně významné úrody, včetně potravin, textilu a různých pokojových rostlin poškozením nebo zničením škůdci, což má za následek ztráty, dosahující miliony dolarů. Snahy o jejich potírání se řídí různými strategiemi.

25

Jednou ze strategií je použití širokospektrálních pesticidů, tj. chemických pesticidů s širokým rozsahem aktivity. Používání těchto chemických pesticidů má však mnoho nevýhod. Typickým problémem jejich použití je skutečnost, že mohou ničit v důsledku svého širokého spektra účinků necílové organismy, například užitečný hmyz a parazity destruktivních škůdců. Kromě toho bývají tyto chemické pesticidy často toxické vůči zvířatům a lidem, a cíloví škůdci získávají při opakovaném vystavení těmto látkám odolnost.

30

Jinou strategií je používání biopesticidů, při kterém se využívá přírodních patogenů pro potírání hmyzu a houbových a plevelových kontaminací úrody. Mezi biopesticidy patří bakterie, které produkují toxiny, látky toxické vůči škůdcům. Biopesticidy jsou ve srovnání s chemickými pesticidy obecně méně nebezpečné pro necílové organismy i pro životní prostředí jako celek.

35

Nejvíce používaným biopesticidem je *Bacillus thuringiensis* (B. t.). B. t. je široce rozšířený, aerobní sporulující mikroorganismus. V průběhu sporulačního cyklu produkuje B. t. protein(–y) známý(–é) jako krystalický(–é) delta endotoxin(–y). Tyto látky zabíjejí larvy hmyzu, a proto je B. t. velmi užitečný jako zemědělský pesticid.

40

Některé kmeny, například *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* a *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, vykazují specifickou účinnost vůči motýlům (Lepidoptera). Poddruh *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* vykazuje specifickou účinnost vůči dvoukřídlým (Diptera) (Goldberg, patent US 4 166 112). Další kmeny, například *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Kreig et al., 1988, patent US 4 766 203), jsou podle publikovaných údajů specificky účinné vůči broukům (Coleoptera). Izolace dalších kmenů *Bacillus thuringiensis*, toxických vůči broukům, byla publikována v roce 1986 (Hernstadt et al. Bio/Technology vol. 4, str. 305 až 308, 1986, patent US 4 764 372 z roku 1988). Tento kmen, pojmenovaný jako „*Bacillus thuringiensis* subspec. *san diego*“, M–7, byl uložen v Northern Research Laboratory, USA, pod číslem NRRL B–15939. Avšak přihlašovatel tohoto patentu US '372. Mycogen Corp. veřejně oznámil, že *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego* je *Bacillus thuringiensis* subspec. *tenebrionis*. Kromě toho byl patent US '372 postoupen společnosti Novo Nordisk A/S. Dále by nalezen kmen B. t., který je toxický vůči motýlům i vůči broukům (PCT přihláška WO 90/13 651). Toxin popsán v této zveřejněné PCT přihlášce WO 90/13 651 má molekulovou hmotnost 81 000 (81 kD).

55

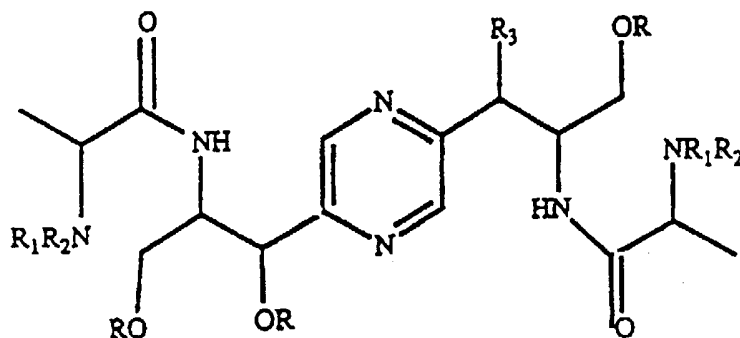
V průběhu spoluračního cyklu produkuje *B. t.* protein(-y) v krystalické formě známý(-é) jako krystalický(-é) delta endotoxin(-y) s molekulovou hmotností v rozmezí 27 000 (27 kD) až 140 000 (140 kD), který(-é) při požití zabíjí hmyzí larvy. Toxická účinnost může být vlastností jednoho či několika těchto delta endotoxinů u daného kmenu *B. t.* Většina delta endotoxinů jsou
 5 protoxiny, které lze proteolyticky přeměňovat na menší (odštěpené) toxické polypeptidy v metabolismu cílového hmyzu (Höfte a Whiteley, 1989, Microbiological (Review 53: str. 242–255). Tyto delta endotoxiny jsou kódovány prostřednictvím „cry“ (crystal protein) genů. Tyto cry geny se dělí na šest tříd a několik podtříd podle strukturní podobnosti a podle pesticidní specifčnosti. Hlavními třídami jsou Lepidoptera-specifické (cryI), Lepidoptera- i Diptera-
 10 specifické (cryII), Coleoptera-specifické (cryIII), Diptera-specifické (cryIV) (Höfte and Whiteley, 1989, Microbiological Review 53: str. 242–255), Coleoptera- i Lepidoptera-specifické (označované jako cryV geny Tailorem et al., 1992, Molecular Microbiology 6: str. 1 211–1 217) a Nematode-specifické (označované jako cryV a cryVI Feitelsonem et al., 1992, Bio/Technology 10: str. 271–255) geny.

15 Delta-endotoxiny už byly připraveny metodami rekombinantní DNA. Tyto delta endotoxiny, vyráběné metodami rekombinantní DNA mohou avšak nemusí být v krystalické formě.

B.t. delta-endotoxin je ve vodě nerozpustný, s výjimkou alkalického pH a je téměř vždy kódován plazmidy. Některé kmeny *Bacillus thuringiensis* produkují, jak bylo prokázáno, tepelně stabilní pesticidní adenin-nukleotidový analog, známý jako β -exotoxin nebo *thuringiensis*, který je sám
 20 pesticidní (Sebesta et al., v H. D. Burges (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases, Academic Press, N. Y., str. 249 až 281, 1981). β -endotoxin byl zjištěn v supernatantu určitých kultur *Bacillus thuringiensis*. Má molekulovou hmotnost 789 a sestává z adenosinu, glukózy
 25 a allarové kyseliny (Lüthy et al. v Kurstak (ed.), Microbial and Viral Pesticides, Marcel Dekker, New York, 1982, str. 35–72). Jeho účinné rozmezí zahrnuje, *Musca domestica*, *Mamestra configurata* Walker, *Tetranychus urticae*, *Drosophila melanogaster* a *Tetranychus cinnabarinus*, ale není na ně omezen. Toxicita β -exotoxinu je podle dosavadních představ příčinou inhibice DNA řízené polymerázou RNA konkurencí s ATP. Bylo zjištěno, že β -exotoxin je kódován
 30 plazmidem CRY v pěti kmenech *Bacillus thuringiensis* (B.t.) a že β -exotoxin může být klasifikován jako typ I nebo typ II β -exotoxin (Levinson et al., 1990, J. Bacteriol. 172: 3172–3179). β -exotoxin typu I je, jak je známo, produkován *Bacillus thuringiensis* subspecies *thuringiensis* sérotypu 1, *Bacillus thuringiensis* subspecies *tolworthi* sérotypu 9 a *Bacillus thuringiensis* subspecies *darmstadensis* sérotypu 10. β -exotoxin typu 2 je produkován *Bacillus thuringiensis* subspecies *morrisoni* sérotypu 8ab a je aktivní vůči *Leptinotarsa decemlineata* (mandelinka bramborová). Další ve vodě rozpustné látky byly izolovány z *Bacillus thuringiensis* včetně alfa -exotoxinu, který je toxický vůči larvám *Musca domestica* (Lüthy, 1980, FEMS Microbiological (Letters 8: str. 1–7), gama - exotoxiny, které jsou různými proteolytickými
 35 enzymy včetně lecitináz, chizínáz a proteáz, jejich toxické účinky jsou exprimovány pouze v kombinaci s beta-exotoxinem nebo delta-endotoxinem (Forsberg et al., 1976, *Bacillus thuringiensis*: Ist Effects on Enviromental Quality, National Research Council of Canada, NRC Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality, Subcommittees on Pesticides and Related Compounds and Biological Phenomena), sigma -exotoxin, který má strukturu podobnou β -exotoxinu a je také aktivní vůči *Leptinotarsa decemlineata* (Argauer et al.,
 40 1991, J. Entomology (Science 26: str. 206–213) a anhydrothuringiensis (Coll. Czechoslovak Chem. Comm. 40, 1 775, 1975).

WO 94/09 630 uvádí ve vodě rozpustné látky, které podporují účinnost *Bacillus thuringiensis* varieta *kurstaki* a *Bacillus thuringiensis* varieta *aizawai*.
 50

Stonard et al. (1994 v Natural and Engineered Pest Management Agents, Paul A. Mann, Robert M. Hollingworth, vydavatel ACS, Washington D.C: str. 25–36) uvádí diabroticiny struktury:



1. $R, R_1, R_2 = H, R_3 = OH$ Diabroticin A

2. $R, R_1, R_2, R_3 = H$ Diabroticin B

Diabroticiny byly izolovány z *Bacillus subtilis* a mají účinnost vůči *Diabrotica undecimpunctata*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Anthomus grandis* Boheman, vůči larvám moskytů, *Staphylococcus aureus*, a *Micrococcus lutea*, ale nemají účinnost vůči Evropskému vrtavci (European corn borer), *Eschiérichia coli*, *B. subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa*, Aktivita vůči ostatním škůdcům nebyla v publikaci Stonarda et al. zjištěna. Diabrotixin A byl také izolován z fermentační směsi *B. cereus*.

Podle dosavadního stavu techniky se dosáhlo určitého růstu mortality formulacemi *Bacillus thuringiensis*. Hledány byly nové kmeny s vyšší mortalitou, založené na genetickém ovlivnění existujících kmenů a hledání účinnějších směsí kombinováním spor *Bacillus thuringiensis* a/nebo krystalů s novými pesticidními nosiči nebo s chemickými pesticidy.

Cílem vynálezu je vylepšení insekticidní účinnosti známých formulací na bázi *Bacillus thuringiensis*.

Dalším cílem vynálezu je zvýšení pesticidní účinnosti pesticidů a současně nalezení nového použití pro známé pesticidní produkty.

Je výhodné izolovat nové kmeny *Bacillus thuringiensis* za účelem přípravy nových látek neboť existují širší spektra biopesticidů pro každého daného škůdce.

Podstata vynálezu

Vynález se týká kmene *Bacillus thuringiensis*, který vykazuje v podstatě veškerou pesticidní aktivitu v supernatantu, získaném z fermentace tohoto kmene. Krystalický protein a spory získané z fermentace kmene *Bacillus thuringiensis* podle vynálezu nevykazuje žádnou pesticidní účinnost. Jde o kmen vybraný ze skupiny sestávající z EMCC-0077, který má identifikační charakteristiky NRRL B-21090, nebo mutantů tohoto kmene, kteří mají v podstatě tytéž vlastnosti jako EMCC 0077, EMCC 0078 a které mají identifikační charakteristiky NRRL B-21091 nebo mutantů těchto kmenů, které mají v podstatě stejné vlastnosti jako EMCC 0078, EMCC 0079 a mají identifikační charakteristiky NRRL B-21092, nebo jejich mutantů s vlastnostmi v podstatě stejnými jako EMCC-0079, EMCC-0080, které mají identifikační charakteristiky NRRL B-21093, nebo jejich mutantů v podstatě stejných vlastností jako EMCC-0080 a EMCC-0081 s vlastnostmi s NRRL B-21094, nebo jejich mutantů, které mají v podstatě stejné vlastnosti jako EMCC-0081.

Látka, která má pesticidní účinnost vůči hmyzím škůdcům řádu Coleoptera a působí například společně s umocňující nebo synergickou složkou jiného pesticidu získaného z rodu *Bacillus* vůči škůdcům, se získá ze supernatantu z fermentace některého z uvedených kmenů. Ve výhodném

provedení má uvedená látka LC₅₀ (jedná se o koncentraci daného pesticidu, která je nutná k zabiti 50 % škůdců) 126 µg aktivní složky na jeden gram celkového materiálu vůči *Leptinotarsa texana*. LC₅₀ pelet z fermentace uvedeného kmene je více než 3000 µg aktivní přísady na jeden gram celkového materiálu.

5

V jiném provedení má látka podle vynálezu pesticidní účinnost vůči hmyzím škůdcům řádu Coleoptera. V nejspecifičtějším provedení má tato látka pesticidní účinnost vůči hmyzím škůdcům druhu *Diabrotica undecimpunctata*, *Leptinotarsa texana*, *Anthomus grandia* a překvapivě je účinný vůči hmyzím škůdcům druhů *Ips calligraphus*, *Popillia japonicus*,
10 *Epilachna varivastis*, *Leptinotarsa decemlineata* a *Dendroctonus frontalis* řádu Coleoptera.

Ve specifickém provedení má látka podle vynálezu podpůrný účinek na insekticidní aktivitu krystalů delta-endotoxinu(-ů) *Bacillus thuringiensis* vůči hmyzím škůdcům řádu Coleoptera.

15 Výraz používaný shora „Pesticid získaný z rodu *Bacillus*“ je míněn tak, že látka se získává z kmenů nebo spor mikroorganismů *Bacillus* (např. *Bacillus thuringiensis* nebo *Bacillus subtilis*). Pesticid získaný z rodu *Bacillus* může také znamenat látku odvozenou od mikroorganismů, např. rodu *Bacillus*, např. protein nebo jeho fragment, který má účinnost vůči škůdcům, nebo který je zabíjí, nebo může jít o látku, která chrání rostliny, např. antifidant nebo mikroorganismus
20 schopný exprese genu *Bacillus* kódujícího protein nebo fragment rodu *Bacillus*, který má aktivitu vůči škůdcům nebo který je zabíjí (např. delta-endotoxin *Bacillus thuringiensis*) a vhodný nosič (viz další odstavce, kde jsou popisovány konkrétní směsi). Škůdcem může být například hmyz, hád'átko, roztoč nebo šnek. Mikroorganismus schopný exprese genu *Bacillus* kódující protein nebo fragment *Bacillus* s aktivitou vůči škůdcům zahrnuje phylloplane (povrch listů rostlin)
25 a/nebo rhizosféru (půdu obklopující kořeny rostlin) a/nebo vodní prostředí, a je schopen úspěšně konkurovat v určitém konkrétním prostředí (obilí nebo jiné místo výskytu hmyzu) divokým mikroorganismům a umožňuje stabilně udržovat a exprimovat gen *Bacillus* kódující protein nebo fragment *Bacillus*, který má aktivitu vůči škůdcům nebo který je zabíjí. Příklady takových mikroorganismů zahrnují: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rewinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*,
30 *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonad*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, *Alcaligenes*, a *Clostridium*, řasy např. čeledi *Cyanophyceae*, *Prochlorophyceae*, *Rhodophyceae*, *Dinophyceae*, *Chrysophyceae*, *Prymnesiophyceae*, *Xanthophyceae*, *Raphidophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Cryptophyceae*, *Euglenophyceae*, *Prasinophyceae*, a *Chlorophyceae* a houby zejména kvasinky např. rodu *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporovolomyces*, *Rhodotorula*
35 a *Aureobasidium*.

Jak je uvedeno shora „pesticidní aktivita“ je měřítkem účinnosti vůči škůdcům posuzováno podle intenzity zabíjení nebo poškození růstu škůdců nebo podle ochrany rostlin vůči napadení škůdci.

40

Vynález se dále týká pesticidních prostředků zahrnujících látku a pesticid získaný z rodu *Bacillus* a také způsobu použití pesticidních kompozic pro potírání škůdců.

Vynález je dále zaměřen na způsob získání „v podstatě čisté“ látky podle tohoto vynálezu zahrnující tyto stupně:
45

- a) kultivace kmene *Bacillus thuringiensis* na vhodném růstovém médiu,
- b) oddělení supernatantu ze směsi ze stupně (a) a
50
- c) podrobení supernatantu ze stupně (b) chromatografii na koloně za účelem vyčištění látky.

Jak je shora uvedeno „v podstatě čistá“ látka znamená látka, která obsahuje méně než 5 % nečistot např. delta-endotoxinových proteinů.

55

Podstatné znaky, aspekty a výhody předloženého vynálezu jsou lépe srozumitelné z následujícího popisu, připojených nároků a doprovodných obrázků.

5 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje schéma syntézy k získání struktury I.

Obr. 2 ukazuje účinnost synergie Ia/Ib a NOVODORTM vůči *Leptinotarsa decemlineata*.

10

Podrobný popis vynálezu

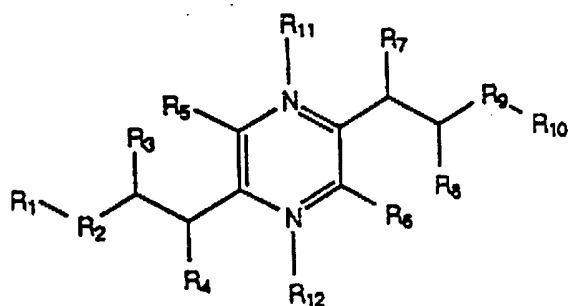
Příprava účinné látky

15

Látku(-y) lze získat ze supernatantu kultury *Bacillus thuringiensis* fermentací kmenů, což však neznámá omezení, B.t. EMCC-0077, které mají identifikační charakteristiky NRRL B-21090 nebo jejich mutantů EMCC-0077 a EMCC-0078 které mají v podstatě stejné vlastnosti s identifikačními vlastnostmi NRRL B-21091 nebo mutantů v podstatě shodných svými
20 identifikačními charakteristikami s EMCC-0078 a EMCC-0079 a mají identifikační charakteristiky NRRL B-21092, nebo jejich mutantů s vlastnostmi v podstatě stejnými jako EMCC-0079, EMCC-0080, které mají identifikační charakteristiky NRRL B-21093, nebo jejich mutantů v podstatě stejných vlastností jako EMCC-0080 a EMCC-0081 s vlastnostmi s NRRL B-21094, nebo jejich mutantů, které mají v podstatě stejné vlastnosti jako EMCC-0081.

25

Látka má účinnost vůči hmyzím škůdcům řádu Coleoptera a působí společně s pesticidem získaným z rodu *Bacillus* jako kupř. umocňující nebo synergická složka. Ve specifickém provedení má látka strukturu I:



(I)

30 kde: R₁ je amino, hydroxy, (C₁₋₁₀) alkyl, alkyl (C₁₋₁₀) ester, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) ester, halogen, (C₁₋₅) alkoxy, nebo zbytek aminokyseliny, kterým může být, ale bez omezení na ně, alanyl, valinyl, leuciny, isoleuciny, fenylalanyl, glyciny a fenylglyciny,

35 R₂ je aminoskupina nebo (C₁₋₁₀) alkyl,

R₃ je vodík, aminoskupina, hydroxyskupina, (C₁₋₁₀) alkyl, alkyl (C₁₋₁₀) ester, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) ester, halogen, (C₁₋₅) alkoxy, methyl-
40 amino, dimethylamino, thionyl, methylthionyl, kyano, nebo jejich soli včetně fosfátů, sulfátů, acetátů, uhličitanů a nitrátů, což však neznámá omezení na tyto soli,

R₄ je vodík, aminoskupina, hydroxyskupina, (C₁₋₁₀) alkyl, alkyl (C₁₋₁₀) ester, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) ester, halogen, (C₁₋₅) alkoxy, nebo jejich

solí, včetně fosfátů, sulfátů, acetátů, uhličitánů a nitrátů, což však neznamená omezení na tyto soli,

5 R_5 je vodík, methoxy, aminoskupina, hydroxyskupina, (C_{1-10}) alkyl, alkyl (C_{1-10}) ester, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) ester, halogen, (C_{1-5}) alkoxy,

R_6 je vodík, aminoskupina, hydroxyskupina, (C_{1-10}) alkyl, alkyl (C_{1-10}) ester, halogen nebo (C_{1-5}) alkoxy,

10 R_7 je vodík, aminoskupina, hydroxyskupina, (C_{1-10}) alkyl, alkyl (C_{1-10}) ester, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) ester, halogen, (C_{1-5}) alkoxy, nebo jejich soli, včetně fosfátů, sulfátů, acetátů, uhličitánů a nitrátů, což však neznamená omezení na tyto soli,

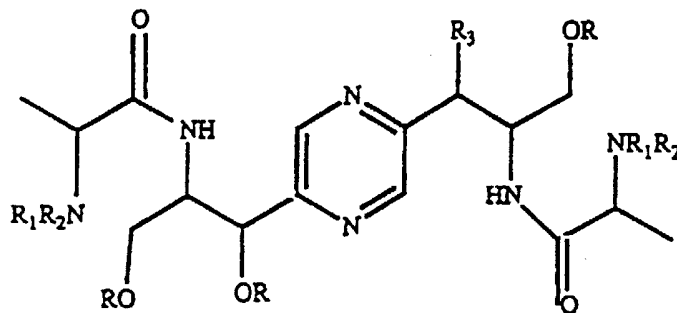
15 R_8 je vodík, aminoskupina, hydroxyskupina, (C_{1-10}) alkyl, alkyl (C_{1-10}) ester, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) ester, halogen, (C_{1-5}) alkoxy, methyl-amino, dimethylamino, thionyl, methylthionyl, kyano, nebo jejich soli včetně fosfátů, sulfátů, acetátů, uhličitánů a nitrátů, což však neznamená omezení na tyto soli,

20 R_9 je aminoskupina nebo (C_{1-10}) alkyl a

R_{10} je amino, hydroxy, (C_{1-10}) alkyl, alkyl (C_{1-10}) ester, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) ester, halogen, (C_{1-5}) alkoxy, nebo zbytek aminokyseliny, kterým může být alanyl, valinyl, leucinyl, izoleucinyl, fenylalanyl, glycynyl a fenylglycynyl.

25 Pyrazinové dusíky mohou být popřípadě substituovány (C_{1-10}) alkylem, alkyl (C_{1-10}) esterem, aryl (např. benzoyl, nitrobenzoyl, dinitrobenzoyl, halogenbenzoyl) esterem, nebo kyslíkem. Je tomu třeba rozumět tak, že vynález zahrnuje všechny stereoizomerní formy sloučenin struktury vzorce I a také racemáty. Ve většině specifických provedení má účinná látka strukturu Ia zde označovanou „Ia“ nebo Ib zde označovanou jako „Ib“.

30



Ia: $R, R_1, R_2, R_3 = H$

Ib: $R, R_1, R_2 = H, R_3 = OH$

35

Bacillus thuringiensis může být kultivován pomocí půdy a fermentační techniky známé z dosavadního stavu techniky viz např. Ropgoff et al., 1969, J. Invertebrate Path. 14: str. 122–129, Dulmage et al., 1971, J. Invertebrate Path. 18: str. 353–358, Dulmage et al., v Microbial Control of Pets and Plant Diseases, H. D. Burges, ed., Academic Press, N. Y., 1980).

40

Po úplném fermentačním cyklu se supernatant oddělí odseparováním spor *Bacillus thuringiensis* a krystalů z fermentačního roztoku pomocí metod, které jsou dostatečně dobře známy z dosavadního stavu techniky např. odstředěním a/nebo ultrafiltrací. Uvedená účinná látka je obsažena v supernatantu, který může být odebrán opět způsobem dostatečně popsáným v dosavadním stavu techniky, např. ultrafiltrací, odpařením, nebo rozprašovacím sušením.

45

Alternativně může být účinná látka podle vynálezu získána chemickou syntézou pomocí známých reakcí a postupů.

Pro získání struktury I se připraví jednoduchý pyrazinový kruh, substituovaný požadovaným způsobem, obsahující chránící skupiny, některým z mnoha známých postupů např. spontánní kondenzací alfa-aminokarbonylových sloučenin. Dihydropyrazinový meziprodukt, který při této reakci vzniká, se ihned oxiduje kyslíkem na příslušný pyrazin. Dimerizace jednou substituované alfaaminokarbonylové sloučeniny tímto způsobem vede k jednou substituovanému pyrazinu, přičemž reakce dvou různě substituovaných alfaaminokarbonylových sloučenin vede ke třem produktům. Uvedenou látku lze izolovat chromatografickým oddělováním (viz obr. 1). Posledně zmíněná reakce umožňuje syntézu pyrazinu s různými substituenty na každé straně kruhu.

Čištění připravovaných látek (připravované látky) je možné provádět nejrůznějšími postupy, které jsou známy z dosavadního stavu techniky. Patří mezi ně chromatografie (např. na iontoměničích, afinitní a kolonová chromatografie podle velikosti molekuly), elektroforetické postupy, postupy založené na rozdílné rozpustnosti, extrakce nebo jakékoli další standardní techniky o sobě známé (viz např. Protein Purification, eds. J-C. Janson and Lars Ryden, VCH Publishers, New York. 1989).

Účinnost uvedených látek se dá testovat pomocí postupů, které jsou známy, jako je umělé udržení diety, umělé podání potravy, natírání a postřik listů. Specifické příklady takových biologických testů jsou dále uvedeny v příkladech provedení.

Prostředek s obsahem účinné látky

Zmíněné účinné látky se mohou formulovat samostatně, společně s pesticidem *Bacillus*, který, jak je definováno shora představuje kmen rodu *Bacillus*, spory, proteiny nebo jejich fragmenty, které jsou aktivní vůči škůdcům, nebo které zabíjejí škůdce a popřípadě přijatelný nosič, používaný do pesticidních kompozic, jako jsou např. suspenze, roztoky, emulze, popraše, dispergovatelné granule, smáčitelný prášek, emulzní koncentrát aerosol, nebo impregnované granule. Příkladem takových kmenů *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* (označovaný jako DIPEL od Abbot Laboratories, Inc. JAVELIN od Sandoz, BIOBIT od fy Novo Nordisk A/S, FORAY od fy Novo Nordisk, MVP od fy Mycogen, BACOSPEINE od fy Novo Nordisk A/S a THURICIDE od fy Sandoz), *Bacillus thuringiensis* subspecies, *aizawai* (označovaný jako FLORBAC od fy Novo Nordisk A/S a XENTARX od fy Abbott Laboratories, Inc.), *Bacillus thuringiensis* subspecies *tenebrionis* (označovaný jako NOVODOR od Novo Nordisk A/S, TRIDENT od fy Sandoz M-TRAK a M-ONE od fy Mycogen), *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* (označovaný buď jako BACTIMOS nebo SKEETAL od Novo Nordisk A/S, TEKNAR od fy Sandoz a VACTOBAC od Abbott Laboratories, Inc.), *Bacillus phaericus* (označovaný jako SPHERIMOS od fy Novo Nordisk A/S), *Bacillus thuringiensis* *kurstaki/tenebrionis* (označovaný jako FOIL od Ecogen), *Bacillus thuringiensis* *kurstaki/aizawai* (označovaný jako CONDOR od Ecogen a AGREE od Ciba-Geigy), a *Bacillus thuringiensis* *kurstaki/kurstaki* (označovaný jako CUTLASS od Ecogen). Proteiny *Bacillus* mohou být voleny ze skupiny zahrnující CryI, CryII, CryIII, CryIV, CryV a CryVI.

Uvedené látky mohou být také formulovány spolu s jinými faktory nebo účinnými látkami, získanými ze supernatantů kultury *Bacillus* zahrnující, ale bez omezení na něj exotoxin a/nebo podpůrný faktor. Popřípadě může formulace také zahrnovat pesticid získaný z mikroorganismu *Bacillus*, chemický pesticid a/nebo virus pesticidními vlastnostmi a přijatelný nosič.

Ve specifickém provedení mohou složky z této kompozice působit synergicky. Jako výsledek vzniká kompozice, která má větší účinnost než by měly samostatně jednotlivé složky. Synergie se také projevuje stejnou nebo větší účinností při nižší a/nebo méně časté dávce než by bylo nutné aplikovat u každé jednotlivé složky. Alternativně může tato látka působit podpůrně na pesticid získaný z mikroorganismu *Bacillus*.

V prostředcích zahrnujících pesticid *Bacillus* se běžně používá koncentrace 0,001 až asi 300 gramů/LTU. Jak je uvedeno shora „LTU“ znamená zkouška na *Leptinotarsa texana*, používaná zde jako standard. Při biologickém testu se srovnává vzorek ve standardním srovnaném složení rodu *Bacillus* s analogickým vzorkem *Leptinotarsa texana* nebo s použitím jiného škůdce jako standardního testovacího organismu. Účinnost je definována podílem uváděné standardní LC₅₀ a násobením uváděnou standardní účinností.

V jiném provedení může prostředek obsahovat účinnou látku v podstatě čisté formě nebo supernatantu z kultury *Bacillus* v suchém koncentrovaném nebo kapalném stavu a vhodný pesticidní nosič, jejichž příklady jsou uvedeny dále. Tato kompozice se dá aplikovat odděleně na rostliny, např. transgenní rostliny. Specificky je tato kompozice vhodná pro rostliny, které již předtím obsahují gen *Bacillus thuringiensis*. V jiném provedení se tato kompozice aplikuje na rostliny předběžně vystavené působení mikroorganismů *Bacillus thuringiensis*. Účinná látka v této kompozici je přítomna v koncentraci asi 0,001 % hmotnostních až asi 60 % hmotnostních.

Takovéto kompozice, které jsou popsány shora lze získat přidáním povrchově aktivního činidla, inertního nosiče, konzervačního prostředku, zvlhčovacího prostředku, požerového stimulantu, atraktantu zapouzdřovacího činidla, nosiče, emulgátoru, barviva, prostředku chránícího směs vůči účinkům UV záření, pufru, ztekucovacího činidla a popřípadě dalších komponent k produktu získanému podle vynálezu a úpravou pro určitou konkrétní aplikaci vůči určitému konkrétnímu škůdci.

Vhodná povrchově aktivní činidla zahrnují aniontové sloučeniny, jako jsou karboxyláty, např. karboxyláty kovů mastné kyseliny s dlouhými řetězci, N-acylsarkosináty, mono nebo diestery kyseliny fosforečné s ethoxyláty mastných alkoholů nebo soli takovýchto esterů, sírany mastných alkoholů jako je dodecylsulfát sodný, oktadecylsulfátsodný, nebo cetylsulfát sodný, sulfáty ethoxylovaných mastných alkoholů, sulfáty ethoxylovaných alkylfenolů, ligninsulfonáty, ropné sulfonáty, alkylarylsulfonáty, jako např. alkylbensensulfonáty nebo nižší alkylnaftalensulfonáty, např. butylnaftalensulfonát, soli nebo sulfonované naftalenformaldehydové kondenzáty, soli sulfonovaných fenolformaldehydových kondenzátů nebo komplexní sulfonáty, jako jsou amid-sulfonáty, např. sulfonované kondenzační produkty olejové kyseliny a N-methylteurinu nebo dialkylsulfosukcináty, např. sulfonát sodný nebo dioktylsukcinát. Neiontová činidla zahrnují (ale nejsou na tento výčet omezena) kondenzační produkty esterů mastných kyselin, mastných alkoholů, amidů mastných kyselin nebo alkyl – nebo alkenyl – substituovaných mastných fenolů s ethylenoxidem, mastné estery vícesytných alkoholů, např. estery mastných kyselin se sorbitanem, kondenzační produkty těchto esterů s ethylenoxidem, např. polyoxyethylen substituované estery sorbitolu a mastných kyselin, blokové kopolymery ethylenoxidu a propylenoxidu, acetylenické glykoly, jako je např. 2,4,7,9-tetraethyl-5-decin-4,7-diol nebo ethoxylované acetylenické glykoly. Příklady kationtových povrchově aktivních činidel zahrnují substituované alifatické mono- di- nebo polyaminy jako acetát naftenát nebo oleát, kyslík obsahující aminy jako je aminoroxid polyoxyethylenovaného alkylaminu, amidicky vázaný amin připravený kondenzací karboxylové kyseliny s di- nebo polyaminem nebo kvartérní amoniové soli.

Příklady inertních materiálů jsou (aniž by to znamenalo omezení na tyto materiály) anorganické minerály, jako je kaolin, křída, sádra, hnojivo, fylosilikáty, uhličitany, sírany nebo fosfáty, organické materiály, jako je cukr, škroby nebo cyklodextriny nebo botanické materiály, jako jsou produkty ze dřeva, korek, rozemleté klasy, rýžové odpady, ořechové slupky apod.

Směsi podle vynálezu mohou být připraveny ve formě vhodné k přímému použití nebo jako koncentráty nebo premixy, které vyžadují další řazení vhodným množstvím vody nebo jiného rozpouštědla před aplikací. Pesticidní koncentrace se do určité míry mění v závislosti na povaze konkrétní formulace specificky je důležité, jde-li o koncentrát nebo směs, která má být používána přímo. Směs obsahuje 1 až 98 % hmotnostních pevných nebo kapalných inertních nosičů a 0 až 50 %, výhodně 0,1 až 50 % povrchově aktivního činidla. Tato kompozice se

dodávají s vyznačením dávky pro použití jako komerční produkt, přičemž tato dávka je výhodně kolem $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ g/m}^2$ až $5,6 \cdot 10^{-1} \text{ g/m}^2$ (0,01 až 5 liber na akr) v suché formě a $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ l/m}^2$ až $2,9 \cdot 10^{-3} \text{ l/m}^2$ (0,01 až 25 pint na akr) v kapalně formě.

- 5 V další provedení se pesticid získaný z mikroorganismu *Bacillus* a/nebo účinná látka před smísením zpracovává za účelem prodloužení její pesticidní aktivity, když je aplikována do určitého prostředí cílového škůdce, přičemž toto předběžné zpracování je neškodné vůči samotnému pesticidu nebo účinné látce. Takové zpracování lze provádět chemickými a/nebo fyzikálními prostředky, které nepůsobí škodlivě na kompozici (-ce). příkladem chemického
- 10 činidla (aniž by se na tyto příklady rozsah činidel omezoval) jsou aldehydy, jako formaldehyd a glutaraldehyd, protinfekční přísady, jako je zefyranchlorid, alkoholy, jako izopropanol a ethanol a histologické fixativy, jako je Bouinův fixativ a Helliův fixativ (viz příklady v Humason, *Animal Tissue Techniques*, W. H. Freeman and Co., 1967).
- 15 Prostředky podle vynálezu se mohou aplikovat přímo na rostliny, např. rozstříkáním nebo poprášením v době, kdy se škůdci začínají objevovat na rostlinách nebo před dobou jejich obvyklého výskytu jako prevence. Rostliny, které mohou být chráněny v rozsahu vynálezu, jsou (aniž by tento výčet byl omezující) obilniny (pšenice, ječmen, žito, oves, rýže, čirok a odpovídající produkty), řepy (cukrová nebo krmná řepa), peckoviny, malvice a měkké ovoce
- 20 (jablka, hrušky, švestky, broskve, mandle, třešně, jahody, maliny a ostružiny), luskoviny (alfaalfa, fazole, čočka, hrách, sojové boby), olejové rostliny (řepka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokosové ořechy, ricina, kakaové boby, podzemnice olejná), okurkovité rostliny (okurky, dýně, melouny), rostliny pěstované pro vlákno (bavlna, len, konopí, juta), citrusové ovoce (pomeranče, citrony, grapefruity, mandarinky), zelenina (špenát, salát, chřest, kapusta
- 25 a jiné brassicae, karotka, cibule, rajčata, brambory), lauraceae (avokáda, skořice, kafr), listnaté stromy a konifery (např. lípy, tisy, duby, olše, topoly, břízy, jedle, smrky, a borovice) nebo rostliny, jako je kukuřice, tráva pro závlahy, tabák, ořechy, káva, cukrová třtina, čaj, vinná réva, chmel, banány nebo kaučukovník a okrasné rostliny. Účinná látka se může aplikovat na list, do brázdy, rozhazováním granulí, pokládáním, nebo přidáváním do půdy. Je obecně důležité
- 30 dosáhnout dobré účinnosti vůči škůdcům v ranných stádiích růstu pěstovaných rostlin, neboť v této době mohou škůdci nejvíce rostlinu poškodit. Postřik nebo popraš může obvykle obsahovat i další pesticid, pokud je to podle mínění odborníka nutné. Ve výhodném provedení se aplikuje prostředek podle vynálezu přímo na rostliny.
- 35 Prostředek podle vynálezu může být účinný vůči škůdcům řádu Coleoptera, např. *Leptinotarsa* sp. (např. *Leptinotarsa texana*, *Leptinotarsa decemlineata*), *Diabrotica undecimpunctata*, *Dendroctonus formtalis*, *Anthonomus grandis*, *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus chinensis*, *Epilachna varivestis*, *Pyrrhalta luteola*, *Cylas formicarius elegantulus*, *Listronotus oregonensis*, *Sitophilus* sp., *Cyclocephala borealis*, *Cyclocephala immaculata*, *Macroductylus subspinosus*, *Popillia japonica*, *Rhizotrogus majalis*. *Alphitoblus diaperinus*, *Palorus ratueburgi*, *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Tribolium castaneum*, *Tribolium confusum*, *Tribolium destructor*. Prostředek podle vynálezu může být také účinný vůči hmyzím škůdcům včetně (aniž by se na ně účinnost omezovala) škůdci z řádu motýlů (*Lepidoptera*), například *Achroia grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ipsilon*, *Alabama argillaceae*,
- 45 *Alsophila pomataria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Christoneura* sp., *Cochylis hospes*, *Colias eurytheme*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia funeralis*, *Diaphania hyalinata*, *Diapharua nitidalis*,
- 50 *Diatraea grandiosella*, *Diatraea saccharalis*, *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Ephestia elutella*, *Erannis tiliaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Hemileuca oliviae*, *Homocidus electellum*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria*
- 55 *fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxostege*

- sticticalis, Lymantria dispar, Macalla thyrsisalis, Malacosoma sp., Mamestra brassicae, Mamestra
cobfigurata, Manduca quinquemaculata, Manduca sexta, Maeuca testulalis, Melanchra picta,
Operophtera brumata, Orgyia sp., Ostrinia nubilalis, Paleacrita vernata, Papilio cressphontes,
Pectinophora gossypiella, Phryganidia californica, Phyllonorycter blancardella, Pieris napi, Pieris
5 rapae, Plathypena scabra, Platynota flouendana, Platynota stultana, Platypirilia carduidactyla,
Plodia interpunctella, Plutella xylostella, Pontia protodice, Pseudeletia unipuncta, Pseudoplasia
includens, Sabulodes aegrotata, Schizura concinna, Sitotroga cerealella, Spilonota ocellana,
Spodoptera sp., Thaurinstopoea pityocampa, Tineola bisselliella, Trichoplusia ni, Udea rubigalis,
Xylomyges curialis, Yponomeuta padella; Diptera, např. Aedes sp., Andes vittatus, Anastrepha
10 ludens, Anastrepha suspensa, Anopheles barberi, Anopheles quadrimaculatus, Armigeres
subalbatus, Calliphora stygia, Calliphora vicina, Ceratitis capitata, Chironomus tentans,
Chrysomya rufifacies, Cochliomyia macellaria, Culex sp., Culiseta inornata, Dacus oleae, Delia
antigua, Delia platura, Delia radicum, Drosophila melanogaster, Eupodes corollae, Glossina
austeni, Glossina brevipalpis, Glossina fuscipes, Glossina morsitans centralis, Glossina moristans
15 morsitans, Glossina moristans submorsitans, Glossina pallidipes, Glossina palpalis gambiensis,
Glossina palpalis palpalis, Glossina tachinoides, Haemagogus equinus, Haematobius irritans,
Hypoderma bovis, Hydoderma lineatum, Leucopis ninae, Lucilia cuprina, Lucilia sericata,
Lutzomyia longipalpis, Lutzomyia shannoni, Lycoriella mali, Mayetiola destructor, Musca
autumnalis, Musca domestica, Neobellieria sp., Nephrotoma suturalis, Phyra aenescens,
20 Phaenicia sericata, Phlebotomus sp., Phormia regina, Sabethes cyaneus, Sarcophaga bullata,
Scatophaga stercoraria, Stomoxys calcitrans, Toxorhynchites amboinensis, Tripteroides bambusa,
Acari, např. Oligonychus pratensis, Panonychus ulmi, Tetranychus urticae, Hymenoptera, např.
Iridomyrmex humilis, Solenopsis invicta, Isoptera, např. Reticulitermes hesperus, Reticulitermes
flavipes, Coptotermes formosanus, Zootermopsis angusticollis, Neotermes connexus,
25 Incisitermes minor, Incisitermes immigrans, Siphonaptera, např. Ceraptophyllus gallinae,
Ceraptophyllus niger, Nosopsyllus fasciatus, Leptopsylla segnis, Ctenocephalides canis,
Ctenocephalides felis, Echicnophaga gellinacea, Pulex irritans, Xenopsylla cheopis, Xenopsylla
vexabilis, Tunga penetrans a Tylenchida, např. Meloidogyne incognita, Pratylenchus penetrans.
- 30 Následující příklady jsou předkládány pouze jako ilustrace, nikoliv jako omezení vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

- 35 Příklady 1: Kultivace různých izolátů B.t.

Subkultury EMMC-0077, EMCC-0078, EMCC-0079, EMCC-0080 a EMCC-0081, udržované
na širokém agaru, byly použity k inokulaci 250 ml protřepávaných baněk, obsahujících 50 ml
40 živného roztoku o následujícím složení.

Obilný roztok	15 g/l
maltrin-100	40 g/l
bramborový škrob	30 g/l
45 KH_2PO_4	1,77 g/l
K_2HPO_4	4,53 g/l

pH roztoku bylo udržováno na 7,0 pomocí 10N NaOH.

- 50 Po inokulaci byly protřepávané baňky inkubovány při 30 °C na rotačním třepacím zařízení při
250 otáčkách za minutu po dobu 72 hodin. Celá směs s kulturou byla použita pro testování vůči
Diabrotica undecimpunctata.

Příklad 2: Aktivita *Diabrotica undecimpunctata* v celé kultivační živné směsi pro případ jednotlivých izolátů.

- 2,5 ml celé kultivované směsi získané shora popsanou fermentací se odebralo a přemístilo z protřepávaných baněk do 50 ml polypropylenových testovacích trubice. Do každé testovací trubice se přidají potravní vzorky *Diabrotica undecimpunctata* až na konečný objem 25 ml. Potravní vzorek a testovací materiál se pak intenzivně míchá a disperguje do testovací nádoby. Na povrch každého z těchto „potravních vzorků“ byla vložena vajíčka *Diabrotica undecimpunctata* v počtu 3 až 6. Na nádoby byl aplikován Mylar a byly inkubovány při 28 °C bez osvětlení. Hodnocení bylo provedeno po 7 dnech. Mortalita byla stanovena sedmý den po inkubaci. Vysvětlivky k tabulce: SS7= velikost mrtvých larev sedmý den ve srovnání s živými, kontrolními larvami v ten samý den, což je hodnota SS7=4, SS7=3, SS7=2 a SS7=1 představuje velikost 75 %, 50 % a 25 % oproti živým larvám, které mají kontrolní hodnotu 4. V následující tabulce 1 jsou shrnuty získané výsledky od všech pěti kmenů, u kterých byla mortalita 100 %. Dále, mrtvé larvy měly 12,5% velikost oproti živým kontrolním larvám.

Tabulka 1

- 20 Aktivita *Diabrotica undecimpunctata* v celé kultivační živné směsi

Kmen	% mortality	SS7
EMCC-0077	100	0,5
EMCC-0078	100	0,5
EMCC-0079	100	0,5
EMCC-0080	100	0,5
EMCC-0081	100	0,5

Příklad 3: Lokalizace aktivity *Diabrotica undecimpunctata*

- 25 Za účelem stanovení zda aktivita *Diabrotica undecimpunctata* je spojena s delta-endotoxinem/sporami nebo supernatantem, bylo odebráno 2,5 ml celkové kultivované směsi kmenů EMCC-0077, EMCC-0080, EMCC-0081 a NB 125 (*Bacillus thuringiensis* subspecies tenebrionis pěstovaný za identických podmínek) a odstředí se na centrifuze Sorvall RC-5B při 30 15 000 otáčkách za minutu (rotor Sorvall SS34) po dobu 15 minut, čímž se oddělí supernatant a částice. Krystalické delta-endotoxiny + spory se získají z částic. Delta-endotoxiny produkované *Diabrotica undecimpunctata*-aktivním B.t. izolátem EMCC-0077 mají molekulové hmotnosti 66 000 (66kD), 29 000 (29kD) a 12 000 (12kD), jak je definováno v SDS-PAGE. Delta-endotoxiny, produkované *Diabrotica undecimpunctata*-aktivním B.t. izolátem 35 EMCC-0078 mají molekulové hmotnosti 153 000 (153kD), 77 000 (77kD), 67 000 (67kD), 50 000 (50kD), 42 000 (42kD), 34 000 (34kD), 30 000 (30kD) a 241 000 (241kD), jak je definováno v SDS-PAGE. Delta-endotoxiny, produkované *Diabrotica undecimpunctata*-aktivním B.t. izolátem EMCC-0079 mají molekulové hmotnosti 135 000 až 145 000 (135kD a 145kD), jak je definováno v SDS-PAGE. Delta-endotoxiny, produkované *Diabrotica undecimpunctata*-aktivním B.t. izolátem EMCC-0080 mají molekulové hmotnosti 40 40 000 (94kD) a 40 000 (40kD), jak je definováno v SDS-PAGE. Delta-endotoxiny, produkované *Diabrotica undecimpunctata*-aktivním B.t. izolátem EMCC-0081 mají molekulové hmotnosti 129 000 (129kD) a 32 000 (32kD), jak je definováno v SDS-PAGE.
- 45 Každý supernatant (2,5 ml) získaný při shora uvedené centrifugaci se přenesou do 50ml polypropylenové testovací trubice. Částice se pak resuspendují ve 2,5 ml sterilní destilované vody a přenesou do samostatné 50ml polypropylenové testovací trubice. Do testovacích trubice, jež obsahují buď supernatant nebo resuspendované částice se poté přidá potravní vzorek *Diabrotica*

undecimpunstata až na konečný objem 25 ml. Zbylé kroky biologického testu jsou identické s kroky uvedenými výše. Vyhodnocení je opět shodné s tím, jak bylo uvedeno výše.

- 5 Výsledky, jak je vidět v tab. 2 ukazují, že *Diabrotica undecimpunstata* má aktivitu u kmenů EMCC-0077, EMCC-0080 a EMCC-0081 přítomnou ve všech supernatantech, přičemž malá aktivita *Diabrotica undecimpunstata* od známých kmenů *Bacillus thuringiensis* subspecies *telebrionis* je soustředěna v částicích (spory + krystalická část).

- 10 Tabulka 2: Aktivita *Diabrotica undecimpunstata* v supernatantu a v částicích

Kmen	Frakce	% mortality	nejlepší účinnost
EMCC-0077	supernatant	100	0,5
	částice	10	3,0
EMCC-0080	supernatant	100	0,5
	částice	0	4,0
EMCC-0081	supernatant	100	0,5
	částice	0	3,0
NB 125	supernatant	0	3,0
	částice	50	1,5

Příklad 4: Účinnost vůči *Leptinotarsa texana*

- 15 Po filtraci přes membránu 0,2 mikrometrů byl supernatant z kmene EMCC-0080 získaný z příkladu 1 použit pro test na účinnost vůči broukům. Zfiltrovaný supernatant se aplikuje na vajíčka v objemu $1,87 \cdot 10^{-2} \text{ l/m}^2$ (20 galonů na akr). Ředění byla 0,1 ku 1, 1 ku 4, 1 ku 8 (supernatant: deionizovaná voda, objemově). Larvy *Leptinotarsa texana* byly vystaveny působení prostředků podle následujícího standardního postupu. Každá rostlina byla opatřena 20 larvami *Leptinotarsa texana*.

- 20 Výsledky, jak jsou uvedeny v následující tabulce 3 ukazují, že zfiltrovaný supernatant EMCC-0080 je aktivní vůči *Leptinotarsa texana*.

25

Tabulka 3: Účinnost vůči *Leptinotarsa texana* EMCC-0080

Kmen	Ředění	% mortality
EMCC-0080	0	95
	1:1	55
	1:4	20
	1:8	0
neošetřená kontrola		0

30

Příklad 5: Synergický efekt EMCC-0080 a NOVODOR™

- 35 Výsledky, jak ukazuje tabulka 3 shora naznačují, že supernatant EMCC-0080 je neúčinný sám o sobě při ředění 1:8 objemově. Pokud však ošetříme rostlinu 1,25% nebo 2,5% 10x koncentrovanějším supernatantem EMCC-0080 v kombinaci s 200 mikrogramy NOVODOR™ (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) na mililitr, získáme synergický efekt, který se projeví silným poklesem LC_{50} a LC_{90} NOVODORu™. Data jsou uvedena v následující tabulce 4.

Tabulka 4: Synergický efekt EMCC-0080 a NOVODOR™

Vzorek	LC ₅₀ (µg/g) ¹	LC ₉₀ (µg/g) ²	zesílení ³
NOVODOR™	642	4,286	1,55
'' + 1,25% EMCC0080	250	1,292	1,79
'' + 2,5% EMCC0080	98	490	1,83

5 Vysvětlivky k tabulce 4

- ¹ koncentrace, která zabíjí 50 % cílové hmyzí populace
² koncentrace, která zabíjí 90 % cílové hmyzí populace
³ nárůst % mortality v logaritmické koncentrační křivce

10

Příklad 6: Čištění účinné látky aktivní vůči škůdcům řádu Coleoptera, produkované B.t. kmenem EMCC-0080

- 15 B.t. kmen EMCC-0080 byl pěstován po dobu 24 hodin při 30 °C v živném médiu obsahujícím následující směs v gramech na litr, při pH 7,0:

	Maltodextrin	40 g
	Sójový protein	40 g
20	KH ₂ PO ₄	1,8 g
	K ₂ HPO ₄	4,5 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 g
	stopové prvky	0,2 ml

- 25 Buňky a jiné nerozpustné složky byly z kultivační živné směsi B.t. kmene EMCC-0080 odstraněny odstraněním s následnou filtrací získaného supernatantu přes Celit a 0,2 µm membránu. Získaný přefiltrovaný roztok (permeát) se pak zahustí odpařením na desetinu.

- 30 Čištění aktivní látky, které vychází z 10x zahuštěného filtrátu se provádí pomocí 4 purifikačních stupňů. V průběhu čištění se monitoruje aktivita povrchovým testem na *Diabrotica undecimpunctata*, jak je popsáno shora, a čistota se kontroluje kapilární elektroforézou, jak je popsána v příkladu 8. Všechny chromatografické stupně využívají detekce při 226 nm.

- 35 Konkrétně se povrchový test provádí následovně. Vzorky 10x zahuštěného filtrátu se aplikují do jednotlivých otvorů mikrotitrové desky a obsahují 200 mikrolitrů zpevněné umělé hmyzí potravy na jednu prohlubeň. V této podobě se potom na vzduchu vzorky suší. Dva až čtyři čerstvě vylíhnutí jedinci *Diabrotica undecimpunctata* se jemně umístí do každé prohlubně. Mikrotitrové desky se pak zatěsní Mylarem s ponecháním otvorů pro výměnu vzduchu a inkubují se při 30 °C a 80% relativní vlhkosti. Hodnocení % mortality se provede po pěti dnech.

40

- 45 V prvním stupni se 10x koncentrovaný filtrát nejprve přečistil na SP Sephadexu C-25 (catex) na chromatografické koloně 5x30 cm. Získaných 450 mililitrů 10x koncentrovaného filtrátu se rozpustí v 18 litrech deionizované vody a uvede se na začátek kolony, která je předtím uvedena do rovnováhy 20 mM amoniumacetátovým pufrem při pH=5. Kolona se eluuje rychlostí 18 mililitrů za minutu celkem 5 litry roztoku s kontinuálním gradientem od 20mM do 0,5M amoniumacetátovým pufrem při pH=5. Frakce po 10 ml se sbírají, testují, a stanoví se jejich čistota. Účinné frakce se spojí (zhruba 150 ml), lyofilizují a znovu rozpustí v deionizované vodě na asi 1/5 původního objemu.

- 50 Ve druhém stupni se vezme 25 mililitrů vzorku z 1 stupně a přivádí se na kolonu BioRad P2 (extra jemná o velikosti 5x100 cm), která je předtím uvedena do rovnováhy deionizovanou

vodou. Kolona se eluuje při průtokové rychlosti 1 ml za minutu deionizovanou vodou. Frakce po 10 ml se sbírají, testují a zkoušejí se jejich čistota kapilární elektroforézou. Účinné frakce se spojí (zhruba 400 ml).

- 5 Ve třetím stupni se získaných 400 ml z druhého stupně rozpustí v 16 l deionizované vody, tento roztok se uvádí na kolonu Pharmacia S Sepharose Fast (silný katex) o rozměrech 5x30 cm, která je předem uvedena do rovnováhy 20mM amonium acetátovým pufrem při pH=5,0. Kolona se eluuje při průtokové rychlosti elučního činidla 17 ml za minutu 5 litry při kontinuálním gradientu od 20mM do 0,5M amonium acetátovým pufrem při pH=5. Frakce po 20 ml se sbírají, testují
10 a zkouší na čistotu. Účinné frakce se spojí (zhruba 250 ml) a pak lyofilizují do sucha za účelem odstranění těkavého amonium acetátového pufru.

- Ve čtvrtém stupni se lyofilizovaný spojený podíl ze třetího stupně rozpustí ve 400 ml deionizované vody, roztok se uvádí na kolonu BioRad Chelex 100 o rozměrech 0,9x30 cm, která
15 je předem uvedena do rovnováhy 20mM pufrem mravenčanu amonného při pH=4,0. Kolona se eluuje při průtokové rychlosti 5 ml za minutu 2,4 litry při postupném gradientu 0,02; 0,1; 0,2; 0,35; 0,5; 1,0M pufru na bázi mravenčanu amonného při pH=4. Frakce po 20 ml se sbírají, testují a zkouší se jejich čistota. Účinné frakce se spojí (zhruba 300 ml) a pak lyofilizují do sucha pro
20 odstranění těkavého pufru na bázi mravenčanu amonného. Kapilární elektroforéza ukazuje čistotu materiálu, účinného vůči škůdcům řádu Coleoptera, který zahrnuje dvě látky, Ia a Ib.

Příklad 7: Stanovení struktury látky účinné vůči škůdcům řádu Coleoptera

- 25 Struktury sloučenin Ia a Ib se stanoví spektroskopickými daty jejich acetylovaných derivátů (deriváty A a B).

- Směs Ia a Ib o hmotnosti 114 mg se acetyluje v 5 ml pyridinu pomocí 5 ml acetanhydridu a krystalů 4-dimethylaminopyridinu jako katalyzátoru po dobu 24 hodin při teplotě místnosti
30 a pak se čistí pomocí semipreparativní RP-C₁₈HPLC. 5 mg vzorku ve 25 µl se uvádí na kolonu a eluuje rychlostí 4 ml za minutu směsí 80 % vody–20 % acetonitrilu. Detekce se provádí při 254 nm.

- NMR spektroskopická data se získají pro derivát A a indikují přítomnost 14 uhlíků a 17 protonů.
35 Nicméně spektrální data hmotové spektroskopie naznačují molekulovou hmotnost 652 a vzorek C₂₈H₄₀N₆O₁₂ (přesná hmotnost je 653,2801, MH⁺, vypočtená 653,2782). Proto byla sloučenina určena jako symetrická, kdy jenom polovina molekuly se projeví na signálu NMR.

- Pomocí NMR se také pozorovalo několik spinových systémů. Centrální pyrazinový kruh,
40 substituovaný v poloze 2 a 5 byl indikován vysokým polem protonových singletů při 8,6 ppm (H-3 a H-6), které ukazují spojení všech uhlíkových atomů v kruhu i s prvním uhlíkem postranního řetězce (c-7). Postranní tříuhlíkový řetězec je acetylován v obou polohách 7 a 8 methylenem v poloze 9. Bylo zjištěno, že uhlík 9 má návaznost s uhlíkem esteru a ester byl
45 determinován jako část alaninu, která je acetylována na aminokyselině.

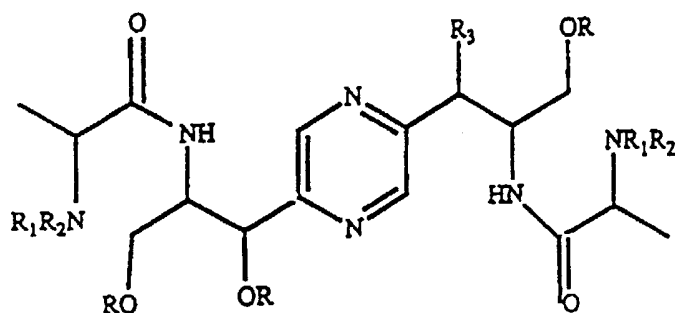
- Struktura derivátu B se liší v jedné pozici od derivátu A. V jednom postranním řetězci derivátu B
není C-7 uhlík acetylován ani připojen ke kyslíku, ale bylo zjištěno, že jde o methylen. Druhý postranní řetězec je identický jako je tomu u derivátu A. Tento rozdíl v pouze jednom kyslíku lze
50 také pozorovat v hmotnostních spektrálních datech. Data hmotnostní spektroskopie stanovují přesnou molekulovou hmotnost na 595,2722 (MH⁺, vypočteno 595,2727) pro derivát B, což indikuje vzorec C₂₆H₃₈N₆O₁₀. Optické hustoty derivátů A a B jsou následující: Derivát A [α]_D27 = -6,9 °C a derivát B [α]_D27 = 32 °C. Plné potvrzení ¹H a ¹³C NMR dat se provede pomocí rozkladu, COSY, HMQC a HMBC. Data jsou uvedena v tabulce 5.

Tabulka 5: ^1H a ^{13}C NMR data derivátu A a derivátu B v D-4 methanolu

Poloha	^1H (mult. integ. interakční konstanty)		^{13}C	
	Derivát A	Derivát B	A	B
2			152,9	154,7
3	8,6 (s, 1H)	8,54 (s, 1H)	144,2	144,4
5			152,9	151,1
6	8,6 (s, 1H)		144,2	145,6
7	5,84 (d, 1H, J=7,4 Hz)	2,95 (dd, 1H, J=13,9; 9,2) 3,10 (dd, 1H, J=13,9; 4,8)	74,0	37,5
8	4,72 (m, 1H)	4,48 (m, 1H)	52,1	50,2
9	4,24 (dd, 1H, J=11,5; 6,7 Hz) 4,30 (dd, 1H, J=11,5; 6,7 Hz)	4,11 (dd, 1H, J=11,4; 6,7)	63,5	66,3
10			174,8 $\ddagger$	174,7
11	4,20 (q, 1H, J=7,1 Hz)	4,20 (m, 1H)	50,3	49,8
12	1,2 (d, 3H, J=7,1 Hz)	1,17 (d, 3H, J=7,3)	17,8	18,1
13	5,84 (d, 1H, J=7,4 Hz)	5,80 (d, 1H, J=7,4)	74,0	73,9
14	4,72 (m, 1H)	4,70 (m, 1H)	52,1	52,1
15	4,24 (dd, 1H, J=11,5; 6,7 Hz) 4,30 (dd, 1H, J=11,5; 6,7)	4,20 (m, 1H) 4,30 (dd, 1H, J=11,6; 6,8)	63,5	63,6
16			174,8 $\ddagger$	174,7
17	4,20 (q, 1H, J=7,1 Hz)	4,20 (m, 1H)	50,3	50,4
18	1,2 (d, 3H, J=7,1 Hz)	1,20 (d, 3H, J=7,3 Hz)	17,8	17,8
19			171,4 $\ddagger$	171,4
20	2,1*	1,97	20,6**	20,6
21			172,9 $\ddagger$	172,4
22	2,0*	2,02	20,5**	22,5
23			172,3 $\ddagger$	172,5
24	1,95*	2,09	22,5**	22,6
25			172,3 $\ddagger$	172,9
26	1,95*	2,03	22,5**	20,7
27			172,9 $\ddagger$	171,4
28	2,0*	1,95	20,5**	20,6
29			171,4 $\ddagger$	
30	2,1*		20,6**	

5 *, **, $\ddagger$ – signály jsou zaměnitelné

Hmotnostní spektra sloučenin Ia a Ib poskytují dva molekulární ionty 400 a 384. Od těchto dat lze odvodit, že vzorec molekuly sloučeniny Ia je $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_6$ a sloučeniny Ib je $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_5$.
 10 Struktury Ia a Ib jsou určeny porovnáním NMR dat derivátu A a derivátu B s NMR daty směsi Ia a Ib. Struktury jsou následující:



Ia: R, R₁, R₂, R₃ = H

Ib: R, R₁, R₂ = H, R₃ = OH

5 Vlastnosti sloučenin Ia a Ib a jejich acetylovaných derivátů jsou shrnuty dále:

Derivát A:

10 Molekulová hmotnost: 652
 Empirický vzorec: C₂₈H₄₀N₆O₁₂
 UV (MeOH): 275,310 nm
 MS (FAB): (M+H) m/z 653,2801, kalc. 653,2782

Derivát B:

15 Molekulová hmotnost 594
 Empirický vzorec: C₂₆H₃₈N₆O₁₀
 UV (H₂O): 275,310 nm
 MS (FAB): (M+H) m/z 595,2722, kalc. 595,2727

Ia:

25 Molekulová hmotnost: 400
 Empirický vzorec: C₁₆H₂₈N₆O₆
 UV (MeOH): 275,310 nm
 MS (FAB): (M+H) 401

Ib:

30 Molekulová hmotnost 384
 Empirický vzorec: C₁₆H₂₈N₆O₅
 UV (H₂O): 275,310 nm
 MS (FAB): (M+H) 385

35 Příklad 8: Stanovení množství sloučenin Ia a Ib ve fermentačních směsích.

40 B.t. kmen EMCC-0080 se namnoží postupem popsáním v příkladu 1. Koncentrace sloučenin Ia a Ib ve fermentační směsi se stanoví kapilární elektroforézou. Konkrétně se pro stanovení množství využívá kapilární elektroforézní systém BioRad Biofocus 3000 s nepovlečenou kapilárou (50 µm x 50 cm), 0,1 M fosfát při pH 2,5, napětí 20 kV, pozitivní až negativní polarita, detekce při 200 nm. Byla použita druhá injekce vzorku o objemu 30 mikrolitrů za tlaku 34,475 kPa (5 psi). Doba analýzy je 10 minut u sloučenin Ia a Ib eluovaných při 6,0 a 5,9 minutách.

45 Alternativně se použije kapilární elektroforézní systém Beckman P/ACE 2100 s nepovlečenou kapilárou 50 mikrometrů x x 45 cm, 0,1 M fosfátový pufr při pH 2,5, napětí 20 kV, pozitivní až negativní polarita, detekce při 200 nm. Byl použit vzorek o objemu 30 mikrolitrů s deseti-sekundovou tlakovou injekcí. Doba analýzy je 10 minut u sloučenin Ia a Ib, které se eluují
 50 7,0 a 6,7 minut.

55 Buňky a další nerozpustné součásti se odstraní z kultury odstředěním a filtrací přes celitovou 0,2 mikrometrovou membránu. Výsledný supernatant se analyzuje kapilární elektroforézou, jak je uvedeno shora. Výsledky ukazují, že sloučeniny Ia a Ib jsou každá přítomny v množství asi 90 mg na jeden litr kultivační živné směsi.

Příklad 9: Stanovení účinnosti sloučenin Ia a Ib

Relativní účinnost surové směsi sloučenin Ia a Ib (zhruba 1:1 hmotnostně) se stanoví pomocí 5 Leptinotarsa texana testu a srovnáním mortality spojené s přípravou vnitřního standardu Bacillus thuringiensis subspecies tenebrionis. Foliární test se provádí pro stanovení účinku surové směsi sloučenin Ia a Ib Leptinotarsa texana. Pro provedení foliárního testu se standardy naváží do 50ml odstředivkových nádob a rozmáčkají se s deionizovanou vodou obsahující 0,1 % Tweenu 20. 1,200 mg standardu Bacillus thuringiensis subspecies tenebrionis se suspenduje na finální 10 koncentraci 12 000 µg/g. Testované vzorky (tj. NOVODORTM a NOVODORTM se sloučeninami Ia Ib) se zpracují podobným způsobem dokud poměr nalezený testem ukazuje, že dodaná dávka je příliš vysoká nebo příliš nízká k získání dostatečně průkazných dat, jestliže v tomto případě koncentrace primárního roztoku vzroste nebo klesne změnou množství rozpouštědla přidaného k výchozímu roztoku. Každý ze vzorků se pak homogenizuje 30 sekund s pomocí homogenizéru 15 Virtis a působí se na něj ultrazvukem po dobu 20 sekund s příkonem 100 W a pomocí ultrazvukového homogenizéru Braunsonic 1510. Každý z roztoků se pak zředí pomocí Hamilton Microlab 1000 tak, aby se získala řada sedmi zředění, 3000, 2000, 1333, 857, 545, 364 a 245 µg/ml v celkovém objemu 16 ml. Každý z těchto 16 ml vzorků se aplikuje na zhruba 0,186 m² (288 čtverečních palců) rostlinných listů pomocí rozprašovače Devries Linear Track 20 sprayer, kalibrovaného pro dodávání 1,87.10⁻² l/m² (20 galonů na akr). Kontrolní listy se postříkují 16 ml deionizované vody. Listy se suší na vzduchu a pak se umístí na hrdlo 28,35 g (1 uncového) čistého plastového pohárku, který obsahuje 5sekundový instar Leptinotarsa texana. Poté se umístí poklopy, které se stlačí, odřízne se kroužek o průměru 4 cm a zatěsni se uvnitř pohárku. Pohárky se pak otočí a larvy spadnou na ošetřený povrch listů. Pro každé ze sedmi 25 zředění se připraví 8 pohárků. Pohárky se pak uloží k sobě, označí, umístí na podložky a inkubují 3 dny při 30 °C a 65% relativní vlhkosti. Těchto 56 pokusných pohárků a 8 kontrolních pohárků představuje 1 biologický test.

Po třech dnech se vyhodnotí mortalita hmyzu. Každý z pohárků se umístí do ostrého proudění 30 a larvy, které se nepohybují se počítají za mrtvé. Vypočte se procento mortality a data se zpracují statistickou analýzou. Vyhodnotí se zvýšení účinnosti LC₅₀, LC₉₀, koeficient průkaznosti a odhadne se synergie.

Pro stanovení účinnosti se rozpustí surová směs, testuje a srovná se se standardem Bacillus 35 thuringiensis subspecies tenebrionis, který je hodnocen účinností 20 000 LTU/g (Leptinotarsa texana Units/gram).

Výsledky účinnosti jsou uvedeny v tabulce 6 a ukazují, že surová směs sloučenin Ia a Ib 40 (1:1 hmotnostně) má účinnost 75,555 LTU/g aktivní přísady při LC₅₀=70 µg/ml (1,8 mg celkové účinné složky na ml).

Tabulka 6: Účinnost směsi sloučenin Ia a Ib

Vzorek	LC ₅₀ µg/ml	odhadnutá účinnost
Ia/Ib směs	70	75,555 LTU

Příklad 10: Potenciace krystalického delta endotoxinu Bacillus thuringiensis subspecies 50 tenebrionis sloučeninami Ia a Ib.

Schopnost sloučenin Ia a Ib násobit (potenciovat) insekticidní aktivitu krystalického endotoxinu Bacillus thuringiensis subspecies tenebrionis vůči Leptinotarsa texana byla stanovena pro surovou směs sloučenin Ia a Ib, přidáním k NOVODORuTM a stanovení LC₅₀ cestou paralelní

- srovnávací analýzy. Foliární testy se prováděly na *Leptinotarsa texana*, jak je popsáno v příkladu 9, aby se zjistila úroveň potenciace dosažená přidáním sloučenin Ia a Ib k NOVODORTM. Surová směs sloučenin Ia a Ib se přidá k preparátu NOVODORTM. Roztoky se postupně zředí pomocí Hamilton Microlab 1000, aby se získal soubor vzorků o zředění NOVODORTM o hodnotách
- 5 1000,0, 666,7, 444,4, 285,7, 181,8, 121,2 a 80,0 µg/g. Dvě rozdílná zředění směsi Ia a Ib se připraví na základě sedmi postupných zředění obsahujících 72,0, 48,0, 32,0, 20,6, 13,1, 8,7 a 5,8 µg/g (2,5 % objemově s 1000 µg/g NOVODORTM) a 36,0, 24,0, 16,0, 10,3, 6,5, 4,4 a 2,9 µg/g (1,25 % objemově při 1000 µg/g NOVODORTM). Byly připraveny čisté vzorky (bez sloučenin Ia a Ib) a současně s tím referenční látky. LC₅₀ párových čistých vzorků bylo
- 10 rozděleno potenciovány hodnotami LC₅₀, pro zmenšení LC₅₀ směsi sloučenin Ia a Ib. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7 dále a indukují, že surová směs sloučenin Ia a Ib potenciuje insekticidní aktivitou NOVODORuTM vůči *Leptinotarsa texana*.

- 15 Tabulka 7: Potenciace NOVODORuTM se směsí sloučenin Ia a Ib vůči *Leptinotarsa texana*:

vzorek	LC ₅₀ µg/ml	potenciační faktor
NOVODOR TM	642	0
NOVODOR TM +1,25 Ia/Ib	250	2,6
NOVODOR TM +2,5% Ia/Ib	98	6,5

- 20 Příklad 11: Účinnost směsi sloučenin Ia a Ib vůči broukům *Ips calligraphus* a *Dendroctonus frontalis*

- Byla určena toxicita surové směsi sloučenin Ia a Ib vůči těmto broukům (*Ips calligraphus* a *Dendroctonus frontalis*). 3 ml surového roztoku sloučenin Ia a Ib (1,8 mg aktivní složky na ml), se přidají ke 5 gramům zmrazeného sušeného lýka kadidlové borovice a k sedmi mililitrům
- 25 destilované vody. Kontrolní potrava se připravila z 10 ml vody. Potrava byla rozdělena na tři Petriho misky a pro 5 až 10 dospělých brouků *Ips* nebo nedávno vylíhlých brouků *Dendroctonus*, kteří se umístí do každé misky. tři nezávislé skupiny ošetřených vzorků potravy a kontrolních vzorků potravy byly kolonizovány 10 až 20 hmyzími jedinci. Petriho misky byly inkubovány ve
- 30 tmě při 25 °C a byl spočítán počet mrtvých jedinců po 4, 7 a 10 až 12 dnech od umístění na potravu. Data jsou uvedena formou průměru ze tří nebo čtyř oddělených opakování pro každý hmyzí druh v následující tabulce 8 a 9:

- 35 Tabulka 8: Hodnocení směsi sloučenin Ia a Ib vůči *Ips caligryphus*:

Ošetření	Dny po ošetř.	počet jedinců	počet mrtvých	Průměrné % mortality
Kontrola	4	20	0	0
Kontrola	7	20	0	0
Kontrola	10	20	1	3
Ia/Ib	4	20	1	5
Ia/Ib	7	20	7	35
Ia/Ib	10	20	20	100

Výsledky testu pro *Dendroctonus frontalis* jsou uvedeny v tabulce 9, a ukazují, že směs sloučenin Ia/Ib je insekticidní.

Tabulka 9: Hodnocení směsi sloučenin Ia/Ib vůči *Dendroctonus frontalis*

Ošetření	Dny po ošetření	počet jedinců	počet mrtvých	Průměrné % mortality
Kontrola	4	14 až 20	0	0
Kontrola	7	14 až 20	1	7
Kontrola	10 až 12	14 až 20	3	16
Ia/Ib	4	10 až 20	1	5
Ia/Ib	7	10 až 20	1	5
Ia/Ib	10	20	14	83

5 Příklad 12: Účinnost vůči *Popillia japonica* (Japanese Beetle)

Surová směs sloučenin Ia a Ib byla testována na pesticidní účinnost vůči třetímu instaru *Popillia japonica*. Kořeny víceletého jílku (11 dní starého) byly ponořeny do surové směsi sloučenin Ia a Ib (1,8 mg látky Ia a Ib na 1 ml) a ponechány částečně schnout. Poté se umístí jedna larva třetího instaru *Popillia japonica* do nádoby s několika ošetřenými kořeny. Po 24 hodinách byly umístěny do nánosů jílové půdy Wooster. Kontrolní kořeny se ponoří do vody a neošetřené kontroly tvoří larvy, umístěné přímo do půdy první den. Nádoby se inkubují ve tmě při 25 °C a spočítají se mrtvé larvy po 7, 10, 21, 28 a 36 dnech a jako výsledek se uvede korigovaná mortalita: (Přežití kontroly–Přežití ošetřených)/Přežití kontroly) x 100 (%). Celkem se použije pro každé ošetření 25 larev. Výsledky, jak jsou uvedeny v tabulce 10, demonstrují, že surová směs sloučenin Ia a Ib je účinná vůči třetímu instaru *Popillia japonica*.

20 Tabulka 10: Účinnost látek Ia a Ib vůči *Popillia japonica*:

pokus	hodnota	7 dní	10 dní	21 dní	28 dní	36 dní
neošetřeno	počet mrtvých	2	2	4	5	5
voda (kontr.)	počet mrtvých	2	3	8	10	11
	% kontroly	0	4,3	19	25	30
Ia a Ib	počet mrtvých	6	8	13	14	15
	% kontroly	17,4	26,1	42,9	45	50

Příklad 13: Účinnost vůči *Epilachna varivensis*

Pesticidní účinnost vůči larvám třetího instaru larev *Epilachna varivensis* se v tomto testu stanovuje u surové směsi sloučenin Ia a Ib. Izolovaná kolonie dospělých jedinců *Epilachna varivensis* se udržuje potravou tvořenou sójovými boby v teráriu při osvětlení v poměru 16:8, při 27 °C (80 °F) a při 50% relativní vlhkosti. Hmota vajíček se sebere a vajíčka se ponechají vylíhnout na Petriho miskách, obsahujících vlhký bavlněný tampon a listy měsíčních fazolí. Po dvou dnech byly odebrány larvy ve stadiu druhého instaru a použity pro listový ponořovací test. test se provádí tak, že se nejprve listy sklídí, řapíky jednotlivých listů se postrčí gumovou přepážkou do pěstební nádoby s obsahem 4 ml vody. Jednotlivé listy se potom namočí v sekvenci zředěných účinných směsí koncentrací surového materiálu s obsahem sloučenin Ia a Ib 0 až 12 % objemově. Po uschnutí listů se na ně po 8 až 10 kusech umístí larvy *Epilachna varivensis* ve stadiu druhého instaru. Poté se hmyz, listy a pěstelské trubice umístí do papírových pohárků o hmotnosti 682 g (22 uncí) a pokryjí se jemným sítem. Tyto pohárky se ponechají ve stejné komoře, která byla použita pro chov kolonie brouků. Každé dva dny se pohárky z chovné komory vyndávají, larvy se zkontrolují a listy se nahradí čerstvě ošetřenými listy. Test se ukončí po osmi dnech.

Výsledky, které jsou uvedeny v tabulce 11, ukazují, že surová směs sloučenin Ia a Ib je účinná vůči larvám *Epilachna varivensis*.

Tabulka 11: Závislost mortality *Epilachna varivensis* na dávce:

Dny po ošetření	LC ₅₀ %	95% odvozená účinnost	
		spodní	horní
4	5,6	2,58	10,65
6	2,12	3,03	9,37
8	1,94	0,75	2,81

5 Příklad 14: Polní pokus s *Leptinotarsa decemlineata* (mandelinkou bramborovou)

Je testována účinnost vůči *Leptinotarsa decemlineata* na bramborách (varieta Kathadin) se surovou směsí sloučenin Ia a Ib při aplikaci 20 (50), 40 (100), 60 (150) a 120 (300) g/ha (g/akr) v kombinaci s NOVODORTM, jehož koncentrace byla 0,2 (0,5), 0,4 (1,0) l/ha (kvartů/akr), přičemž byl samostatně aplikován i NOVODORTM v koncentracích 0,2 (0,5), 0,4 (1,0) a 0,8 (2,0) l/ha (kvartů/akr). Ošetření se provádí dvakrát za 7 dní pomocí přenosného CO₂ postřikovače, vybaveného systémem se třemi kónickými rozstřikovacími tryskami TXVX-12 na jednu řadu a kalibrovaným pro dodání 32 GPA při rychlosti 4,8 km/h a tlaku 386 kPa (56 psi). Každé ošetření se opakuje čtyřikrát na parcelkách o dvou řadách (vzdálenost mezi řádkami 0,86 m (34 inch) o délce jednoho bloku 7,62 m (25 stop). Byli počítáni dospělci a larvy *Leptinotarsa decemlineata* bez poškozování listů na celé délce řádky 15,2 m (50 stop) v jedné parcelce.

Výsledky, jak jsou uvedeny na obr. 3, ukazují, že surová směs sloučenin Ia a Ib má významný synergický efekt při společném použití s prostředkem NOVODORTM na bramborách. Při 0,2 l/ha (0,5 kvartů/akr) NOVODORTM lze zaznamenat potlačení 21 %, zatímco při 20 g/ha (50 g/akr) surové směsi sloučenin Ia a Ib se dosáhne potlačení 13 %. Avšak když se pak použije kombinace prostředku NOVODORTM se surovou směsí sloučenin Ia a Ib ve stejných koncentracích, dosáhne se potlačení 81 %. Obdobně aplikací 40 g/ha (100 g/akr) samotné surové směsi sloučenin Ia a Ib se dosáhne 28% potlačení, aplikací 0,2 l/ha (0,5 kvartů/akr) samotného NOVODORTM dojde k 21% potlačení a při kombinovaném použití těchto prostředků při stejných koncentracích vzroste procento potlačení na hodnotu 81 %. Kromě toho společná aplikace 20 g/ha (50 g/akr) surové směsi sloučenin Ia a Ib a 0,4 l/ha (1,0 kvartů/akr) NOVODORTM umožní dosáhnout vzrůst potlačení na 88 %.

30 Uložení mikroorganismů

Podle Budapeštské dohody o ukládání mikroorganismů pro účely patentového řízení byly v mezinárodní sbírce s adresou Agricultural Research Service Patent Culture Collection Northern Regional Research Center (NRRL), 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, OSA, uloženy následující kmeny *Bacillus thuringiensis*:

Kmen	Sbírkové číslo	Datum uložení
EMCC-0077	NRRL B-21090	10. 5. 1993
EMCC-0078	NRRL B-21091	10. 5. 1993
EMCC-0079	NRRL B-21092	10. 5. 1993
EMCC-0080	NRRL B-21093	10. 5. 1993
EMCC-0081	NRRL B-21094	10. 5. 1993

Kmeny byly uloženy za podmínky, že přístup ke kulturám bude umožněn v průběhu řízení o této patentové přihlášce jen s povolením Commissioner of Patents and Trademarks podle 37 C.F.R. §§ 1.14 a 35, U.S.C. § 122. Depozita představují v podstatě čisté kultury každého uloženého kmene. Jsou přístupná, pokud to požadují zákony cizích zemí, pro ty země, ve kterých byl podán analog předmětné přihlášky nebo kde byla podána přihláška z ní odvozená. Tomu je však třeba

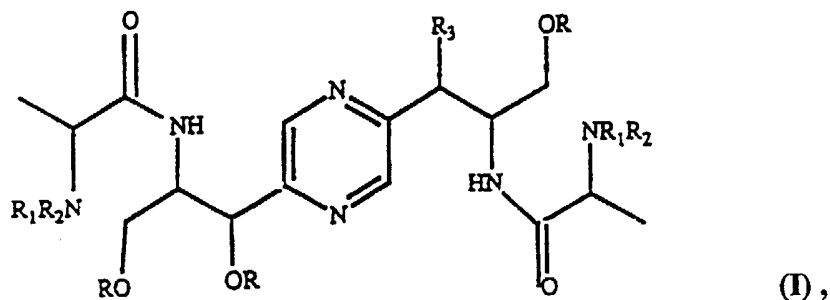
rozumět tak, že přístupnost depozita v tomto smyslu neznamená licenci k využívání předmětu vynálezu při omezení patentových práv, udělených vládním rozhodnutím.

- 5 Popsaný a chráněný vynález není omezen jen na rozsah konkrétních provedení, která jsou uvedena v popisu, neboť tato provedení jsou míněna jako ilustrace několika aspektů vynálezu. Jakékoliv ekvivalentní provedení patří do rozsahu vynálezu. Také různé modifikace, které může z popisu vynálezu vyvodit osoba znalá v oboru, spadají do rozsahu připojených patentových nároků.
- 10 Různé citované odkazy jsou svým popisem začleněny v přihlášce jako celek.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kmen *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21093 nebo jeho odpovídající mutant, který má stejné vlastnosti, produkující účinnou látku se strukturou I



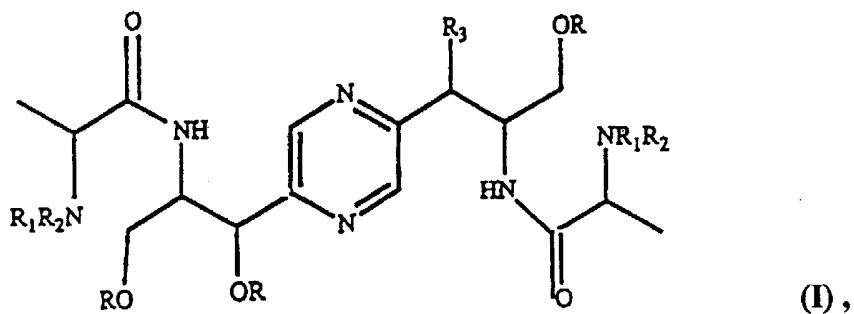
20

kde R, R₁, R₂ je vodík, R₃ je vodík nebo hydroxyl; s pesticidním účinkem a který je v supernatantu z fermentace tohoto kmene.

25

2. Kmen nebo jeho mutant podle nároku 1, kde supernatant z uvedené fermentace produkujícího kmene zahrnuje uvedenou látku mající pesticidní účinek proti hmyzímu škůdci řádu Coleoptera.

3. Kmen *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21090 nebo jeho odpovídající mutant, který má stejné vlastnosti, produkující účinnou látku se strukturou I



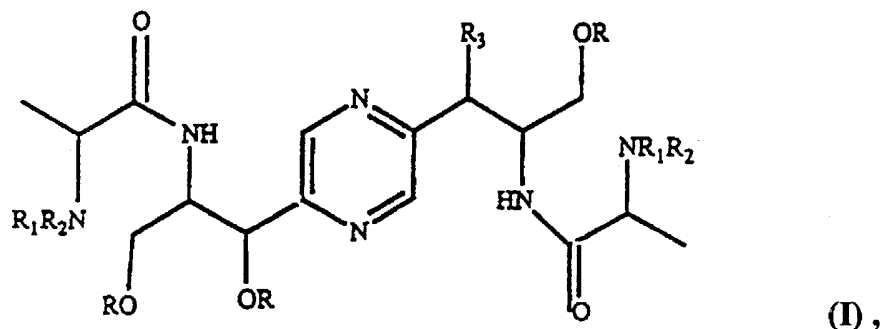
30

kde R, R₁, R₂ je vodík, R₃ je vodík nebo hydroxyl; s pesticidním účinkem a který je v supernatantu z fermentace tohoto kmene.

35

4. Kmen nebo jeho mutant podle nároku 3, kde supernatant z uvedené fermentace produkujícího kmene zahrnuje uvedenou látku mající pesticidní účinek proti hmyzímu škůdci řádu Coleoptera.

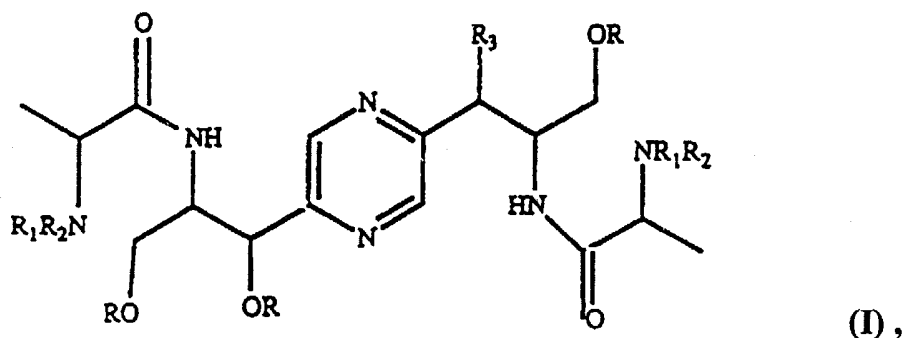
5. Kmen *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21091 nebo jeho odpovídající mutant, který má stejné vlastnosti, produkující účinnou látku se strukturou I



5 kde R, R₁, R₂ je vodík, R₃ je vodík nebo hydroxyl; s pesticidním účinkem a který je v supernatantu z fermentace tohoto kmene.

6. Kmen nebo jeho mutant podle nároku 5, kde supernatant z uvedené fermentace produkujícího kmene zahrnuje uvedenou látku mající pesticidní účinek proti hmyzímu škůdci řádu Coleoptera.

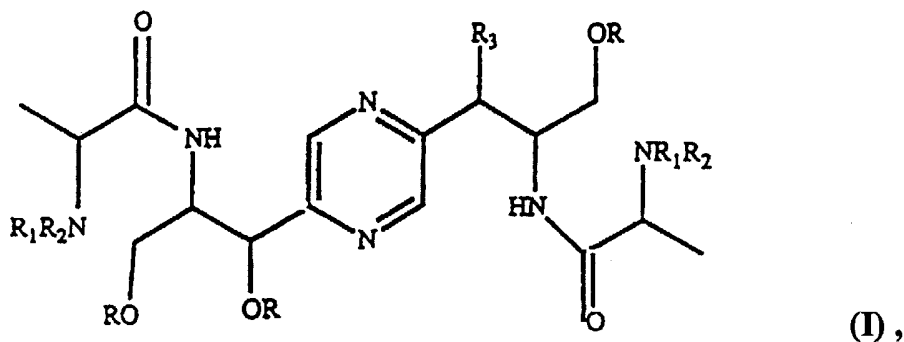
7. Kmen *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21092 nebo jeho odpovídající mutant, který má stejné vlastnosti, produkující účinnou látku se strukturou I



15 kde R, R₁, R₂ je vodík, R₃ je vodík nebo hydroxyl; s pesticidním účinkem a který je v supernatantu fermentace tohoto kmene.

8. Kmen nebo jeho mutant podle nároku 7, kde supernatant z uvedené fermentace produkujícího kmene zahrnuje uvedenou látku mající pesticidní účinek proti hmyzímu škůdci řádu Coleoptera.

9. Kmen *Bacillus thuringiensis* NRRL B-21094 nebo jeho odpovídající mutant, který má stejné vlastnosti, produkující účinnou látku se strukturou I



kde R, R₁, R₂ je vodík, R₃ je vodík nebo hydroxyl; s pesticidním účinkem a který je v supernatantu z fermentace tohoto kmene.

9. Kmen nebo jeho mutant podle nároku 9, kde supernatant z uvedené fermentace produkujícího kmene zahrnuje uvedenou látku mající pesticidní účinek proti hmyzímu škůdci řádu Coleoptera.

10. Způsob potírání hmyzích škůdců druhů řádu Coleoptera, vybraných ze skupiny sestávající z *Leptinotarsa decemlineata*, *Ips calligraphus*, *Dendroctonus frontalis*, *Epilachna varivestis* a *Popillia japonica*, zahrnující působení pesticidní kompozice na škůdce, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že na hmyzího škůdce působí kompozici zahrnující účinné množství látky se strukturou I definovanou v nároku 1, která má pesticidní účinek proti hmyzímu škůdci řádu Coleoptera a působí zároveň s různými pesticidy produkovanými mikroorganismy rodu *Bacillus*, přičemž uvedená látka se získává ze supernatantu z fermentace kmene *Bacillus thuringiensis* vybraného ze skupiny sestávající z kmenů NRRL B-21090, NRRL B-21091, NRRL B-21092, NRRL B-21093 a NRRL B-21094 nebo jejich odpovídajících mutantů a pesticidně účinného nosiče.

11. Způsob zesílení pesticidní účinnosti pesticidů produkovaných mikroorganismy rodu *Bacillus* při působení pesticidní kompozice na škůdce zahrnující látku s pesticidním účinkem a pesticidně účinný nosič, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se na hmyzího škůdce řádu Coleoptera působí za použití pesticidní kompozice, která zahrnuje účinnou látku struktury I definovanou v nároku 1, která má pesticidní účinek proti hmyzímu škůdci řádu Coleoptera a působí zároveň s různými pesticidy produkovanými mikroorganismy rodu *Bacillus*, přičemž uvedená látka se získává ze supernatantu z fermentace kmene *Bacillus thuringiensis* vybraného ze skupiny sestávající z kmenů NRRL B-21090, NRRL B-21091, NRRL B-21092, NRRL B-21093 a NRRL B-21094 nebo jejich odpovídajících mutantů, a pesticidně účinného nosiče v množství účinném k zesílení pesticidní účinnosti uvedeného pesticidu produkovaného mikroorganismy rodu *Bacillus*.

12. Způsob získávání v podstatě čisté látky se strukturou definovanou v nároku 1, která má pesticidní účinek proti škůdcům řádu Coleoptera a která působí proti škůdcům zároveň s různými pesticidy produkovanými mikroorganismy rodu *Bacillus*, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se uvedená látka získává ze supernatantu z fermentace kmene *Bacillus thuringiensis*, vybraného ze skupiny sestávající z kmenů NRRL B-21090, NRRL B-21091, NRRL B-21092, NRRL B-21093 a NRRL B-21094 nebo jejich odpovídajících mutantů kultivováním na vhodném růstovém médiu uvedeného kmene *Bacillus thuringiensis*, u něhož je v podstatě veškerá pesticidní účinnost v supernatantu z fermentace uvedeného kmene, oddělí se supernatant, přičemž se ze supernatantu izoluje a získá se v podstatě čistá účinná látka se strukturou I.

Konec dokumentu
