

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2020-287

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.05.2020**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **01.12.2021**

(Věstník č. 48/2021)

A01N 59/16 (2006.01)
A01N 59/20 (2006.01)
A01N 25/02 (2006.01)
A01N 59/00 (2006.01)
C08K 3/04 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 40/00 (2011.01)

(71) Přihlašovatel:
Mendelova univerzita v Brně, Brno, Černá Pole, CZ

nanokompozitního materiálu připravitelného tímto způsobem, přípravku na ochranu rostlin proti *Xanthomonas euvesicatoria* a jejich použití.

(72) Původce:
Ing. Zuzana Bytešníková, Ph.D., Tišnov, CZ
RNDr. Lukáš Richtera, Ph.D., Brno, Bystrc, CZ
prof. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D., Brno, Veveří, CZ
Ing. Dorota Tekielska, Krakov, PL
Ing. Jakub Pečenka, Choryně, CZ
Ing. Aleš Eichmeier, Ph.D., Rajhrad, CZ
prof. Ing. Robert Pokluda, Ph.D., Břeclav, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsob přípravy nanokompozitního materiálu na bázi redukováného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, nanokompozitní materiál, přípravek jej obsahující a jeho použití

(57) Anotace:
Předkládané řešení se týká způsobu přípravy nanokompozitního materiálu na bázi redukováného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, který obsahuje následující kroky:
i) připraví se grafen oxid reakcí grafitu s kyselinou sírovou a manganistanem draselným; reakční produkt se následně smísí s vodným roztokem peroxidu vodíku a promyje se za vzniku suspenze grafen oxidu ve vodě;
ii) připraví se suspenze grafen oxidu ve vodném roztoku dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, přičemž molární poměr dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého je 1:1, a přičemž hmotnostní poměr grafen oxidu ku dusičnanu stříbrnému ku octanu měďnatému je 1 : 8,5 : 9,1;
iii) suspenze z kroku ii) se zredukuje redukčním činidlem za vzniku nanokompozitního materiálu, obsahujícího redukováný grafen oxid, v jehož struktuře jsou inkorporované nanočástice stříbra a mědi. Předkládané řešení se dále týká

Způsob přípravy nanokompozitního materiálu na bázi redukováného grafenu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, nanokompozitní materiál, přípravek jej obsahující a jeho použití

5

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu přípravy redukováného grafenu v nanokompozitu s dusičnanem stříbrným a octanem měďnatým. Tento kompozit může být využit pro snížení exprese genů specifických pro různé patogeny rostlin, čímž je dosaženo inhibice replikace patogenů.

15

Dosavadní stav techniky

Xanthomonas euvesicatoria patří mezi nejvýznamnější patogeny rajčat a paprik. Je to gram-negativní, nesporulující aerobní bakterie ve tvaru krátkých tyčinek o rozměru $0,4-0,6 \times 1,0-1,8 \mu\text{m}$. Škody způsobuje v mírném až tropickém klimatu v celosvětovém měřítku. Zásadní škody se objevují při napadení mladých rostlin, které mohou vést ke kompletní ztrátě výnosu. Na všech částech rostliny se objevují menší skvrnky, zprvu vodnaté a se žlutým okrajem, mají hranatý tvar, postupně se rozrůstající a vedoucí ke stáčení a odumírání listů a tím k defoliaci rostliny. Květy opadávají, na plodech jsou vodnaté puchýřky, které obklopuje světleji zbarvené halo. Následně skvrny hnědnou a propadávají se.

Primární infekce pochází často z osiva. Šíření v půdě je omezené, protože *Xanthomonas euvesicatoria* dlouhodobě v půdě nevydrží, pokud nepřežívá v rostlinných zbytcích. Do rostliny vniká průduchy nebo poraněním. Optimální teploty pro šíření jsou okolo 24 až 28 °C.

Vzhledem k faktu, že produkce rajčat a paprik je celosvětově velmi významná, je v zájmu pěstitelů nalézt účinnou ochranu vůči tomuto patogenu.

Dosud byla proti *Xanthomonas euvesicatoria* používána ochrana, založená na použití měďnatých přípravků vytvářejících souvislý povlak mědi, která brání vstupní infekci. Doporučuje se již preventivní ošetření před výskytem patogenů. Dále byly v rámci výzkumu zjištěny aktivátory rezistence rostlin vůči *Xanthomonas euvesicatoria*, například acibenzolar-S-methyl (přípravek Actigard), nicméně v podmínkách ČR není registrován. Probíhá i výzkum šlechtění na rezistenci.

V rámci ochrany vůči bakteriálním chorobám je na trhu registrován přípravek Kocide 2000 (Spiess-Urania Chemicals, GmbH, SRN) s účinnou látkou hydroxidem měďnatým ($53,8 \% = 35 \% \text{ kovové mědi}$). Jde o postřikový, kontaktně působící fungicid a baktericid ve formě ve vodě dispergovatelných mikrogranulí k ochraně brambor, chmele, révy, rajčat, okurek a tykvovité zeleniny, broskvoní, jabloní, hrušní, meruněk, cukrovky a okrasných dřevin proti houbovým a bakteriálním chorobám. Na rostlině vytváří viditelný, jemný, modrozelený, rovnoměrně rozprostřený povlak, který je odolný smývání deštěm.

K ochraně rajčat je povoleno maximálně 5 aplikací za sezónu v množství 3,5 kg přípravku, přitom celková dávka Cu na 1 ha rok nesmí překročit (společně s jinými přípravky) 4 kg. U jiných plodin jsou obecně povolené dávky nižší. Ochranná lhůta je 7 dnů.

Mimoto jsou v registru jako baktericidy uvedeny Badge WG, Coprantol Duo (Isagro S.p.A.), Cobran, Cuprozin progress, Defender Dry, Funguran progress (Spiess-Urania GmbH). Všechny přípravky mají stejnou účinnou látku jako Kocide 2000 a především u všech končí doba platnosti registrace nebo spotřebování zásob nejpozději 1. 5. 2021. U přípravku Kocide 2000 končí registrace 1. 1. 2020.

55

S účinnou látkou hydroxid mědi jsou registrovány dále přípravky vedené s biologickou účinností pouze jako fungicidy:

- Airone SC, Coprantol Duo, Grifon SC (Isagro S.p.A., platnost do 1. 1. 2020),
- Bukanyr (Lovela Terezín s.r.o., platnost do 31. 1. 2020),
- Champion 50 WG (Nufarm AG, AgroBio Opava s.r.o., Agro CS a.s., Lovela Terezín s.r.o., platnost do 1. 1. 2023),
- Cuprozin progress (ÚKZUZ, Spiess-Urania Chemicals GmbH, platnost 1. 1. 2020)
- Kadeřavost STOP (Agro CS a.s., platnost 1. 1. 2023)

Cílem předkládaného vynálezu je tedy poskytnout přípravek pro ochranu rostlin, zejména rajčat, ale i paprik a dalších rostlin, proti *Xanthomonas euvesicatoria* a dalším patogenům.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká způsobu přípravy redukováného grafenoxidu v nanokompozitu s dusičnanem stříbrným a octanem měďnatým. Tento kompozit může být využit pro snížení exprese genů specifických pro různé patogeny rostlin. Nanokompozitní materiál je připraven reakcí octanu měďnatého a dusičnanu stříbrného s roztokem grafenoxidu a jejich následnou redukcí tetrahydridoboritanem sodným za tvorby nanočástic.

Aplikací nanokompozitu rGO-Cu-Ag na rostliny není ovlivněna exprese žádného testovaného genu, rostliny nevykazují stres, ale u vybraných proteinů aplikace tohoto nanokompozitu vede k redukcí exprese genů u rostlin ošetřených nanočásticemi a poté infikovaných bakteriemi. Nanokompozit rostliny nestresuje, naopak redukuje expresi genů specifických pro různé patogeny rostlin.

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob přípravy nanokompozitního materiálu na bázi redukováného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, který obsahuje následující kroky:

- i) připraví se grafen oxid reakcí grafitu s kyselinou sírovou a manganistanem draselným; reakční produkt se následně smísí s vodným roztokem peroxidu vodíku a promyje se za vzniku suspenze grafen oxidu ve vodě;
- ii) připraví se suspenze grafen oxidu z kroku i) ve vodném roztoku dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, přičemž molární poměr dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého je 1:1, a přičemž hmotnostní poměr grafen oxidu ku dusičnanu stříbrnému ku octanu měďnatému je 1 : 8,5 : 9,1;
- iii) suspenze z kroku ii) se zredukuje redukčním činidlem za vzniku nanokompozitního materiálu (rGO-Cu-Ag), obsahujícího redukováný grafen oxid, v jehož struktuře jsou inkorporované nanočástice stříbra a mědi.

Nanočásticemi se rozumí částice o velikosti v rozmezí od 1 do 100 nm.

S výhodou se grafen oxid v kroku i) připraví tak, že se grafitové vločky (s výhodou 5 g) přidají ke koncentrované H_2SO_4 (s výhodou 670 ml, 96 %) a následně se přidá KMnO_4 (s výhodou 30 g). Takto připravená reakční směs se intenzivně míchá po dobu alespoň 10 dnů. Oxidace grafitu se ukončí přidáním vodného roztoku H_2O_2 (s výhodou 250 ml, 30% hmotn.) za intenzivního míchání

a chlazení. Vytvořený oxid grafitu se promyje 1 M HCl a následně vodou do konstantní hodnoty pH (3–4).

5 S výhodou se suspenze grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého v kroku ii) připraví smícháním vodných roztoků dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého na výslednou koncentraci 5 mM AgNO_3 a 5 mM $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ a následné přidání tohoto roztoku po kapkách za intenzivního míchání k vodné suspenzi grafen oxidu z kroku i) o koncentraci 5 g/l.

10 Ve výhodném provedení je redukčním činidlem tetrahydridoboritan sodný. S výhodou se redukční činidlo v kroku iii) použije v množství alespoň osminásobku hmotnosti grafen oxidu v suspenzi.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále nanokompozitní materiál na bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, připravitelný postupem podle předkládaného vynálezu. Tento materiál obsahuje redukovaný grafen oxid (rGO), v jehož struktuře jsou
15 inkorporované nanočástice mědi a stříbra.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále přípravek pro ochranu rostlin, zejména rajčat, ale i paprik a dalších rostlin, proti *Xanthomonas euvesicatoria*. Přípravek obsahuje vodnou suspenzi nanokompozitního materiálu na bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého (rGO-Cu-Ag), připravitelnou postupem podle předkládaného vynálezu. S výhodou je
20 koncentrace rGO-Cu-Ag v přípravku alespoň 0,01 $\mu\text{g/ml}$, výhodněji alespoň 0,05 $\mu\text{g/ml}$, ještě výhodněji alespoň 0,1 $\mu\text{g/ml}$, nejvýhodněji 5 $\mu\text{g/ml}$. Horní hranice koncentrace rGO-Cu-Ag v přípravku není omezená, přípravek může být ve formě koncentráту, sloužícím k pozdějšímu naředění uživatelem. Přípravek může dále obsahovat pomocné látky. Pomocnou látkou se rozumí
25 rozpouštědla (zejména voda), povrchově aktivní látky (surfaktanty - neiontové, kationtové nebo aniontové surfaktanty), emulgátory, dispergační látky, zvlhčovačla, smáčedla, stabilizátory (např. rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje), odpěňovače (např. silikonový olej), konzervační přípravky, viskozitní činidla, pojiva, lepidla, a popřípadě hnojiva.

30 Přípravek podle předkládaného vynálezu se může aplikovat na celé rostliny, na listy, rostlinné orgány nebo rostlinné buňky v tkáňových kulturách.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž použití nanokompozitního materiálu na bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého v zemědělství. S výhodou
35 lze tento materiál použít pro ošetření rostlin proti *Xanthomonas euvesicatoria*, zejména pro ochranu rajčat a paprik. Ošetření lze provést postřikem suspenze nanokompozitu na listy a stonky rostlin již v jejich raném stádiu vývoje.

Vhodné je ošetřit porost preventivně, a to zejména na lokalitách, kde již byla bakterie
40 zaznamenána. První ošetření by mělo proběhnout již ve fázi 4 pravých listů, v koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$ (50 l/m^2 nebo 500 l/ha). Další ošetření by potom mělo být provedeno s ohledem na výskyt patogenu.

45 Objasnění výkresů

Obr. 1: Schematické znázornění postupu syntézy rGO-Cu-Ag nanokompozitu z GO a SEM
obrázky výchozího materiálu GO (A), připraveného nanokompozitu rGO-Cu-Ag (B) a EDS
analýzy rGO-Cu-Ag zobrazující elementární složení (C).

50

Obr. 2: Aparatura syntézy kompozitu rGO-Cu-Ag.

Obr. 3: *In vitro* testy důkazu synergního účinku rGO-Cu-Ag dle Příkladu 4.

Obr. 4: Srovnání účinnosti kompozitu rGO-Cu-Ag s přípravkem Kocide 2000 (účinná látka hydroxid měďnatý 53,8 % = 35 % hmt. kovové mědi) na skvrnitost rajčat. Četnost symptomů černé tečkovitosti na rajčatech 7. a 14. den po inokulaci, sloupce se statisticky významným rozdílem (hodnoty $p \leq 0.05$, Duncanův test) jsou mezi sebou rozlišeny písmeny.

Obr. 5: Neošetřená a neinokulovaná kontrola (31 dní po výsevu)

Obr. 6: Negativní kontrola – rostliny ošetřené nanokompozitem (31 dní po výsevu)

Obr. 7: Rostliny ošetřené nanokompozitem a následně inokulovány bakterií *Xanthomonas euvesicatoria* (31 dní po výsevu)

Obr. 8: Pozitivní kontrola – rostliny inokulovány bakterií *Xanthomonas euvesicatoria* (31 dní po výsevu)

Obr. 9: Výsledky relativní exprese vybraných genů v Příkladu 7: btub = referenční kontrola referenčního genu pro betatubulin, PR1 = pathogenesis-related protein kódující gen pro glukano-endo-1,3-beta-D-glucosidázu, pop = sekvenční kódující gen pro polyfenol oxidázu, cat = sekvenční kódující gen pro katalázu, prq = sekvenční kódující gen pro tvorbu zásadité formy b-1,3-glukanázy III. třídy, tomq = sekvenční kódující gen pro kyselou formu b-1,3-glukanázy III. třídy.

Příklady uskutečnění vynálezu

Vynález je dále blíže popsán pomocí příkladů provedení, které však žádným způsobem neomezují jiná možná provedení v rozsahu patentových nároků.

Příklad 1: Příprava grafenoxidu (GO)

5 g grafitových vloček (Sigma-Aldrich a 100 mesh, $\geq 75\%$ min) bylo přidáno ke koncentrované H_2SO_4 (670 ml) a následně byl přidán 30 g KMnO_4 . Takto připravená reakční směs byla intenzivně míchána. Po 10 dnech byla oxidace grafitu ukončena přidáním roztoku H_2O_2 (250 ml, 30% hmotn. v H_2O , Penta, Chrudim, Česká republika). Roztok H_2O_2 byl přikapáván pomalu a celá směs byla intenzivně chlazená a míchána. Vytvořený oxid grafitu byl promyt 6 l 1 M HCl a následně vodou Milli-Q (celkový použitý objem 10 l), dokud nebylo dosaženo konstantní hodnoty pH (3–4).

Příklad 2: Příprava kompozitu rGO-Cu-Ag

Vodné roztoky dusičnanu stříbrného (25 ml, 10 mM) a octanu měďnatého (25 ml, 10 mM) byly po kapkách přidány k vodnému roztoku GO (1 ml, 5 g/l) za intenzivního míchání. Poté bylo do reakční směsi pomalu přidáno redukční činidlo $\text{Na}[\text{BH}_4]$ (40 mg) a výsledná směs byla intenzivně míchána po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Připravený nanokompozit byl třikrát promyt vodou Milli-Q. Konečný objem byl upraven na 10 ml. Koncentrace kompozitu byla stanovena na 5 g/l. Připravený kompozit byl charakterizovaný pomocí SEM (rastrovací elektronové mikroskopie) a EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) - viz Obr. 1.

Dispergované vzorky byly zředěny v poměru 1:20 Milli-Q vodou a následně ponechány uschnout na silikonové destičce při laboratorní teplotě (20 až 25 °C). Destička byla poté analyzována pomocí MAIA 3 SEM (TESCAN Ltd, Brno, Czech Republic), detektor In-Beam SE, 5 keV, vzdálenost 3 mm.

Elementární složení kompozitu podle předkládaného vynálezu bylo studováno pomocí EDS metody, detektorem EDX na MIRA 2 SEM (TESCAN Ltd, Brno, Czech Republic), In-Beam SE 15 keV, vzdálenost 15 mm.

FTIR analýza GO obsahovala pásy odpovídající vibracím C–O (1050 cm^{-1}), C=C (1631 cm^{-1}), C=O (1737 cm^{-1}), C–H (2925 cm^{-1}). Široký pás 3322 cm^{-1} odpovídal O–H vibracím. Analýza rGO-Cu-Ag obsahovala pásy, odpovídající C–O (1105 cm^{-1} a 1339 cm^{-1}) a O–H (2998 cm^{-1} a 3549 cm^{-1}). Poredukci $\text{Na}[\text{BH}_4]$ byly zachovány pásy O–H skupin a dále jsou přítomné další alkoholy, které jsou výsledkem hydrolyzy esterů boru.

Příklad 3: Příprava kompozitů rGO-Ag a rGO-Cu pro potvrzení synergního účinku iontů Ag a Cu

Vodný roztok dusičnanu stříbrného (50 ml, 10 mM) pro syntézu rGO-Ag nebo octanu měďnatého (50 ml, 10 mM) pro syntézu rGO-Cu byl přidán k vodnému roztoku GO (1 ml, 5 g/l) za intenzivního míchání. Poté bylo do reakční směsi pomalu přidáno redukční činidlo $\text{Na}[\text{BH}_4]$ (40 mg) a výsledná směs byla intenzivně míchána po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Připravený nanokompozit byl třikrát promyt vodou Milli-Q. Konečný objem byl upraven na 10 ml.

Příklad 4: Antibakteriální aktivita kompozitu rGO-Cu-Ag vs. rGO-Ag a rGO-Cu

Byly zkoumány antibakteriální vlastnosti kompozitu rGO-Cu-Ag vůči bakteriálnímu kmeni *X. euvesicatoria* a porovnány s antibakteriálními vlastnostmi rGO-Ag a rGO-Cu.

Antibakteriální aktivita byla posuzována metodou stanovení počtu žijících bakterií dle colony-forming units (CFU). Bakteriální kmen *X. euvesicatoria* č. 2968 byl poskytnut sbírkou mikroorganismů National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB, London, UK) a byl kultivován v Luria-Bertani (LB) médiu (Sigma-Aldrich) při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc. Následně byly bakterie upraveny na optickou hustotu 600 nm (OD_{600}) a následně sériově naředěny LB médiem. Výsledné suspenze byly smíchány v poměru 1:1 se suspenzemi rGO-Cu-Ag, rGO-Cu a rGO-Ag, připravenými v Příkladech 2 a 3 na výsledné koncentrace 5, 0,1 a $0,01\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Suspenze byly inkubovány 24 hodin při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ a třepány 110 rpm. Pro přípravu neošetřené kontroly byla použita sterilní destilovaná voda místo suspenze nanokompozitu.

Pro stanovení počtu žijících bakterií byla použita metoda “pour plate method” (metoda pro výpočet bakterií tvořících kolonie přítomných v kapalném vzorku). $100\text{ }\mu\text{L}$ vzorky z každé směsi byly naředěny v desetinásobných sériích. $100\text{ }\mu\text{L}$ z každého naředěného vzorku bylo napipetováno do středu sterilní Petriho misky (průměr 90 mm) a ke vzorku bylo přidán sterilní plate count agar (Himedia, Mumbai, India) ($44\text{ až }46\text{ }^{\circ}\text{C}$), který byl promíchán se vzorkem. Vzorky byly následně ochlazeny na pokojovou teplotu a inkubovány při $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 40 hodin. Vytvořené kolonie bakterií byly poté spočítány a vyjádřeny jako procento CFU z neošetřené kontroly.

Jak ukazuje Tabulka 1 a Obr. 3, bakteriální růst byl inhibován všemi třemi zkoumanými kompozity při použití koncentrace nanokompozitů $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Při nižších koncentracích byly pozorovány rozdíly v antibakteriálních vlastnostech kompozitů, přičemž kompozit rGO-Cu-Ag dle předkládaného vynálezu vykazoval největší antibakteriální účinky.

Tabulka 1: Antibakteriální účinky kompozitů na růst bakterií kmene *X. euvesicatoria*. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento rostoucích bakterií v porovnání s neošetřenou kontrolou.

Koncentrace kompozitu ($\mu\text{g/mL}$)	Bakteriální růst (%)		
	rGO-Ag	rGO-Cu	rGO-Cu-Ag
5	0	0	0
0,1	16,28	93,8	30,12
0,01	96,28	97,57	33,57

Z Tabulky 1 a Obr. 3 je zřejmé, že rGO-Cu a rGO-Ag vykazovaly antibakteriální aktivitu pouze v koncentraci $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ (rGO-Cu), popř. ještě $0,1\text{ }\mu\text{g/mL}$ (rGO-Ag), kompozit rGO-Cu-Ag dle

předkládaného vynálezu vykazoval synergický účinek a potlačoval efektivně bakteriální růst i při koncentraci 0,01 µg/mL.

Výsledky antibakteriálních *in vitro* testů byly základem pro následné testy na rostlinách.

5 Příklad 5: Skleníkový experiment účinku kompozitu rGO-Cu-Ag na rostliny rajčat

Pro experiment byl použit kultivar rajčete odrůdy Mandat. Rostliny byly pěstovány v 280 ml nádobách obsahujících standardní substrát TS 4 (Klasmann-Deilmann GmbH, Geeste, Germany) a udržovány při 22 až 26 °C a ≥ 70 % relativní vlhkosti vzduchu. Pro experiment byly použity rostliny ve stádiu čtyř listů, na které byl sprejem aplikován nanokompozit podle předkládaného vynálezu, připravený v Příkladu 2 a naředěný na koncentrace 50 a 500 µg·mL⁻¹. Po 24 hodinách byla na rostliny sprejem aplikována bakteriální suspenze *X. euvesicatoria* (1×10^8 CFU). Po inokulaci byly rostliny zakryty polyethylenovými pytli na dobu 48 hodin, aby se zvýšila vlhkost. Pro pozitivní kontrolu byl místo nanokompozitu použit sterilní vodný solný roztok. Negativní kontrola byla ošetřena pouze nanokompozitem v koncentraci 500 µg·mL⁻¹ a místo roztoku bakterií byl použit sterilní vodný solný roztok. Jako další způsob ošetření byl zvolen 0,35% hmt. standardní komerční přípravek Kocide® 2000 (DuPont, Wilmington, DE, USA), který obsahuje jako účinnou látku hydroxid měďnatý 53,8 hmotn. % = 35 hmotn. % kovové mědi. Každému z výše popsaných ošetření bylo podrobeno 10 rostlin a celý experiment byl dvakrát opakován. Analýza symptomů byla provedena sedmý a čtrnáctý den po inokulaci. Bakteriální symptomy byly vyhodnoceny na základě čtyřstupňové stupnice: 0 – zdravé listy bez symptomů, 1 – nízké zastoupení symptomů (1 až 3 skvrny na listu), 2 – třetina povrchu listu infikována, 3 – vysoký výskyt symptomů (více než třetina povrchu listu infikována). Na základě vyhodnocení symptomů byl stanoven stupeň závažnosti infekce v procentech (DS, disease severity) pomocí následujícího vzorce:

$$\text{stupeň závažnosti infekce} = \frac{\text{suma (počet rostlin v určitém stupni onemocnění} \times \text{určitý stupeň onemocnění)}}{\text{celkový počet rostlin} \times \text{maximální stupeň onemocnění}} \times 100$$

Výsledky získané na rostlinách rajčat sedm a čtrnáct dní po inokulaci jsou vyobrazené na Obr. 4. Stupeň závažnosti infekce je podstatně nižší u rostlin ošetřených rGO-Cu-Ag než u rostlin ošetřených přípravkem Kocide® 2000 a než u pozitivní kontroly.

Příklad 6: Ošetření rostlin pomocí kompozitu rGO-Cu-Ag

Pro sledování účinku aplikace nanokompozitu byly využity 4 varianty:

- neošetřená kontrola,
- rostliny ošetřené nanokompozitem připraveným v Příkladu 2,
- rostliny ošetřené nanokompozitem připraveným v Příkladu 2 a následně inokulované bakterií *Xanthomonas euvesicatoria*,
- rostliny neošetřené nanokompozitem a inokulované bakterií *Xanthomonas euvesicatoria*

Nanokompozitní materiál připravený dle Příkladu 2 o objemu 10 ml a koncentraci 5 g/l byl naředěn vodou na koncentraci kompozitu 500 µg/l a následně byl aplikován postřikem v koncentraci (50 ml/m²) na každou rostlinu rajčete ve fázi 4 pravých listů. Pro inokulaci byl využit bakteriální kmen *Xanthomonas euvesicatoria* v suspenzi 1.108 KTJ (kolonii tvořících jednotek). Rostliny byly analyzovány 31 dní po výsevu: neošetřená a neinokulovaná kontrola (Obr. 5), negativní kontrola – rostliny ošetřené nanokompozitem (Obr. 6), rostliny ošetřené nanokompozitem a následně inokulované bakterií *Xanthomonas euvesicatoria* (Obr. 7) a pozitivní kontrola – rostliny

inokulovány bakterií *Xanthomonas euvesicatoria* (Obr. 8). Z obrázků je patrné, že nanokompozit rGO-Cu-Ag účinně inhibuje rozvoj onemocnění způsobeného kmenem *Xanthomonas euvesicatoria* a navíc nebyl pozorován žádný fytotoxický efekt nanokompozitu na studované rostliny.

5

Příklad 7: Vliv rGO-Cu-Ag na relativní expresi genů v rostlinách rajčat

Pro sledování účinku aplikace nanokompozitu rGO-Cu-Ag byly využity 4 varianty rostlin, stejně jako v Příkladu 6 (varianta 1 = neošetřená kontrola, varianta 2 = rostliny ošetřené nanokompozitem připraveným v Příkladu 2, varianta 3 = rostliny ošetřené nanokompozitem připraveným v Příkladu 2 a následně inokulovány bakterií *Xanthomonas euvesicatoria*, varianta 4 = rostliny neošetřené nanokompozitem a inokulované bakterií *Xanthomonas euvesicatoria*).

Pro sledování účinku rGO-Cu-Ag byla izolována celková RNA. Pro extrakci celkové RNA byly použity rostliny rajčat odrůdy 'Mandat', RNA byla extrahována s využitím kitu Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA). Extrakce RNA byla provedena neprodleně po prvním výskytu symptomů černé tečkovitosti, a to z 6 týdnů starých rostlinných pletiv, přičemž odběr vzorků proběhl současně ze všech 4 variant (pro varianty viz Obr. 9). Byly odebrány symptomatické části rostlin, a to listy a části stonků. Rostlinné pletivo bylo homogenizováno s využitím tekutého dusíku, přičemž pro extrakci RNA z jednoho vzorku bylo použito vždy 100 mg homogenizovaného rostlinného pletiva. Pro test genové exprese byly optimalizovány protokoly pro celkem 11 genů, z toho 2 pro geny referenční, následně bylo vybráno 6 genů z důvodu jejich exprimace v důsledku různých typů stresů u rostlin.

Expresí kontrolního genu btub (*betatubulin*) byla u všech čtyř variant 1-4 stejná, relative quantity (RQ) v hodnotě 1,5. Kvantifikace exprese genu PR1 (pathogenesis-related protein 1 kódující gen pro glukon endo-1,3-beta-D-glucosidázu) poskytla hodnoty RQ var. 1 (0), var. 2 (0), var. 3 (3,2) a var. 4 (13,8) (viz. Obr. 9). Ošetření nanokompozitem snížilo expresi genu PR1 4,3 krát. Velmi podobné výsledky exprimace byly zaznamenány u dalších genů pop (sekvence kódující prekurzor pro polyfenol oxidázu), cat (sekvence kódující gen pro katalázu) a prq (sekvence kódující gen pro tvorbu zásadité formy b-1,3-glukanázy III. třídy) spojených s obrannou reakcí rostlin. Snížení exprimace genů spojených s biotickým stresem rostlin potvrzuje antagonistický účinek rGO-Cu-Ag.

35

Průmyslová využitelnost

Připravený a použitý nanokompozitní materiál popsáný dle vynálezu je využitelný pro snížení exprese genů specifických pro různé patogeny rostlin. Pro jeho výhodné vlastnosti lze očekávat jednodušší aplikaci v zemědělské praxi. Tento nanokompozitní materiál je možné použít v oblasti ochrany rostlin a rostlinných materiálů.

40

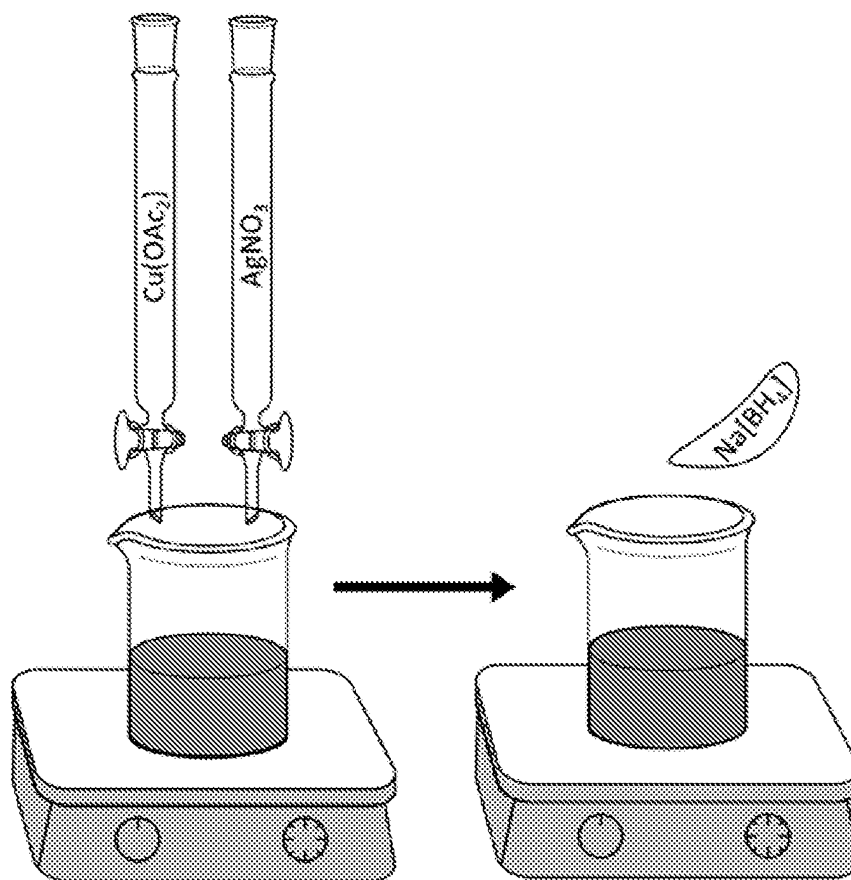
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob přípravy nanokompozitního materiálu na bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, **vyznačený tím**, že obsahuje následující kroky:
- 10 i) připraví se grafen oxid reakcí grafitu s kyselinou sírovou a manganistanem draselným; reakční produkt se následně smísí s vodným roztokem peroxidu vodíku a promyje se za vzniku suspenze grafen oxidu ve vodě;
- 10 ii) připraví se suspenze grafen oxidu ve vodném roztoku dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, přičemž molární poměr dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého je 1:1, a přičemž hmotnostní poměr grafen oxidu ku dusičnanu stříbrnému ku octanu měďnatému je 1 : 8,5 : 9,1;
- 15 iii) suspenze z kroku ii) se zredukuje redukčním činidlem za vzniku nanokompozitního materiálu, obsahujícího redukovaný grafen oxid, v jehož struktuře jsou inkorporované nanočástice stříbra a mědi.
- 20 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že redukční činidlo je tetrahydridoboritan sodný.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že redukční činidlo v kroku iii) se použije v množství alespoň osminásobku hmotnosti grafen oxidu v suspenzi.
- 25 4. Nanokompozitní materiál na bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého, připravitelný postupem podle kteréhokoli z nároků 1 až 3.
5. Přípravek pro ochranu rostlin proti *Xanthomonas euvesicatoria*, **vyznačený tím**, že obsahuje vodnou suspenzi nanokompozitního materiálu na bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého podle nároku 4, a alespoň jednu pomocnou látku, vybranou ze
- 30 skupiny zahrnující rozpouštědla, povrchově aktivní látky, emulgátory, dispergační látky, zvlhčovačla, smáčedla, stabilizátory, odpěňovače, konzervační přípravky, viskozitní činidla, pojiva, lepidla, hnojiva.
6. Přípravek podle nároku 5, **vyznačený tím**, že koncentrace nanokompozitního materiálu na
- 35 bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého podle nároku 4 v přípravku je alespoň 0,01 µg/ml.
7. Použití nanokompozitního materiálu na bázi redukovaného grafen oxidu, dusičnanu stříbrného a octanu měďnatého podle nároku 4 nebo přípravku podle nároku 5 nebo 6
- 40 v zemědělství, zejména pro ošetření rostlin proti *Xanthomonas euvesicatoria*.

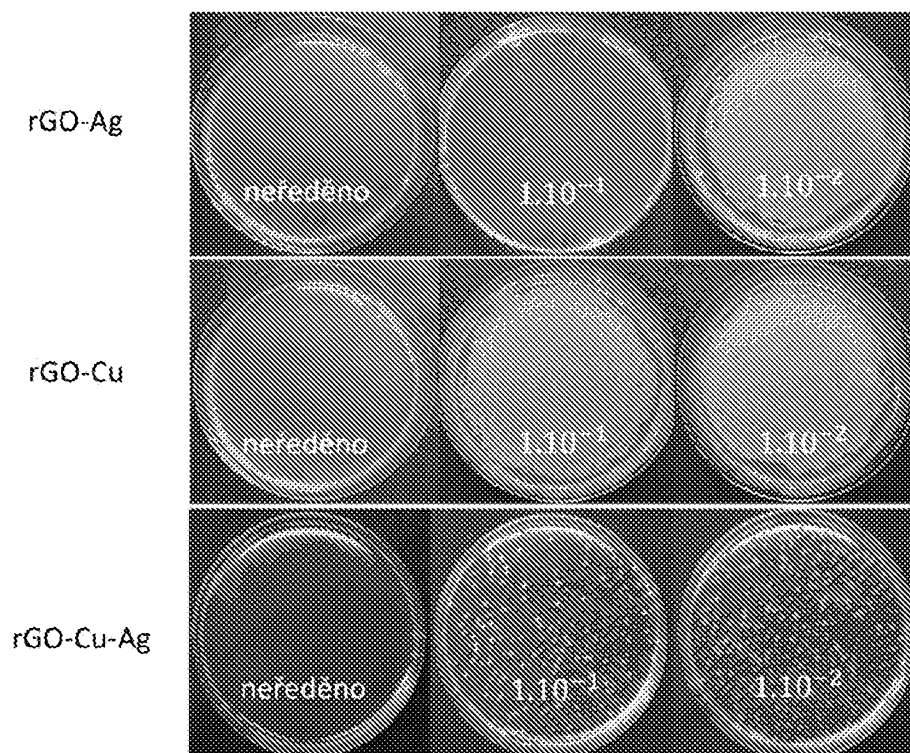
6 výkresů

chybí

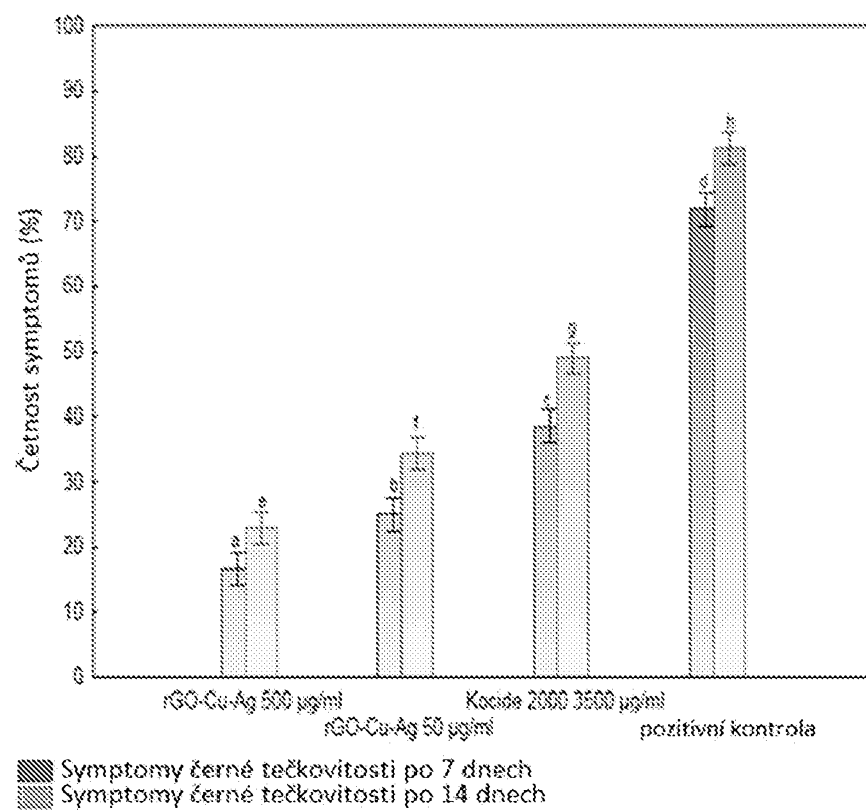
Obr. 1



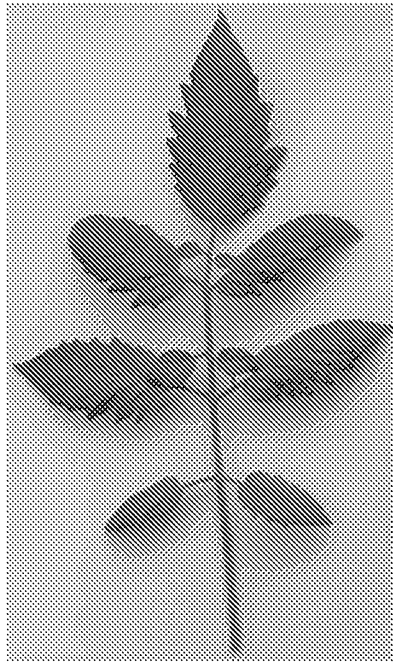
Obr. 2



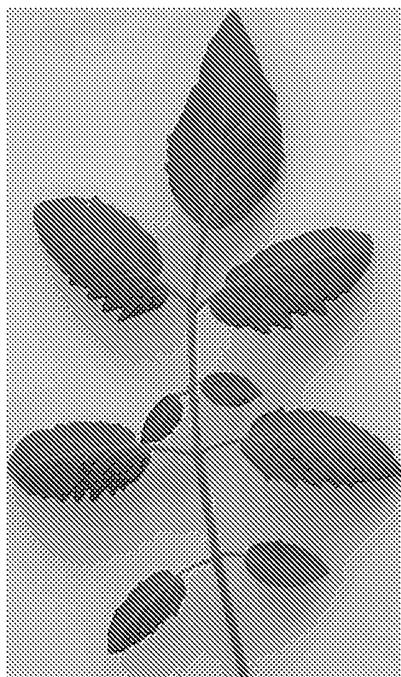
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



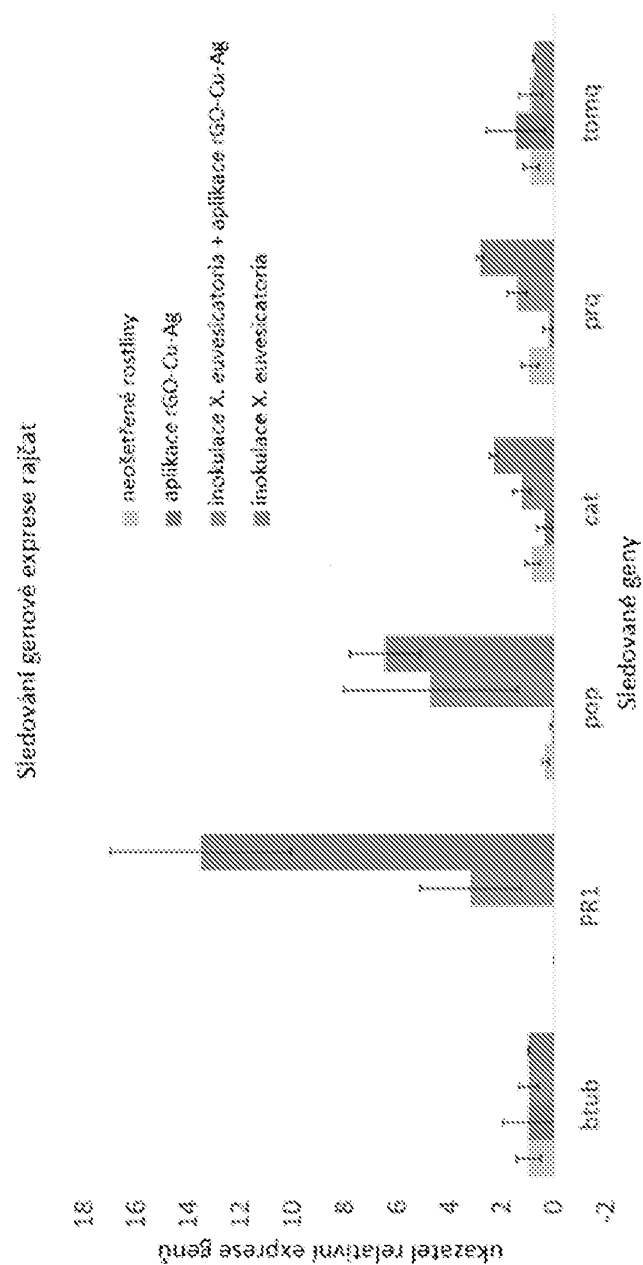
Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9