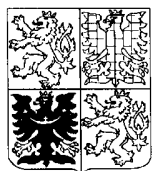


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **08.05.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.05.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/853753**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/09471**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/50422**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3757

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

C 07 K 7/06

A 01 N 63/02

C 12 N 1/20

/(C 12 N 1/20, C 12 R 1:125)

(71) Přihlašovatel:

AGRAQUEST, INC., Davis, CA, US;

(72) Původce:

Heins Sherry Darlene, Davis, CA, US;

Manker Denise Carol, Davis, CA, US;

Jimenez Desmond Rito, Woodland, CA, US;

McCoy Randy Jay, Davis, CA, US;

Orjala Jimmy Ensio, Davis, CA, US;

Marrone Pamela Gail, Davis, CA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

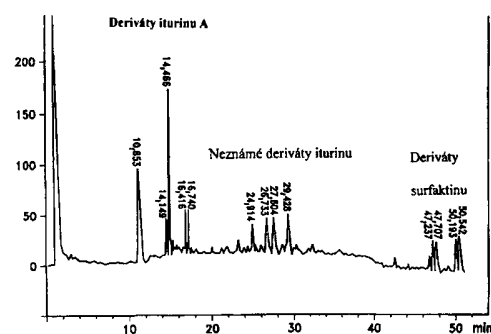
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nový kmen *Bacillus* pro kontrolu onemocnění
rostlin a mandelinky *Diabrotica*
*undecimpunctata***

(57) Anotace:

Nový kmen *Bacillus subtilis*, který produkuje antibiotika a metabolity mající insekticidní, antifugální a antibakteriální aktivitu. Supernatant tohoto nového kmene obsahuje účinný insekticidní, antifugální a antibakteriální agens. Metabolit aktivní proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*, který má nízkou molekulovou hmotnost (< 1000 daltonů), je produkován do supernatantu a je extrahovatelný organickými rozpouštědly. Způsoby ochrany nebo léčby rostlin v případě houbových a bakteriálních infekcí a napadení mandelinkou *Diabrotica undecimpunctata* zahrnující krok v němž je rostlině aplikováno účinné množství nového kmene *Bacillus subtilis* produkujícího antibiotikum/metabolit nebo účinné množství antibiotika/metabolitu produkovaných novým kmenem *Bacillus subtilis* nebo kombinace obou možností, a výhodně tento krok dále zahrnuje použití jiného bakteriálního kmene produkujícího antibiotikum a/nebo chemického pesticidu. Způsoby zabránění vzniku houbových nebo bakteriálních infekcí nebo jejich léčby aplikací kompletních kultivačních tekutin bakteriálních kultur nebo supernatantů získaných z

kultur samotného nového kmene *Bacillus subtilis* nebo v jeho kombinaci s chemickými pesticidy a/nebo jinými agens biologické kontroly. Nové antifugální a natibakteriální sloučeniny, které se označují jako agrastatiny, a novou kombinaci obsahující iturin typu A, plipastatin, surfaktin a agrastatin. Způsoby léčby a ochrany rostlin v případě houbových a bakteriálních infekcí a v případě napadení mandelinkou *Diabrotica undecimpunctata*, zahrnující podání nových agrastatinů a nové kombinace zahrnující iturin typu A, plipastatin, surfaktin a agrastatin.



Nový kmen *Bacillus* pro kontrolu onemocnění rostlin a mandelinky *Diabrotica undecimpunctata*

Oblast techniky

Tato přihláška vynálezu se týká oblasti biopesticidů. Specifičtěji se tato přihláška týká zjištění, že nový kmen *Bacillus subtilis* AQ713 inhibuje řadu houbových a bakteriálních onemocnění rostlin a rovněž vykazuje aktivitu proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*. Přihláška vynálezu se rovněž týká fungicidních, baktericidních a insekticidních prostředků obsahujících tento nový kmen *Bacillus subtilis* spolu s antibiotiky a metabolity produkoványmi tímto kmenem, které jsou použity samotné nebo v kombinaci s jinými chemickými a biologickými pesticidy.

Křížová citace k aplikacím majícím vztah k vynálezu

Tato přihláška je pokračováním Série č. 08/853753, která byla zaregistrována 9. května 1997.

Dosavadní stav techniky

Mnoho let je známo, že různé mikroorganismy vykazují biologickou aktivitu, takže jsou užitečné při potlačování onemocnění rostlin. Ačkoli byl učiněn pokrok v oblasti identifikace a vývoje biologických pesticidů pro kontrolu různých onemocnění rostlin, důležitých z hlediska agronomického i zahradnického, představuje většina dosud používaných pesticidů syntetické látky. Mnoho z těchto chemických fungicidů je klasifikováno EPA jako karcinogeny, které jsou toxické pro organismy v přírodě i jiné druhy. Kromě toho mohou patogenní mikroorganismy vyvinout odolnost k chemickým pesticidům



(viz např. Schwinn et al., str. 244, *Advances in Plant Pathology: Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato (Academic Press, San Diego 1991).

Každoročně jsou použity chemické pesticidy v ceně 250 až 300 milionů dolarů k zabránění škod působených mandelinkou *Diabrotica undecimpunctata*. Řada z těchto chemických pesticidů jsou látky, které jsou toxické pro člověka, organismy v přírodě i ostatní druhy. Některé z těchto látek byly objeveny i v povrchových vodách. Vývoj nových chemických insekticidů vyžaduje náklady ve výši 100 milionů dolarů.

Biologická kontrola představuje přitažlivou alternativu k syntetickým chemickým fungicidům. Biopesticidy (živé organismy a látky těmito organismy přirozeně produkované) mohou být bezpečnější, lépe biodegradovatelné a méně nákladné z hlediska vývoje a výroby.

Selekční programy identifikovaly některé kmeny *Bacillus* spp. (*Bacillus* spp. zahrnuje *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*), které vykazují antifungální aktivitu. (Viz např. Stabb et al. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4404-4412). Ukázalo se, že tyto kmeny produkují zwittermicin-A a/nebo kanosamin (Milner et al. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3061-3066), dvě antibiotika, která jsou účinná proti půdnímu onemocnění projevujícímu se vadnutím rostlin z přebytku vláhy, která je vyvolávána *Phytophthora medicaginis*, *P. nicotianae*, *P. aphanidermatum* nebo *Sclerotinia minor* (viz výše Stabb et al.). Zwittermicin-A je ve vodě rozpustná lineární aminopolyolová molekula stálá v kyselém prostředí (viz, He et al. (1994) *Tetra. Lett.* 35 (16) 2499-2502).

US Patent č. 5049379 udělený Handelsmanovi a spolupracovníkům popisuje jak zwittermicin-A vyvolává vadnutí rostlin z přebytku vláhy u vojtěšky a sóji. Jestliže bylo semeno pokryto vrstvou *B. cereus* ATCC 53522, byla patogenní aktivita houby způsobující hnilobu kořenů potlačena. Podobně aplikace prostředků založených na sporách určitých kmenů *B. cereus* na semena sóji nebo na půdu obklopující tato semena se ukázala zlepšovat úrodu sójových bobů na poli. (Viz Osburne et al. (1995) *Am. Phytopathol. Soc.* 79 (6): 551-



556). Metody aplikace biopesticidů jsou v oboru dobře známy a například zahrnují zvlhčovací prášky, přípravky v tekuté formě, účinná agens v podobě mikrokapsulí, a tekuté nebo pevné prostředky antibiotických frakcí vhodných kultur. (Viz např. US Patent č. 5061495 udělený Rossallově nebo US Patent č. 5049379 udělený Handelsmanovi).

Smith et al. (1993) Plant Disease 77 (2) 139-142 ukázal, že aktivita vzduchem přenášené houby *Pythium aphanidermatum*, která vyvolává vatovitou mokrou hnilobu okurek, může být potlačena použitím kmene *B. cereus* UW85, který produkuje zwittermicin. Leifert et al. (1995) J. Appl. Bacteriol. 78: 97-108 popsali produkci antibiotik působících proti *Botrytis* a *Alternaria* dvěma kmeny bacillů, *B. subtilis* CL27 a *B. pumilis* CL45. Celé médium a bezbuněčné filtráty byly aktivní proti houbám *Botrytis* a *Alternaria* v testech *in vitro* i proti *Botrytis* v malých *in vivo* rostlinných testech používajících *Astilbe*. Leifert et al. (1997) US Patent č. 5597565 popisuje *B. subtilis*, *B. pumilis* a *B. polymyxa*, které jsou zvláště účinné při potlačení hub vyvolávajících posklizňové onemocnění. Tito autoři rovněž popsali přítomnost antibiotik přítomných v bezbuněčném filtrátu kultury a jejich aktivitu při různých hodnotách pH, avšak tyto sloučeniny neidentifikovali.

Rossall (1994) US Patent č. 5344647 popisuje kmeny *B. subtilis* s širokou antifungální aktivitou. Sholberg et al. (1995) Can. J. Microbiol. 41: 247-252, Swinburne et al. (1975) Trans. Brit. Mycol. Soc. 65: 211-217, Singh and Deverall (1984) Trans. Br. Mycol Soc. 83: 487-490 a Ferreira et al. (1991) Phytopathology 81: 283-287. Baker et al. (1983) Phytopathology 73: 1148-1152 popisují použití *Bacillus* spp. a *Bacillus subtilis* jako agens pro biokontrolu houbových rostlinných patogenů. Baker et al. (1983) Phytopathology 73: 1148-1152 rovněž popisuje kmen *B. subtilis* s antifungálními účinky a jeho využití proti rostlinným patogenům. Pusey et al. (1988) Plant Dis. 72: 622-626, Pusey and Robins (US Patent č. 5047239), a McKeen et al. (1986) Phytopathology 76: 136-139 popisují inhibici posklizňové hniloby plodů pomocí *B. subtilis*. McKeen et al. (viz výše) ukázal, že antibiotika

podobná iturinovým cyklickým polypeptidům o nízké molekulové hmotnosti přispívají k této fungicidní aktivitě *B. subtilis*.

Liu et al. (1995) US Patent č. 5403583 popisují *B. megaterium* ATCC 55000 a způsob kontroly houbového rostlinného patogenního organismu *Rhizoctonia solani*. Islam and Nandi (1985) Journal of Plant Diseases and Protection 92 (3): 241-246 popisují *B. megaterium* s antagonismem proti *Drechslera oryzae* způsobujícímu hnědou skvrnitost rýže. Stejní autoři, Islam and Nandi (1985) Journal of Plant Diseases and Protection 92 (3) 233-240 rovněž popisují *in vitro* antagonismus *B. megaterium* proti *Drechslera oryzae*, *Alternaria alternata* a *Fusarium roseum*. Diskutují tři složky ve filtrátu kultury. Nejaktivnější antibiotikum bylo vysoce rozpustné ve vodě a v methanolu s UV maximem při vlnové délce 255 nm a vedlejším maximem při 260 nm, a ukázalo se být lipopeptidem polyoxinového typu. Cook (1987) Proceedings Beltwide Cotton Production - Mechanization Research Conference, Cotton Council, Memphis, str. 43-45) popisuje použití suspence *B. megaterium* ke snížení počtu bavlníkových rostlin zahubených *Phymatotrichum omnivorum*, které vyvolává hnilobu kořenů bavlníku.

Produkce antibiotik u *B. megaterium* byla zaznamenána Berdym (CRC Handbook of Antibiotic Compounds, Vols. I-XIV, (CRC Press, Inc. Boca Raton, FL 1980-87), který popsal produkci peptidových antibiotik toxických pro nižší savce, jako jsou ansamitocin-PDM-O, bacimethrin, megacin, pentapeptid a homopeptidy.

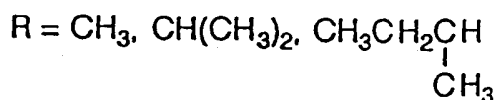
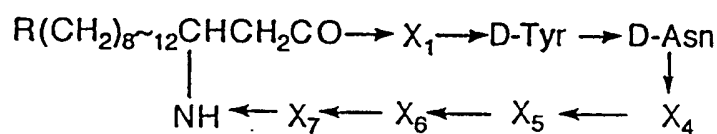
O bakteriích rodu *Bacillus* se ví, že produkují sekundární metabolity s antifungálními a antibakteriálními vlastnostmi (Korzybski et al. (1978)). Vědečtí pracovníci z University of Wisconsin a Cornell University identifikovali novou fungicidní sloučeninu, zwittermicin A, která je produkována *Bacillus* sp. (He et al. (1994) Tetra. Lett. 35 (16):2499-2502). Další metabolit produkový stejným kmenem, mající rovněž fungicidní vlastnosti, byl nedávno

identifikován jako známý aminocukr kanosamin (Milner et al. (1996) Appl. Environ. Microb. 62: 3061-3065).

Další skupina dříve popsaných metabolitů u rodu *Bacillus* jsou cyklické lipopetidy třídy iturinů, z nichž některé jsou účinná fungicidní agens. Tyto látky jsou složeny z cyklického oktapeptidu se sedmi alfa-aminokyselinami a jednou beta-aminokyselinou s alifatickým postranním řetězcem. Existuje několik skupin iturinů, které se liší v pořadí a složení aminokyselinové sekvence. Jsou uvedeny níže v tabulce 1. Obecně je produkována řada příbuzných molekul, rozlišených délkou a větvením alifatického aminokyselinového zbytku. Jestliže byly tyto látky testovány proti *Saccharomyces cerevisiae*, nejúčinnější z nich se ukázal být mykosubtilin ($LC_{50} = 10$ mikrogramů/mL), následovaný iturinem A a bacillomycinem L (oba $LC_{50} = 30$ mikrogramů/mL) (Beeson et al. (1979) J. Antibiotics 32 (8): 828-833). Bylo zjištěno, že mechanismus působení těchto cyklických lipopeptidů je na úrovni interakce s membránami houbových organismů, a že uvedené látky vytvářejí transmembránové kanály, kterými se uvolňují a unikají životně důležité ionty (Latoud et al. (1986) Biochem. Biophys. Acta 856: 526-535). Iturin C není aktivní proti houbovým organismům včetně *Penicillium chrysogenum* (Peypoux et al. (1978) Tetrahedron 34: 1147-1152).

Tabulka 1
Struktura antibiotik skupiny iturinů

Antibiotikum	L-Asz(X1)	X4	X5	X6	X7
Iturin A	L-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Ser
Iturin C	L-Asp	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Ser
Bacillomycin D	L-Asn	L-Pro	L-Glu	D-Ser	L-Thr
Bacillomycin L	L-Asp	L-Ser	L-Gln	D-Ser	L-Thr
Bacillomycin F	L-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Asn	L-Thr
Mykosubtilin	L-Asn	L-Gln	L-Pro	D-Ser	L-Asn



Výzkumná skupina na USDA zkoumala vztah struktury a aktivity u iturinů tím, že syntetizovali řadu analogů, které se lišily v délce aminokyselinového řetězce. Bylo zjištěno, že aktivita iturinů vzrůstala s délkou postranního řetězce mastných kyselin a s koncovým větvením v pořadí iso>normální>anteiso (Bland et al. (1995) Proc. Plant Growth Regulation Soc. Am. 22nd: 105-107). Autoři na základě své práce s řadou kmenů *Bacillus* produkujících iturin rovněž uvádějí, že "množství iturinů získaných přirozenou produkcí není dostatečné z komerčního hlediska".

Další skupina cyklických lipopeptidů izolovaných z *B. cereus* jsou plipastatiny. Tyto sloučeniny jsou skupinou acylovaných dekaeptidů, jejichž struktura je na obr. 1 (Nishikiori et al. (1986) J. Antibiotics 39 (6): 755-761). Tyto sloučeniny byly původně izolovány jako inhibitory prasečí pankreatické fosfolipasy A₂ (Umezawa et al. (1986) J. Antibiotics 39 (6): 737-744), ale později se zjistilo, že inhibují některé patogenní houby způsobující onemocnění rostlin, například *Botrytis*, *Pyricularia* a *Alternaria* (Yamada et al. (1990) Nippon Noyaku Gakkaishi 15 (1): 95-96). Yamada rovněž popsal synergistický efekt pozorovaný mezi iturinem A a plipastatiny, z nichž oba jsou produkovány stejným kmenem *B. subtilis*.

Byly provedeny pokusy s cílem zlepšit výtěžky produkce iturinů během fermentace jak v tekutém mediu (Phae and Shoda (1991) J. Ferment. Bioeng. 71: 118-121); Ohno et al. (1993) J. Ferment. Bioeng. 75: 463-465) tak i na pevném substrátu (Ohno et al. (1992) Biotech. Lett. 14 (9): 817-822; Ohno et al. (1995) J. Ferment. Bioeng. 5: 517-519). Byla

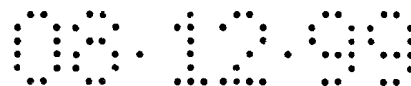


popsána synergie mezi blízkce příbuznými surfaktiny, které jsou samy o sobě inaktivní, a ituriny, které byly produkovány stejným kmenem *B. subtilis* (Hiraoka et al. (1992) J. Gen. Appl. Microbiol. 38: 635-640). Byla publikována nukleotidová sekvence genu podílejícího se na koregulaci biosyntézy iturinu A a surfaktinu (Huang et al. (1993) J. Ferment. Bioeng. 76 (6):445-450). Polní pokusy s kmeny produkujícími iturin se soustředily na aplikaci v půdě s cílem potlačit houbu *Rhizoctonia* (Asaka and Shoda (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62: 4081-4085) a aplikace iturinů v polních pokusech na listy rostlin nebyla dosud popsána.

Další sloučeninou typu cyklického lipopeptidu, která je produkována *B. subtilis* je surfaktin, který vykazuje výjimečnou surfaktantní aktivitu (Kaninuma et al. (1969) Agric. Biol. Chem. 33: 973-976). Surfaktin obsahuje beta-hydroxymastnou kyselinu mající v molekule 14 nebo 15 uhlíkových atomů, která je laktonovým kruhem vázána k heptapeptidové části molekuly mající sekvenci LLDLLDL (Arima et al. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 31: 488-494). Sandrin a spolupracovníci ((1990) Biotechnol. Appl. Biochem. 12: 370-375) našli kmeny *B. subtilis*, které produkovaly surfaktin, iturin A, bacillomyciny F a L a mykosubtilin.

Nový organismus AQ713, který byl objeven autory tohoto vynálezu, byl původně považován za kmen *B. megaterium*, ale nyní byl identifikován jako kmen *B. subtilis*. Tento kmen produkuje ituriny A, plipastatiny a surfaktiny. Produkce této kombinace lipopeptidů jedním mikroorganismem dosud nebyla popsána. Kromě toho autoři vynálezu zjistili, že kmen AQ713 rovněž produkuje nově popsanou skupinu látek nazvaných "agrastatiny". Kombinace všech tří výše zmíněných látek s nově popsanými agrastatiny je rovněž nová.

Jedním z běžně používaných biopesticidních prostředků je grampozitivní bakterie *Bacillus thuringiensis*. Kmeny *B. thuringiensis*, s mající pesticidní vlastnosti, produkují během sporulace krystalické proteiny, které jsou specificky toxické pro určité řády a druhy hmyzu a nematodů (viz např. US Patenty č. 4999192 a 5208017). Endotoxiny proteinové povahy, které



jsou produkovány *B. thuringiensis*, rovněž působí jako insekticidní agens proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata* a jiným broukům (např. US Patent č. 5187091; Johnson, T.J. et al. (1993), J. Economic Entomology 86: 330-333). Endotoxiny *B. thuringiensis* jsou účinné v podobě purifikovaných krystalů, promytých buněčných pelet a exprimovaných proteinů. Warren et al. (WO 96/10083) popisuje neendotoxinové proteiny, které jsou produkovány během vegetativního stadia *B. cereus* a *B. thuringiensis*. Tyto vegetativní proteiny nazvané Vip1 a Vip2 vykazují vysokou účinnost proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata* (severnímu i západnímu) (Estruch et al. (1997) Nature Biotechnology 15: 137-141 a Mullins et al. (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63 (v tisku).

Jeden z termostabilních metabolitů *B. thuringiensis*, který byl nazván beta-exotoxin, má rovněž pesticidní vlastnosti. Burgieron a Biache ((1979) Entomophaga 11: 279-284) popisují beta-exotoxin, který je aktivní proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Kromě toho vykazují známé beta-exotoxiny *B. thuringiensis* nespecifickou pesticidní aktivitu a zabíjejí nejen nematody, ale rovněž mouchy, vojnice, roztoče a mandelinku *Diabrotica undecimpunctata*. Sigma exotoxin má strukturu podobnou beta-exotoxinu a je aktivní vůči mandelince bramborové (Argauer et al. (1991) J. Entomol. Sci. 26: 206-213). Alfa-exotoxin je toxický pro larvy *Musca domestica* (Cluthy (1980) FEMS Microbiol. Lett. 8: 1.7). Gama-exotoxiny jsou různé proteolytické enzymy, chitinasy a proteasy. Toxický účinek gama-exotoxinů se projeví pouze v kombinaci s beta-exotoxinem nebo delta-endotoxinem (Forsberg et al. (1976) "Bacillus thuringiensis: Its Effects in Environmental Quality" National Research Council of Canada). Stonard a spolupracovníci ((1994) ACS Symposium Series 551: 25) popsali ve vodě rozpustné sekundární metabolity aktivní proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata* v supernatantu kultury kmene *B. cereus*.

Dosud nebyly popsány kmeny bacilů, které by měly jak fungicidní aktivitu, tak i byly aktivní proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*. Nejsou známy žádné metabolity



produkované *B. subtilis*, které by měly molekulovou hmotnost menší než 10000 a byly by extrahovatelné nepolárním rozpouštědlem.

Podstata vynálezu

Je popisován nový kmen *B. subtilis* produkující antibiotika a metabolity, který byl původně identifikován jako *B. megaterium*, který vykazuje širokou fungicidní a baktericidní aktivitu, a rovněž vykazuje aktivitu proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*. Rovněž je popsán nový metabolit nového kmene *B. subtilis* vykazující aktivitu proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*. Je rovněž popsán způsob jak léčit rostliny v případě houbových a bakteriálních infekcí a chránit je proti těmto infekcím, který zahrnuje krok aplikující účinné množství *B. subtilis* produkujícího antibiotikum. *B. subtilis* produkující antibiotikum lze používat v podobě kompletní bakteriální suspenze kultury v mediu nebo jako supernatant této kultury kmene *Bacillus* produkujícího antibiotikum, který obsahuje toto antibiotikum. Rovněž je popsán způsob ochrany kořenů rostlin proti napadení mandelinkou *Diabrotica undecimpunctata* nebo léčby v případě tohoto zamoření, který zahrnuje krok, kdy je aplikováno účinné množství kmene *Bacillus subtilis* produkujícího nový metabolit. Kmen *B. subtilis* produkující nový metabolit lze aplikovat jako kompletní suspenzi bakteriální kultury v mediu nebo jako supernatant této kultury obsahující metabolit nebo jako purifikovaný metabolit připravený z kultury mikroorganismu v tekutém mediu. Rovněž jsou popsány nové sloučeniny, agrastatiny, které jsou produkovány novým kmenem AQ713, a nová kombinace sloučenin zahrnující iturin A, plipastatin, surfaktin a agrastatin.

Krátký popis obrázků

Obr. 1 ukazuje strukturu plipastatinových antibiotik.

Obr. 2 ukazuje HPLC chromatogram metabolitů kmene AQ713.

Způsoby provedení vynálezu

Tato přihláška vynálezu popisuje nový kmen *B. subtilis* AQ713, který byl původně identifikován jako *B. megaterium*, nebo jeho mutanty s širokou antifungální a antibakteriální aktivitou, a novou kombinací antifungální aktivity a aktivity proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*. Tento nový kmen byl nazván AQ713 a byl uložen v NRRL 7. března 1997 podle ustanovení Budapešťské smlouvy o mezinárodním uznávání sbírek mikroorganismů pro účely patentového postupu jako přírůstek č. B21661 (Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure under Accession No. B21661). Tato přihláška vynálezu rovněž zahrnuje způsoby zabraňující vzniku fungálních a bakteriálních onemocnění rostlin a jejich léčby s použitím těchto bakteriálních kmenů nebo supernatantů jejich kultur obsahujících uvedená antibiotika nebo čistých antibiotik získaných z těchto bakteriálních kmenů. Přihláška vynálezu rovněž zahrnuje způsoby aplikace na úrovni kořenů rostlin nebo půdy s cílem potlačit larvy mandelinky *Diabrotica undecimpunctata* pomocí bakteriální suspenze kmene AQ713 nebo pomocí supernatantu kultury kmene AQ713 obsahujícího metabolity nebo pomocí purifikovaných metabolitů kmene AQ713. Přihláška vynálezu rovněž zahrnuje metabolit, který je extrahovatelný organickým rozpouštědlem, a který vykazuje aktivitu proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata* a má molekulovou hmotnost nižší než 10000 daltonů. Přihláška vynálezu dále zahrnuje nové sloučeniny, agrastatiny, které jsou produkovány novým mikroorganismem. Rovněž je zahrnuta nová kombinace představovaná iturinem A typu, plipastatinem, surfaktinem a agrastatinem.

Definice

"Biologická kontrola" používaná v přihlášce patentu je definována jako kontrola patogenu nebo hmyzu pomocí druhého organismu. Známé mechanismy biologické kontroly zahrnují enterobakterie, které působí proti hnilobě kořenů tím, že "vytěsní" houby s nimiž soupeří o prostor na povrchu kořene. Bakteriální toxiny jako jsou antibiotika jsou používány ke kontrole patogenů. Toxin lze izolovat a přímo aplikovat na rostlinu nebo může být aplikován daný bakteriální druh, aby produkoval toxin *in situ*.

Termín "houba" nebo "houby" zahrnuje velmi různé jaderné sporulující organismy, které neobsahují chlorofyl. Příklady hub zahrnují kvasinky, plísně, sněti, rzi a kloboukaté houby.

Termín "bakterie" zahrnuje jakýkoli prokaryontní organismus, který nemá buněčné jádro.

"Fungicidní" znamená schopnost látky zvyšovat mortalitu hub nebo inhibovat jejich růst.

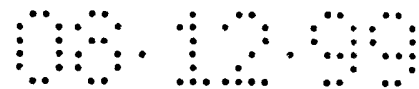
"Antibiotikum" představuje jakoukoli látku, která je schopna zabíjet nebo inhibovat mikroorganismus. Antibiotika mohou být produkována nějakým mikroorganismem nebo připravena pomocí syntetického nebo polosyntetického procesu. Termín proto zahrnuje látku, která inhibuje nebo zabíjí houby, například zwittermicin A nebo kanosamin.

"Antifungální" zahrnuje jakoukoli látku, která je schopna zabíjet nebo inhibovat růst hub.

Termín "kultivace" znamená propagaci organismů v nebo na mediích různého typu.

"Kompletní kultivační tekutina" znamená tekutou kulturu obsahující jak buňky tak i medium.

"Supernatant" znamená tekutinu kultury, která zůstane po oddělení buněk rostoucích v této tekutině, pomocí centrifugace, filtrace, sedimentace nebo jiného způsobu, který je v oboru dobře znám.



"Účinné množství" je množství dostatečné pro navození požadovaného či pozitivního výsledku. Účinné množství lze podat v jedné nebo ve více dávkách. V termínech léčba (ošetření) a ochrana představuje "účinné množství" takové množství, které je dostatečné pro zlepšení, stabilizaci, zastavení, zpomalení nebo zpoždění progresu stavu houbového nebo bakteriálního onemocnění.

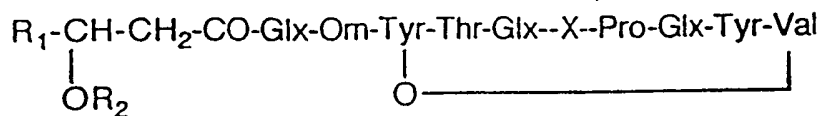
V této přihlášce termín "hmyz" zahrnuje všechny organismy třídy "Insecta-Hmyz". "Nedospělý" hmyz znamená jakoukoli formu organismu před dosažením dospělého stadia, například vajíčka, larvy a nymfy. "Insekticidní" znamená schopnost látky zvyšovat mortalitu nebo inhibovat růst hmyzu. "Nematicidní" znamená schopnost látky zvyšovat mortalitu nebo inhibovat růst nematodů. "Pesticidní" znamená schopnost látky zvyšovat mortalitu nebo inhibovat růst hmyzu, nematodů a roztočů.

"Pozitivní kontrola" znamená sloučeninu, o níž se ví, že má pesticidní aktivitu. "Pozitivní kontrola" zahrnuje komerčně dostupné chemické pesticidy, avšak není na ně omezena. Termín "negativní kontrola" znamená sloučeninu, o níž je známo, že nemá žádnou pesticidní aktivitu. Příklady negativní kontroly jsou voda a ethylacetát.

Termín "solvent" zahrnuje jakoukoli kapalinu, která udrží další látku v roztoku. "Solventem extrahovatelný" znamená jakoukoli sloučeninu, která se rozpouští v solventu, a kterou potom lze ze solventu izolovat. Příklady solventů zahrnují organické solventy jako ethylacetát, avšak nejsou jimi limitovány.

Termín "metabolit" představuje jakoukoli sloučeninu, látku nebo vedlejší produkt fermentace mikroorganismu, které mají pesticidní aktivitu. Antibiotikum, tak jak je definováno výše, je metabolitem, který vykazuje specifickou aktivitu proti mikroorganismu.

Termín "agrostatiny" se týká skupiny nových látek, které mají následující strukturu:



kde R_1 je větvený nebo přímý alifatický postranní řetězec, C8-C20; X je buď Ala nebo Val; R_2 je acetát nebo derivát esteru; a Glx je Gln nebo Glu. Tyto sloučeniny mají antibakteriální a antifungální aktivitu i aktivitu proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*.

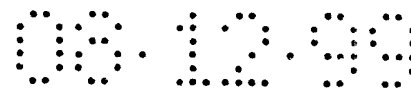
Popisujeme nový metabolit a kmen *B. subtilis* produkující antibiotika, který byl původně identifikován jako *B. megaterium*, má širokou antifungální a antibakteriální aktivitu, a který rovněž zabíjí nebo brání v růstu larvám mandelinky *Diabrotica undecimpunctata*.

V dalším aspektu tato přihláška vynálezu popisuje způsob ochrany rostlin před houbovými a bakteriálními infekcemi a jejich léčby pomocí aplikace účinného množství supernatantu získaného z kultury *B. subtilis* AQ713 podle tohoto vynálezu. Supernatant lze získat způsobem dobře známým v oboru jako například centrifugací, filtrací, sedimentací a podobně.

V dalším aspektu přihláška vynálezu zahrnuje způsob ochrany rostlin před houbovými a bakteriálními infekcemi a jejich léčby pomocí aplikace účinného množství kompletní kultivační tekutiny kultury nového kmene *B. subtilis*.

V dalším aspektu přihláška vynálezu zahrnuje způsob ochrany rostlin před houbovými a bakteriálními infekcemi a jejich léčby pomocí aplikace účinného množství antibiotika produkovaného novým kmenem *B. subtilis*.

V dalším aspektu tato přihláška vynálezu popisuje způsob ochrany rostlinných kořenů před napadením mandelinkou *Diabrotica undecimpunctata* a jejich léčby pomocí aplikace účinného množství supernatantu získaného z kultury *B. subtilis* AQ713 podle tohoto vynálezu. Supernatant lze získat způsobem dobře známým v oboru jako centrifugací, filtrací, sedimentací a podobně.



V dalším aspektu přihláška vynálezu zahrnuje způsob ochrany rostlin před napadením mandelinkou *Diabrotica undecimpunctata* a jejich léčby pomocí aplikace účinného množství kompletní kultivační tekutiny kultury nového kmene *B. subtilis*.

V dalším aspektu se přihláška vynálezu týká způsobu ochrany rostlinných kořenů před napadením mandelinkou *Diabrotica undecimpunctata* a jejich léčby pomocí aplikace účinného množství metabolitu produkovaného novým kmenem *B. subtilis*.

Aby bylo dosaženo dobré disperze a adheze prostředků podle tohoto vynálezu, může být výhodné použít v jednom přípravku kompletní kultivační tekutinu, supernatant a/nebo metabolit/antibiotikum spolu se složkami, které napomáhají disperzi a adhezi. Vhodné složení je odborníkům v oboru známo.

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou mít podobu smáčivých prášků, granulí a podobně, nebo mohou mít podobu mikrokapsulí, kde je přípravek enkapsulován ve vhodném mediu, apod. Příklady jiných typů přípravků zahrnují rozpustné prášky, smáčivé granule, tekuté formy vodného nebo „suchého“ typu, smáčivé dispergovatelné granule, emulsifikovatelné koncentráty a vodné suspenze. Jiné vhodné typy přípravků jsou známy odborníkům v oboru.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je popisována nová skupina sloučenin nazvaných "agrastatiny". Tyto látky vykazují antibakteriální a antifungální aktivitu, kromě aktivity proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je popsána nová kombinace zahrnující iturin typu A, plipastatin, surfaktin a agrastatin.

V dalším aspektu tohoto vynálezu jsou popisovány způsoby ochrany rostlin před houbovými a bakteriálními onemocněními a jejich léčby pomocí aplikace účinného množství nové kombinace látek zahrnujících iturin typu A, plipastatin, surfaktin a agrastatin.

Všechny patenty a publikace citované v této patentové přihlášce jsou uvedeny jako reference v úplné podobě. Následující příklady ilustrují tento vynález. Vynález však těmito příklady není nijak omezen.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Charakterizace kmene AQ713

Izolát byl identifikován na základě použití metody Biolog (Biolog microplate panel, Biolog, Inc., Hayward, CA) tak jak je popisována Bochnerem (1989) Nature 339: 157-158. Mikrodeska Biolog se skládá z jamek v panelu, které obsahují 95 různých uhlíkových substrátů, které jsou nejprve nanесeny a poté vysušeny, a jsou voleny s ohledem na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Izolát byl kultivován v tekutém mediu při 28 °C, a po 24 hodinách byla promytá buněčná suspenze (0,85 % W/V chlorid sodný) inokulována do každého otvoru v panelu GP Microplate (Biolog, Inc.). Po inkubaci po dobu 24 hodin při teplotě 28 °C byly vyhodnoceny reakce utilizace uhlíku. Profily utilizace substrátů byly porovnány s databází Biolog Gram-Positive Data Base (verze 3,50) a vztaženy k nejbližším podobným druhům. Výsledky metody Biolog poskytly index podobnosti (similarity index) o hodnotě 0,883 pro *B. megaterium*.

Mnohem důkladnější charakterizace AQ713 byla provedena sbírkou mikroorganismů American Type Culture Collection v Rockville v Marylandu.

Izolát dodán jako: neznámý; kmen AQ713.

Izolát identifikován jako: s použitím dostupných fyziologických a biochemických dat se tento kmen nejvíce podobá *Bacillus subtilis*.

Buněčná morfologie: pohyblivé buňky jsou nalézány jako jednotlivé, s jednou endosporou umístěnou v centrální nebo subterminální poloze. Buňky se uniformně barví jako Gram-pozitivní.

Morfologie kolonie: kolonie jsou matné a nepravidelné s konvexním vyvýšením, povrch je hrubý, nebarevný a má nepravidelně zoubkovaný okraj.

Charakterizace dat kmene AQ713:

Tyčinky	+	Hydrolyza kaseinu	+
Rovné tyčinky	+	Ztekucení želatiny	+
Zahnuté tyčinky	-	Hydrolyza hippurátu	-
Jednotlivé buňky	+	Lecitinasová degradace	-
Řetízky buněk	-	Hydrolyza škrobu	+
Konce zašpičatělé	-	Hydrolyza Tweenu 80	+
Konce zakulacené	+	Rozklad tyrosinu	-
Konce hranaté	-	Růst v 2% NaCl	+
Vytvořená endospora	+	Růst v 5 % NaCl	+
"Nabobtnalé" sporangium	-	Růst v 7 % NaCl	+
Jedna spora na buňku	+	Růst v 10% NaCl	+
Spora kulatá	-	Růst v 0,2% azidu	V
Spora válcovitá	+	Růst při pH 4,5	+
Spora oválná	+	Růst při pH 6,0	+
Spora centrální	+	Kyselina z arabinosy	-
Spora terminální	-	Plyn z arabinosy	-
Spora subterminální	+	Kyselina z celobiosy	slabá
Gramovo barvení	+	Kyselina zpožděná >14 dní	slabá
Gram pozitivní	+	Plyn z celobiosy	-
Gram negativní	-	Kyselina z fruktosy	+
Gram variabilní	-	Kyselina zpožděná >14 dní	-
Vakuoly přítomny	-	Plyn z fruktosy	+
Kolonie průhledná	-	Kyselina z glukosy	+
Kolonie transparentní	-	Kyselina zpožděná >14 dní	-
Kolonie matná	+	Plyn z glukosy	-
Kolonie celistvá	-	Kyselina z laktosy	-
Kolonie zoubkovaná	+	Plyn z laktosy	-
Kolonie laločnatá	-	Kyselina z manitolu	-
Kolonie kruhová	-	Plyn z manitolu	-
Kolonie nepravidelná	+	Kyselina z mannosy	-

Tabulka - pokračování

Kolonie rhizoidní	-	Plyn z mannosy	-
Kolonie konvexní nízká	+	Kyselina ze sacharosy	slabá
Kolonie konvexní vysoká	-	Kyselina zpožděná >14 dní	slabá
Kolonie plochá	-	Plyn ze sacharosy	-
Kolonie vypouklá	-	Kyselina z trehalosy	-
Kolonie lesklá	-	Plyn z trehalosy	-
Kolonie bezbarvá	+	Kyselina z xylosy	-
Kolonie suchá	-	Plyn z xylosy	-
Kolonie hladká	-	Aerob	-
Kolonie drsná	+	Fakultativní	-
Hnědý rozpustný pigment	-	Mikroaerofil	+
Černý rozpustný pigment	-	Anaerob	-
Žlutý rozpustný pigment	-	Plyn z „uzavřeného“ nitrátu	-
Hnědý nerozpustný pigment	-	Plyn z „uzavřeného“ glukosy	-
Černý nerozpustný pigment	-	Indol	-
Žlutý nerozpustný pigment	-	Nitrát na nitrit	+
Oranžový nerozpustný pigment	-	Nitrát na plyn	-
Červený nerozpustný pigment	-	Redukce metylenové modři	+
Buňky pohyblivé	+	Reoxidace metylenové modři	-
Růst při 15 °C	+	Lakmusové mléko kyselé	-
Růst při 20 °C	+	Lakmusové mléko koagul.	-
Růst při 26 °C	+	Lakmusové mléko alkalické	+
Růst při 30 °C	+	Lakmusové mléko reduk.	+
Růst při 37 °C	+	Lakmusové mléko pepton.	+
Růst při 45 °C	+	VP (5198) pozitivní	+
Růst při 50 °C	slabý	VP (5331) pozitivní	+
Růst při 55 °C	-	pH VP 5198 6,0 nebo méně	-
Růst při 60 °C	-	pH VP 5198 6,5 až 7,5	+
Růst při 65 °C	-	pH VP 5198 8,0 nebo více	-
Katalasa	+	Utilizace citrátu	+
Oxidasa	+	Utilizace propionátu	-

Poznámka: Jestliže použijeme dostupná fyziologická a biochemická data, tento kmen se nejvíce podobá *Bacillus subtilis*.

Nejdůležitější výsledky charakterizace

Testy charakterizace	Kmen AQ713	<i>Bacillus subtilis</i>
"Nabobtnalé" sporangium	-	-
Anaerobní růst	mikroaerofilní	mikroaerofilní
VP reakce	+	+
pH VP reakce	7,0	5,0 až 8,0
Maximální růstová teplota	55 °C	45 až 55 °C
Růst v 7% NaCl	+	+
Kyselina z glukosy	+	+
Kyselina z arabinosy	-	+
Kyselina z xylosy	-	+
Kyselina z manitolu	-	+
Rozklad kaseinu	+	+
Rozklad tyrosinu	-	-
Utilizace citrátu	+	+
Utilizace propionátu	-	-

Citace: Gordon, R.E., W.C. Haynes and C.H.N. Pang. 1973. The Genus *Bacillus*. Handbook No. 427. US Department of Agriculture, Washington D.C.

Příklad 2

Aktivita AQ713 proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*

Vzorky bakterie *Bacillus* byly kultivovány v kultivačním mediu pro *Bacillus*. Medium 2 obsahovalo 5 % pepton, 5 % dextrosu, 3 % kvasničný extrakt, 1,5 % proflo extrakt z bavlníkových semen (59 % proteinu, 4,26 % tuku, 6,73 % popela, 3.19 % vlákna a stopová množství gossypolu; zbytek je voda), 10 % sojové mouky, a 0,5 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Medium 3 obsahovalo stejné složky s výjimkou 20 % peptonu a 3,4 % KH_2PO_4 a 4,3 % K_2HPO_4 . Jeden den staré kultury na agaru byly použity k inokulaci 250 mL třepacích baněk opatřených výstupky. Baňky byly třepány při 200 otáčkách za minutu při teplotě 29 °C po dobu 5 dní. K testu insekticidní aktivity byl objem 35 mL kultivační tekutiny centrifugován při rychlosti

5200 otáček za minutu po dobu 20 minut a supernatant byl použit v mikrotestu, který je popsán níže.

Stanovení bylo prováděno na mikrodestičkách majících 96 jamek. Každá jamka obsahovala pevný agarový substrát, testovaný organismus a pozitivní kontrolu nebo negativní kontrolu nebo supernatant získaný tak jak je popsáno v Příkladu 1 z nového kmene *Bacillus*.

Pro testování insekticidní aktivity byl do jamek mikrodestičky připraven agarový substrát podle Marrone et al. (1985), J. Econ. Entomol. 78: 290-293. Pro stanovení nematocidní aktivity byl v jamkách místo toho použit čistý agar (1,5 %).

Roztok Avid[®] (avermektin) o koncentraci 1 ppm byl použit jako pozitivní kontrola. Jako negativní kontrola byla použita deionizovaná voda. Pro každé stanovení byly použity dvě paralely testovaného vzorku nebo kontroly. Do každé jamky bylo vneseno 40 mikrolitrů vzorku supernatantu nebo kompletní kultivační tekutiny z kultury rostoucí v mediu 1, 2 nebo 3. Mikrodestičky byly poté umístěny do laboratorního zařízení s odtahem, aby uschly, což trvalo přibližně 2 až 3 hodiny, než byl agarový roztok doopravdy suchý.

Organismy použité v testu byly buď nedospělí jedinci mandelinky *Diabrotica undecimpunctata*, nedospělí jedinci švába (*Blatella germanica*), nedospělí jedinci vojnice (*Spodoptera exigua*), nedospělí jedinci mouchy octomilky (*Drosophila melanogaster*) nebo jedinci kmene N2 nematoda *Caenorhabditis elegans*. Testovací organismy byly "naředěny" do 0,1 % agaru na finální koncentraci přibližně 5 jedinců na 25 mikrolitrů agaru, který byl vnesen do každé jamky. Mikrodestička byla uzavřena proti přístupu vzduchu pomocí zvláštní látky jako je např. Mylar[®] a ke každé jamce byl umožněn přístup vzduchu pomocí jehlového rámečku. Destičky byly inkubovány při teplotě 27 °C maximálně 7 dní.

Po inkubaci byly jamky vyhodnoceny zjištěním hodnoty mortality nebo stupně vývoje larev. Jamkám obsahujícím pouze mrtvé nebo zakrnělé larvy byla přiřazena hodnota 1, jamky obsahující některé mrtvé a některé silně zakrnělé larvy obdržely hodnotu 2, jamky obsahující

živé, ale zakrnělé larvy byly hodnoceny jako 3 a jamky, v nichž nebyly nalezeny žádné mrtvé larvy obdržely hodnotu 4. Hodnoty paralel jednotlivých vzorků byly zprůměrovány. Výsledky jsou souhrnně uvedeny v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2: Hodnocení aktivity kompletní kultivační tekutiny kultury AQ713 proti hmyzím škůdcům.

	<i>C. elegans</i>	<i>D. undecim-</i> <i>punctata</i>	Vojnice	Octomilka	Pozit. kontrola	Negat. kontrola
Medium 2	NT	1,0	4,0	4,0	1,0	4,0
Medium 3	NT	2,0	4,0	4,0	1,0	4,0

NT = netestováno

Tabulka 3: Hodnocení aktivity supernatantu kultury AQ713 proti hmyzím škůdcům.

	<i>C. elegans</i>	<i>D.undecim-</i> <i>punctata</i>	Vojnice	Octomilka	Šváb	Pozit. kontrola	Negat. kontrola
Medium 2	4,0	3,0	4,0	4,0	4,0	1,0	4,0
Medium 3	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	1,0	4,0

Tyto testy ukazují, že AQ713 byl aktivní při kultivaci v obou mediích, byl-li aplikován jako kompletní kultivační tekutina, nejlepší aktivita byla pozorována v případě použití media 2.

Supernatant byl aktivní pouze jestliže byl AQ713 kultivován v mediu 2.

Příklad 3

Chemické vlastnosti metabolitu kmene AQ713 aktivního proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*

Kmen AQ713 byl kultivován v mediu 2 v objemu 50 mL. Ke každé kultuře bylo přidáno 50 mL ethylacetátu a směs byla třepána v děličce po dobu 2 minut. Vodná vrstva byla

odstraněna a frakce organického rozpouštědla byla převedena do baňky obsahující síran hořečnatý. Frakce v organickém rozpouštědle byla zfiltrována do baňky s kulatým dnem a organické rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce.

Pro biologické stanovení byl odparek znovu rozpuštěn ve 2,5 mL acetonu. Alikvot o objemu 40 mikrolitrů byl naředěn na objem 800 mikrolitrů směsí aceton/voda (70 %). Tento roztok představuje 10 x koncentrovaný organický extrakt. Byla provedena série ředění, čímž byly získány vzorky, které byly testovány na čerstvě vylíhlých larvách mandelinky *Diabrotica undecimpunctata* (1 larva na jamku mikrotitrační destičky tak jak je uvedeno výše), a po 7 dnech byla vyhodnocena mortalita v procentech. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Aktivita ethylacetátových extraktů kultur AQ713 proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*.

Vzorek		Mortalita (v %)
AQ713	Organický extrakt 10 x	89
	Organický extrakt 5 x	93
	Organický extrakt 1 x	65
	Kompletní kultivační tekutina	100
	70 % směs aceton/voda	27
	Voda	59

Výsledky ukazují, že AQ713 produkuje metabolit, který je extrahovatelný organickým rozpouštědlem, a který usmrcuje mandelinku *Diabrotica undecimpunctata*.

Abychom stanovili molekulovou hmotnost aktivního metabolitu, byl AQ713 pěstován na mediu 2 v kultuře o objemu 50 mL. Jeden mililitr kultury byl přenesen do centrifugační zkumavky a centrifugován při rychlosti 12000 otáček za minutu po dobu 15 minut. Supernatant byl oddělen. 500 mikrolitrů supernatantu bylo nanášeno na centrikonový filtr (rozhraní molekulové hmotnosti, 10000 daltonů). Po centrifugaci podle instrukcí výrobce (12000

otáček/min, 35 minut) byl odebrán filtrát a vzorek zadržený nad filtrem byl oddělen centrifugací a promytím filtru. Vzorky supernatantu, filtrátu a tekutiny, která zůstala zadržena nad filtrem, byly testovány na čerstvě vylíhlých larvách mandelinky *Diabrotica undecimpunctata* (destička o 96 jamkách s obsahem jamek podle Marrone et al., viz výše; 40 mikrolitrů vzorku na jamku a 8 jamek pro každý vzorek, 1 larva na jamku). Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Určení molekulové hmotnosti metabolitu kmene AQ713.

		Procento mortality proti mandelince <i>Diabrotica undecimpunctata</i>
AQ713	Supernatant	43
	Filtrát	63
	Tekutina zadržená na filtru	17

Výsledky ukazují, že supernatant a filtrát byly aktivní proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata* a tedy molekulová hmotnost metabolitu je nižší než 10000 daltonů.

Příklad 4

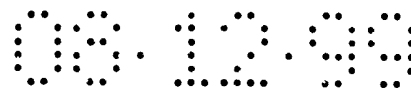
Chemické vlastnosti metabolitu kmene AQ713 aktivního proti rostlinným patogenům.

Kmen AQ713 byl pěstován na mediu 2 v kultuře o objemu 50 mL. Ke každé kultuře bylo přidáno 50 mL ethylacetátu a směs byla třepána v děličce po dobu 2 minut. Vodná vrstva byla odstraněna a vrstva organického rozpouštědla byla převedena do baňky obsahující síran hořečnatý. Frakce v organickém rozpouštědle byla přefiltrována do baňky s kulatým dnem a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce.

Pro biologické stanovení byl odparek rozpuštěn ve 2,5 mL acetonu. Byl odebrán alikvot o objemu 40 mikrolitrů a naředěn na celkový objem 800 mikrolitrů směsí aceton/voda (70 %). Tento roztok je označován jako 10 x koncentrovaný organický extrakt. Bylo provedeno stanovení aktivity organického extraktu proti rostlinným patogenům *Pythium ultimum* a *Botrytis cinerea* na mikrodestičce o 96 jamkách (viz níže). Vzorek celé kultury (kompletní kultivační tekutina) měl hodnotu 100 % (hodnota = 1), avšak 10 x koncentrovaný organický extrakt nevykázal žádnou aktivitu proti oběma rostlinným patogenům (hodnota = 4). To znamená, že aktivní antibiotika produkovaná AQ713, na rozdíl od aktivních metabolitů působících proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*, nejsou extrahovatelná organickým rozpouštědlem jako je ethylacetát.

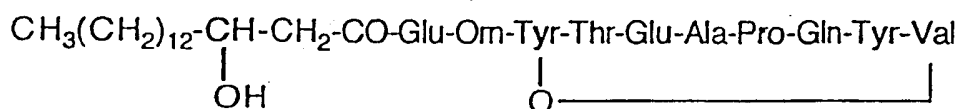
Další testování zahrnuje izolaci nové sloučeniny, agrastatinu A. Z fermentační tekutiny byl připraven butanolový extrakt, nejprve dvojitou extrakcí s jedním objemem ethylacetátu, a vrstvy byly ponechány, aby se oddělily. Poté byla vodná frakce extrahována dvakrát jedním objemem butanolu. Butanolové extrakty byly spojeny a rozpouštědlo odstraněno odpařením na rotační odparce. Lyofilizací výsledného odparku byl připraven práškový produkt.

Prášek byl rozpuštěn ve směsí acetonitril/voda (80 %) a sonikován. Roztok byl extrahován pomocí extrakce na C-18 pevné fázi (SPE extraction), která byla aktivována methanolem a ekvilibrována směsí acetonitril/voda (80 %). Náplň SPE byla eluována směsí ACN/voda (80 %) a eluát byl posléze odpařen. Eluované látky byly dále purifikovány pomocí HPLC. Byla použita kolona C-18 (1 cm x 25 cm) pro HPLC chromatografii (UV detekce při 210 nm) s gradientem rozpouštědel acetonitril + 0,05 % směs TFA/voda + 0,05 % TFA v následujícím režimu: 0 až 20 minut, 33 % ACN; 20 až 30 minut, 40 % ACN; 30 až 45 minut 45 až 55 % ACN; a 45 až 63 minut, 55 % ACN.



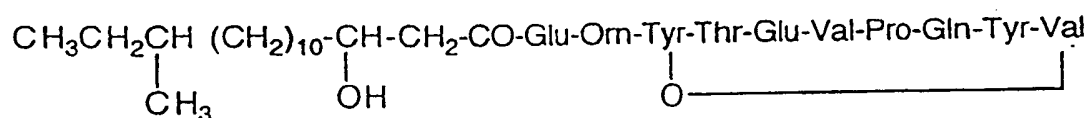
HPLC chromatogram AQ713 ukazuje přítomnost iturinů, sloučenin iturinu podobných (plipastatiny a agrastatiny) a surfaktinů, viz obr. 1. Ituriny A2, A3, A4, A7 a A6 byly identifikovány pomocí kombinace dat z NMR, kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie a porovnáním s údaji v literatuře. Surfactiny byly identifikovány porovnáním s koupenými surfaktinovými standardy pomocí HPLC a kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií.

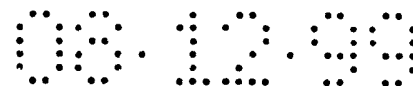
Pomocí aminokyselinové analýzy a kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií bylo zjištěno, že iturinům podobné látky jsou směsí plipastatinů a nových agrastatinů. Pro jednu z nových sloučenin byl rovněž shromážděn rozsáhlý soubor dat NMR (HPLC, peak 20); tato látka byla pojmenována agrastatin A. Bylo zjištěno, že agrastatin A obsahuje tyto aminokyseliny: Thr; 3 Glu; Pro; Ala; Val; 2 Tyr; a Orn. To značí rozdíl proti plipastatinu A daný přítomností Val a ztrátou Ile. Molekulová hmotnost agrastatinu A byla stanovena 1448, což odpovídá následující struktuře:



Povaha přímého řetězce části obsahující mastnou kyselinu byla potvrzena ^1H NMR. Poloha aminokyselin v cyklickém peptidu byla určena podrobnou analýzou pomocí souborů dat TOCSY a ROESY.

Hmotnostní spektrometrie a aminokyselinová analýza agrastatinu B (HPLC, peak 26) ukazují, že jeho struktura je podobná plipastatinu B2 s náhradou zbytku Ala Val. Struktura je uvedena níže:





Příklad 5

Aktivita kmene AQ713 proti rostlinným patogenům v kultuře *in vitro* (mikrodestička o 96 jamkách).

S cílem určit, zda AQ713 je účinný proti houbám *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* a *Alternaria solani*, byly provedeny následující experimenty. Mikrodestičky o 96 jamkách (s plochým dnem, 400 mikrolitrů na jamku, Nunc) byly naplněny agarovým médiem (bramborový dextrosový agar, PDA, Difco). Kultury *P. infestans* byly kultivovány po dobu 3 dnů v tekutém mediu YPG-1 (0,4 % kvasinkový extrakt, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,5 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 % glukosa). V případě ostatních druhů hub byly spory seškrábnuty z povrchu agarových ploten a alikvoty o objemu 0,1 až 0,2 mL deionizované vody a sporové suspenze (o koncentraci přibližně 2×10^6 spor/mL) patogenní houby byly naneseny na agar.

Kmen AQ713 byl kultivován po dobu 72 hodin v mediu 2 nebo 3 tak jak je popsáno v Příkladu 2. Supernatanty byly získány centrifugací kompletní kultivační tekutiny kultury při rychlosti 5200 otáček za minutu po dobu 20 minut. Houbové organismy patogenní pro rostliny byly napipetovány na destičky o 96 jamkách (8 jamek pro 1 patogenní organismus). Přítomnost a nepřítomnost růstu houby byla zaznamenávána pro všech 8 jamek. Do každé jamky bylo přidáno přibližně 40 mikrolitrů supernatantu kultury AQ713 nebo 20 mikrolitrů kompletní kultivační tekutiny. Hodnota 1 znamená úplnou inhibici růstu houbového organismu. Hodnota 4 znamená nulovou inhibici růstu houby. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Inhibice růstu houbových organismů *in vitro* (destička s 96 jamkami)

Supernatant AQ713	Medium 2 Hodnoty	Medium 3 Hodnoty
<i>Phytophthora infestans</i>	1	1
<i>Pythium ultimum</i>	1	1
<i>Botrytis cinerea</i>	1	1
<i>Rhizoctonia solani</i>	4	1
<i>Alternaria solani</i>	1	1

Kompletní kultivační tekutina kultury AQ713

<i>Colletotrichum cocodes</i>	1	NT
<i>Alternaria brassicicola</i>	1	NT
<i>Botrytis cinerea</i>	1	NT
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	1	NT
<i>Monilia fructicola</i>	1	NT
<i>Venturia pyrina</i>	1	NT
<i>Rhizoctonia solani</i>	1	NT
<i>Alternaria solani</i>	1	NT

NT = netestováno.

Výsledky ukazují, že kmen AQ713 má široké fungicidní spektrum *in vitro*, a že jak kompletní kultivační tekutina tak i supernatant jsou vysoce aktivní. Supernatant byl aktivní proti houbě *Rhizoctonia solani*, jestliže byla bakterie AQ713 pěstována na mediu 3, ale ne jestliže byla pěstována na mediu 2.

Příklad 6

Aktivita kmene AQ713 proti rostlinným patogenům v kultuře *in vitro* (zónové stanovení)

Pro stanovení aktivity kmene AQ713 metodou difuze v agaru (zónová metoda), byly spory rostlinných patogenů naočkovány na povrch bramborového dextrosového agaru v Petriho miskách o průměru 10 cm. Do agaru byly udělány jamky o velikosti 7 mm a do těchto jamek byly vneseny 100 mikrolitrové vzorky supernatantu kultury AQ713 narostlé v mediu 2. Supernatant byl připraven centrifugací při rychlosti 4200 otáček za minutu po

dobu 40 minut. Supernatant byl poté ještě jednou zcentrifugován za stejných podmínek (4200 ot./min, 40 minut). Typické výsledky zahrnovaly vznik zóny bez jakéhokoli růstu patogenního organismu okolo jamky a/nebo s redukováným růstem tohoto patogenního organismu. Velikost zóny vyjádřená v milimetrech byla změřena a zaznamenána. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Inhibice růstu houbových rostlinných patogenů *in vitro* (zónový test)

	Velikost zóny (mm)		
	<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Monilia fruticola</i>
Supernatant AQ713	16	23	14
Kompletní kultivační tekutina kultury AQ713	22	15	18

Příklad 7

Aktivita kmene AQ713 proti bakteriálním rostlinným patogenům

Standardní stanovení pomocí difuze v agaru bylo založeno jako v Příkladu 6. Povrch Petriho misky byl zaočkován bakteriálním patogenním mikroorganismem tak, aby mohl vytvořit souvislý nárůst. Do každé jamky bylo napipetováno 100 mikrolitrů kompletní kultivační tekutiny kultury kmene AQ713 rostoucího na mediu 2. Velikost zóny byla vyjádřena v milimetrech.

Tabulka 8: Inhibice bakteriálních rostlinných patogenů *in vitro* (zónový test)

Kompletní kultivační tekutina kultury AQ713	Inhibiční zóna (mm)
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	18
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	11
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	18
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	11
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i>	22

AQ713 byl aktivní proti všem druhům bakteriálních rostlinných patogenů testovaným *in vitro*.

Příklad 8

Aktivita kmene AQ713 proti rostlinným patogenům v rostlinných testech

Aktivita kmene AQ713 byla testována proti šedé plísni *Botrytis cinerea* na fazolích a na listech pelargonie, proti *Alternaria solani* na semenáčcích rajčete, a proti plísni salátové *Bremia lactucae* na salátu.

V případě *A. solani* byly semenáčky rajčete ve stadiu 2 až 3 listů vysazeny ve skupinách po šesti rostlinách a byly postříkány, až přebytečná tekutina začala odtékat, kompletní kultivační tekutinou kultury kmene AQ713 rostoucí na mediu 2. Po postřiku byly semenáčky ponechány aby oschly (asi 1,5 hodiny). Semenáčky byly poté postříkány suspenzí obsahující $5,0 \times 10^4$ spor/mL. Semenáčky byly zakryty plastickým krytem a inkubovány při teplotě 28 °C v Percivalově inkubátoru. Voda bez AQ713, s a bez spor patogenního organismu, byla použita jako negativní kontrola a pozitivní patogenní kontrola. O čtyři dny později byl test vyhodnocen. Ve vodné kontrole *A. solani* byly zjištěny uniformní léze na všech listech a dělohy byly odděleny a silně infikovány (hodnota 5 = úplná infekce, žádná inhibice). Rostliny ošetřené kmenem AQ713 měly několik lehkých lézí rozptýlených na skutečných listech. Dělohy byly neoddělené, ale měly na sobě několik malých lézí (hodnota 1). Negativní kontrola nebyla infikována.

Druhý test byl proveden s oddělenými rajčatovými semenáčky (stonky ulomené na úrovni půdy) umístěnými do kameninových nádob naplněných vodou, které byly zakryty plastickými kryty a uchovávány jak je uvedeno výše. Rostliny byly postříkány tak jak je uvedeno výše a příznaky infekce *A. solani* byly zaznamenány po čtyřech dnech. U negativních kontrol nebyly žádné příznaky. U pozitivních kontrol byly na semenáčcích nalezeny uniformní léze. Ošetření pomocí kmene AQ713 bylo hodnoceno jako 1 (málo nebo žádné léze). O dva dny později byly rostliny pozitivní kontroly zničeny, avšak semenáčky ošetřené kmenem AQ713 byly naprosto čisté a vypadaly stejně jako negativní kontroly (vodou postříkané rostliny).

V případě testu s *Botrytis cinerea* byly první skutečné listy rostliny fazole poraněny přitlačením ústí kultivační zkumavky o rozměru 13 x 100 mm na každý list. Na každém listě byla takto vytvořena dvě poranění. Listy byly postříkány kompletní kultivační tekutinou kultury kmene AQ713 rostoucího na mediu 2 nebo samotnou vodou nebo samotným patogenním organismem. Po usušení byly listy opět postříkány spory *B. cinerea* ($0,8 \times 10^6$ spor/mL). Listy byly umístěny v sadbovačích překrytých plastickými kryty a uchovávány při teplotě 18 až 20 °C v Percivalově inkubátoru. Po pěti dnech byla pozitivní kontrola (samotný patogen) postižena hnilobou v oblasti mající průměr asi 25 mm. Negativní kontrola (samotná voda) nevykazovala žádné známky hniloby. V případě aplikace AQ713 nebyla zjištěna žádná infekce na 7 z 8 kruhů, kde listy byly poraněny. Jediný kruh, který vykazoval infekci, měl známky lehké infekce na dvou místech okolo kruhu.

V případě testu s houbou *Bremia* byla semena salátu umístěna do vrstvy sterilizované směsi užívané v květináčích, která obsahovala rašelinu, perlit a vermikulit v malých rostlinných kondominiích z čiré plastické hmoty, která byla asi 8 centimetrů vysoká a široká. Po vyklíčení semen (1 týden) byly semenáčky salátu postříkány kompletní kultivační tekutinou kultury AQ713 nebo vzorkem supernatantu. Rostliny byly ponechány, aby oschly, a poté byla

na semenáčky nastříkána suspenze spor salátové plísně z infikovaných semenáčků salátu. Přes rostliny byly umístěny kryty z plastické hmoty a rostliny byly inkubovány při teplotě 18 až 20 °C v Percivalově inkubátoru. Po jednom týdnu byl test vyhodnocen. Kmen AQ713 nezabránil rozvinutí salátové plísně *Bremia* na semenáčcích salátu.

Příklad 9

Účinnost kmene AQ713 proti rostlinným onemocněním (skleníkový test)

Nepravé padlí hroznů (grape downy mildew)

Kmen AQ713 byl kultivován v mediu obsahujícím sóju ve 400 litrovém fermentoru po dobu 48 hodin. Rostliny vinné révy (kultivar Chardonnay) byly postříkány kompletní kultivační tekutinou kultury zředěnou 2 x a 4 x sterilní vodou pomocí ruční stříkačky až do stupně kdy tekutina začala stékat po povrchu. Po oschnutí byly rostliny postříkány podruhé. Po osušení byly rostliny inokulovány patogenním organismem vyvolávajícím nepravé padlí hroznů, *Plasmopara viticola*. Každou dávkou byly ošetřeny 3 rostliny. Každá rostlina byla hodnocena z hlediska procenta inhibice onemocnění, které mělo hodnotu od 0 do 100 % kontroly. 100 % kontrola je rostlina, která nemá viditelné léze. Chemický fungicid metalaxyl byl použit pro srovnání. Získané výsledky byly následující:

AQ713 2 x zředěná kompletní kultivační tekutina	97,7 % kontroly
AQ713 4 x zředěná kompletní kultivační tekutina	100 % kontroly
Metalaxyl 30 ppm	100 % kontroly
Metalaxyl 10 ppm	98,3 % kontroly
Metalaxyl 1 ppm	80 % kontroly

Výsledky ukazují, že kmen AQ713 inhiboval nepravé padlí hroznů stejně jako chemický fungicid.

Příklad 10

Účinnost kmene AQ713 proti padlí tykve (squash powdery mildew)

Kmen AQ713 byl kultivován na sójovém mediu ve 400 litrovém fermentoru po dobu 48 hodin. Rostliny tykve (Crookneck a Acorn) byly postříkány kompletní kultivační tekutinou z fermentace ve 400 litrovém fermentoru (viz výše) a touto tekutinou 2 x zředěnou sterilní vodou pomocí ruční stříkačky do stadia, kdy tekutina začala stékat. Po oschnutí byly rostliny inokulovány patogenem *Sphaerotheca fuliginea* působícím padlí tykve. Každou dávkou byly ošetřeny 2 rostliny. Rovněž byl testován prášek kompletní kultivační tekutiny kultury získaný sušením v sprejové sušárně. Kompletní tekutina kultury z kultivace ve 400 litrovém fermentoru byla sušena ve sprejové sušárně. 10 % a 2,5 % roztoky tohoto prášku byly použity pro postřik rostlin až do stadia, kdy tekutina začala stékat (viz výše). Výskyt onemocnění padlí byl hodnocen v rozmezí 0 až 5. Hodnota 5 znamená 100 % onemocnění, zatímco 0 znamená žádné onemocnění. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9

Testovaná suspenze	Tykev Acorn rostlina 1	Tykev Acorn rostlina 2	Tykev Crookneck rostlina 1	Tykev Crookneck rostlina 2
-				
AQ713 kompletní kultivační tekutina	0	0	0	0
AQ713 2 x zředěná kompletní kultivační tekutina	0	0	0	0
AQ713 sprejově 10 % sušený prášek	0	0	0	0
AQ713 2,5 % sprejově sušený prášek	0	0	0,5	1

Kompletní tekutina z kultivace kmene AQ713 a sprejově sušený prášek téměř úplně inhibovaly padlí tykve.

Příklad 11

Účinnost kmene AQ713 při použití ve skleníku proti plísni bramborové (late blight), plísni šedé (gray mold), padlí révovému (grape powdery mildew), obilnému padlí (cereal powdery mildew), sněti pochvy působené kořenomorkou bramborovou (sheath blight) a onemocnění rýže zvané "rice blast"

Kmen AQ713 byl kultivován v sójovém mediu po dobu 72 hodin ve 250-mL třepacích baňkách. Onemocnění, patogenní mikroorganismus vyvolávající toto onemocnění a hostitel jsou uvedeni níže v tabulce 10. Kompletní kultivační tekutina kultury kmene AQ713 byla testována na rostlinách tak jak je uvedeno níže v tabulce 11.

Tabulka 10

Onemocnění	Rostlinný patogen	Hostitel
Plíseň bramborová (late blight)	<i>Phytophthora infestans</i>	rajče
Plíseň šedá (gray mold)	<i>Botrytis cinerea</i>	paprika
Sněť pochvy (sheath blight)	<i>Rhizoctonia solani</i>	rýže
"Rice blast"	<i>Pyricularia oryzae</i>	rýže
Padlí révové (powdery mildew)	<i>Uncinula necator</i>	vinná réva
Padlí (powdery mildew)	<i>Drysiphe graminis</i> f. sp. <i>graminis</i>	pšenice

Kompletní kultivační tekutina kultury v neředěném stavu byla nanесena pomocí ruční stříkačky na testované rostliny až začala stékat s jejich povrchu. Po oschnutí byl postřik proveden podruhé. Tři rostliny byly ošetřeny pro každé onemocnění a léčbu. Po oschnutí byly rostliny inokulovány patogenními organismy. Každá rostlina byla hodnocena z hlediska procentuální inhibice onemocnění v rozsahu 0 až 100 % kontroly. 100 % kontrola znamená, že na rostlině nebyly viditelné léze. Chemické fungicidy byly použity pro srovnání. Index onemocnění znamená závažnost onemocnění na neošetřené kontrole.

Tabulka 11

	<i>P. infestans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>E. graminis</i>	<i>U. necator</i>	<i>P. oryzae</i>	<i>R. solani</i>
AQ713	70	100	84	100	100	100
Metalaxyl 30 ppm	100					
Metalaxyl 10 ppm	77					
Propiconazol 10 ppm		87				
Propiconazol 5 ppm		57				
Propiconazol 0,5 ppm			100			
Propiconazol 0,2 ppm			54			
Myclobutanil 30 ppm				100		
Myclobutanil 10 ppm				100		
Pencycuron 50 ppm					100	
Pencycuron 10 ppm					100	
Benomyl 100 ppm						100
Benomyl 40 ppm						77
Index onemocnění (%)	80	95	70	50	60	80

Kmen AQ713 vykazoval aktivitu, která byla ekvivalentní chemickým fungicidům na všech testovaných patogenních mikroorganismech.

Příklad 12

Účinnost kmene AQ713 proti plísni *Peronospora parasitica* postihující rostliny rodu *Brassica* (*Brassica downy mildew*)

Bakterie *Bacillus* kmen AQ713 byla kultivována v 10 litrovém fermentoru na sójovém mediu po dobu 48 hodin. Kompletní neředěná kultivační tekutina byla nastříkána na třítýdenní rostliny kvěťáku a růžičkové kapusty ve stadiu s plně vyvinutými dělohami pomocí kompresorové stříkací pistole. Při každém ošetření byly nastříkány tři paralely zahrnující 15 až 25 semenáčků v jednom květináči. Azoxystrobinový fungicid Quadris[™] od firmy Zeneca byl rovněž nastříkán na rostliny (tři na jedno ošetření) v koncentraci 250 a 125 ppm. Sporová suspenze houby *Peronospora parasitica*, způsobující plíseň, v koncentraci 1 až 5×10^4 spor/mL byla nastříkána na rostliny *Brassica* poté, kdy oschly postřiky AQ713 a Quadris. Rostliny byly inkubovány při teplotě 15 až 17 °C po dobu 24 hodin z důvodů infikování. Poté byly semenáčky inkubovány při teplotě 20 až 24 °C po dobu šesti dnů. Květináče byly vráceny do teploty 15 až 17 °C na jednu noc, aby patogenní organismus vysporuloval před vyhodnocením testu. Každá rostlina byla hodnocena určením hodnoty procentní inhibice onemocnění v rozsahu 0 až 100 % kontroly. 100 % kontrola je rostlina, která nemá žádné sporulační léze. Průměrné výsledky ze tří paralel jsou uvedeny níže v tabulce 12.

Tabulka 12

	Hodnocení 23. prosince	Hodnocení 30. prosince	Hodnocení 6. ledna
Kompletní kultivační tekutina AQ713	100	90	75
Quadris 250 ppm	100	NT	NT
Quadris 125 ppm	NT	100	100
Kontrola voda	0	0	0

NT = netestováno

AQ713 účinně inhiboval plíseň *Peronospora parasitica* po dobu 3 týdnů.

Příklad 13

Synergismus kmene AQ713 a komerčního fungicidu

Kmen AQ713 byl kultivován v 10 litrovém fermentoru na sójovém mediu po dobu 72 hodin. Bakteriální kultura byla zředěna 2 x a 4 x sterilní vodou. Neředěná kultura, 2 x ředěná kultura a 4 x ředěná kultura byly nastříkány na třítýdenní rostliny papriky kompresorovou stříkací pistolí. Tři rostliny byly nastříkány na jedno ošetření. Azoxystrobinový fungicid Quadris[™] od firmy Zeneca byl rovněž nastříkán na rostliny (tři na jedno ošetření) v koncentracích 500, 250 a 125 ppm. Kromě toho byla na rostliny papriky nastříkána kombinace Quadris a kompletní kultivační tekutiny AQ713 v poměru 1:1 (tři rostliny na jedno ošetření). Ošetření s a bez Quadris jsou uvedeny v tabulce 13. Sporová suspenze šedé plísně *Botrytis cinerea* v koncentraci 1×10^6 spor/mL byla nastříkána na rostliny papriky po oschnutí postřiků AQ713 a Quadris. Rostliny byly inkubovány při teplotě 20 až 22 °C po dobu 3 dnů do vyhodnocení testu. Byl hodnocen výskyt onemocnění šedou plísní v rozsahu

hodnot 0 až 5. Hodnota 5 znamená 100 % výskyt onemocnění, zatímco hodnota 0 znamená nepřítomnost onemocnění. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13

Ošetření	Hodnocení Paralela 1	Hodnocení Paralela 2	Hodnocení Paralela 3	Hodnocení Průměr
AQ713 neředěná	0,5	0,5	1,5	0,8
AQ713 2 x ředěná	2,0	2,5	2,0	2,2
AQ713 4 x ředěná	3,0	3,0	2,0	2,7
Quadris 500 ppm	4,0	3,5	4,0	3,8
Quadris 250 ppm	2,5	3,5	3,0	3,0
AQ713 neředěná+ Quadris 500 ppm	0,5	1,0	1,0	0,8
AQ713 neředěná+ Quadris 250 ppm	1,0	1,0	0,5	0,8
AQ713 2 x ředěná+ Quadris 250 ppm	0,5	1,0	1,0	0,8
AQ713 4 x ředěná+ Quadris 250 ppm	0,5	1,0	2,5	1,3
Kontrola voda	4,0	5,0	5,0	4,7
Kontrola voda 2	5,0	5,0	5,0	5,0

Výsledky jasně ukazují, že kombinace Quadris a kmene AQ713 inhibují onemocnění plísni šedou lépe než samotný Quadris nebo kmen AQ713.

Průmyslová využitelnost

Přihláška vynálezu se týká oblasti biopesticidů. Nový kmen *Bacillus subtilis* AQ713 inhibuje řadu houbových a bakteriálních onemocnění rostlin a rovněž vykazuje aktivitu proti mandelince *Diabrotica undecimpunctata*. Přihláška vynálezu se rovněž týká fungicidních, baktericidních a insekticidních prostředků obsahujících tento nový kmen *Bacillus subtilis* spolu s antibiotiky a metabolity produkovanými tímto kmenem, které jsou použity samotné nebo v kombinaci s jinými chemickými a biologickými pesticidy.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Biologicky čistá kultura kmene *Bacillus subtilis* AQ713, NRRL přírůstkové číslo B-21661 a jeho mutanty, které mají všechny identifikační charakteristiky tohoto kmenu.
2. Metabolit produkovaný kmenem *Bacillus subtilis* podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vykazuje aktivitu proti broukům rodu *Diabrotica*, je extrahovatelný organickým rozpouštědlem a má molekulovou hmotnost nižší než 10 000 daltonů.
3. Supernatant získaný z kultury kmene *Bacillus subtilis* AQ713 podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vykazuje antifungální a antibakteriální aktivitu a aktivitu proti broukům rodu *Diabrotica*.
4. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kompletní kultivační tekutinu kultury kmene *Bacillus subtilis* AQ713 podle nároku 1 a chemický fungicid.
5. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje kompletní kultivační tekutinu kultury kmene *Bacillus subtilis* AQ713 podle nároku 1 a biologický nebo chemický pesticid.
6. Prostředek podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje chemický fungicid.
7. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje metabolit podle nároku 2 a chemický fungicid.

8. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje metabolit podle nároku 2 a biologický nebo chemický pesticid.
9. Prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje chemický fungicid.
10. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje supernatant podle nároku 3 a chemický fungicid.
11. Prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje supernatant podle nároku 3 a biologický nebo chemický pesticid.
12. Prostředek podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje chemický pesticid.
13. Způsob ochrany nebo léčení rostlin a plodů před houbovými a bakteriálními infekcemi a napadením brouky z rodu *Diabrotica*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aplikaci účinného množství kmene *Bacillus subtilis* podle nároku 1.
14. Způsob ochrany nebo léčení rostlin a plodů před houbovými a bakteriálními infekcemi a napadením brouky z rodu *Diabrotica*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aplikaci účinného množství metabolitu podle nároku 2.

15. Způsob ochrany nebo léčení rostlin a plodů před houbovými a bakteriálními infekcemi a napadením brouky z rodu *Diabrotica*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aplikaci účinného množství supernatantu podle nároku 3.

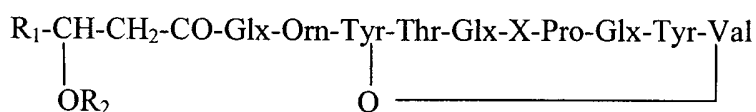
16. Způsob ochrany nebo léčení rostlin a plodů před houbovými a bakteriálními infekcemi a napadením brouky z rodu *Diabrotica*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aplikaci účinného množství přípravku podle nároků 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 nebo 12.

17. Způsob podle nároků 13, 14 nebo 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že infekce jsou vyvolány alespoň jedním mikroorganismem vybraným ze skupiny zahrnující *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum cocodes*, *Alternaria brassicicola*, *Cladosporium cucumerinum*, *Monilia fructicola*, *Venturia pyrina*, *Acidovorax avenae*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganense*, *Plasmopara viticola*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Uncinula necator* a *Peronospora parasitica*.

18. Způsob podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že infekce jsou vyvolány alespoň jedním mikroorganismem vybraným ze skupiny zahrnující *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum cocodes*, *Alternaria brassicicola*, *Cladosporium cucumerinum*, *Monilia fructicola*, *Venturia pyrina*, *Acidovorax avenae*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganense*, *Plasmopara viticola*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Uncinula necator* a *Peronospora parasitica*.

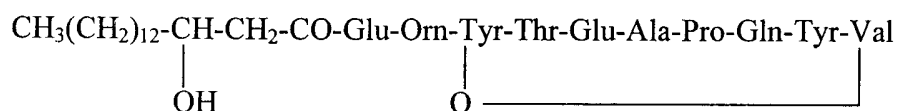
19. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kmen *Bacillus subtilis* AQ713 je aplikován jako kompletní kultivační tekutina bakteriální kultury.
20. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kmen *Bacillus subtilis* AQ713 je aplikován jako supernatant.
21. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kmen *Bacillus subtilis* AQ713 je aplikován ve formě zvlhčitelných prášků, granulí, v tekuté formě nebo ve formě mikrokapsulí.
22. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kmen *Bacillus subtilis* AQ713 je aplikován ve formě zvlhčitelných prášků, granulí, v tekuté formě nebo ve formě mikrokapsulí.
23. Způsob podle nároků 13, 14 nebo 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se ošetří kořeny rostlin nebo půda okolo kořenů.
24. Způsob podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se ošetří kořeny rostlin nebo půda okolo kořenů.
25. Prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje iturin typu A, plipastatin a surfactin.
26. Prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále obsahuje agrastanin.
27. Surfactinový polypeptid izolovaný z kmenu AQ713, který má insekticidní aktivitu.

28. Způsob ochrany nebo léčení rostlin a plodů před napadením hmyzem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aplikaci účinného množství sloučeniny:



kde R_1 je rozvětvený nebo přímý alifatický postranní řetězec mající 8 až 20 atomů uhlíku; R_2 je acetát nebo derivát esteru, X je Ala nebo Val a Glx je Gln nebo Glu.

29. Způsob ochrany nebo léčení rostlin a plodů před napadením hmyzem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aplikaci účinného množství sloučeniny:



30. Způsob ochrany nebo léčení rostlin a plodů před napadením hmyzem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje aplikaci účinného množství prostředku obsahujícího iturin typu A, plipastatin a surfactin.

31. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje aplikaci účinného množství agrastatinu.

32. Lipopeptidový extrakt izolovaný z kmenu AQ713, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má insekticidní aktivitu.

33. Surfactinový lipopeptid izolovaný z kmenu AQ713, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má insekticidní aktivitu.

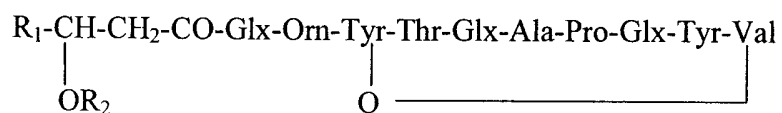
34. Způsob léčení nebo ochrany rostlin nebo plodů proti napadení hmyzem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje dodávání účinného množství prostředku obsahujícího extrakt podle nároku 33.

35. Způsob léčení nebo ochrany rostlin nebo plodů proti napadení hmyzem, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje dodávání účinného množství prostředku obsahujícího surfactin podle nároku 34.

36. Způsob podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se prostředek aplikuje na půdu okolo kořenů rostliny nebo na kořeny, které je třeba léčit.

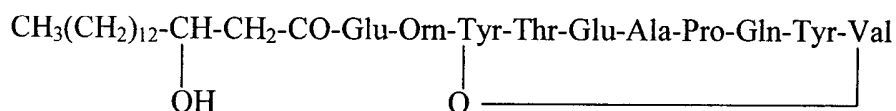
37. Způsob podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se prostředek aplikuje na půdu okolo kořenů rostliny nebo na kořeny, které je třeba léčit.

38. Sloučenina



kde R_1 je větvený nebo přímý alifatický postranní řetězec mající 8 až 20 atomů uhlíku; R_2 je acetát nebo derivát esteru a Glx je Gln nebo Glu.

39. Sloučenina:



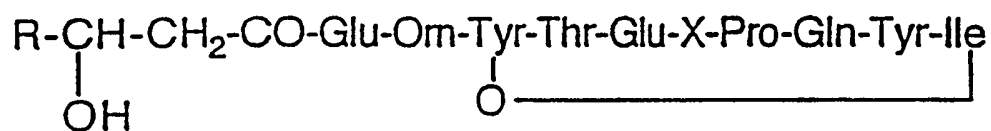
40. Způsob izolace supernatantu, který má insekticidní aktivitu, vyznačující se tím, že se pěstuje kultura podle nároku 1 a izoluje se supernatant z kultury.

08.12.99

PV 1999-3757

C.J. 84078

1/2



Plipastatin A1, X = Ala, R = CH₃(CH₂)₁₂-

Plipastatin A2, X = Ala, R = CH₃CH₂CHCH₃(CH₂)₁₀-

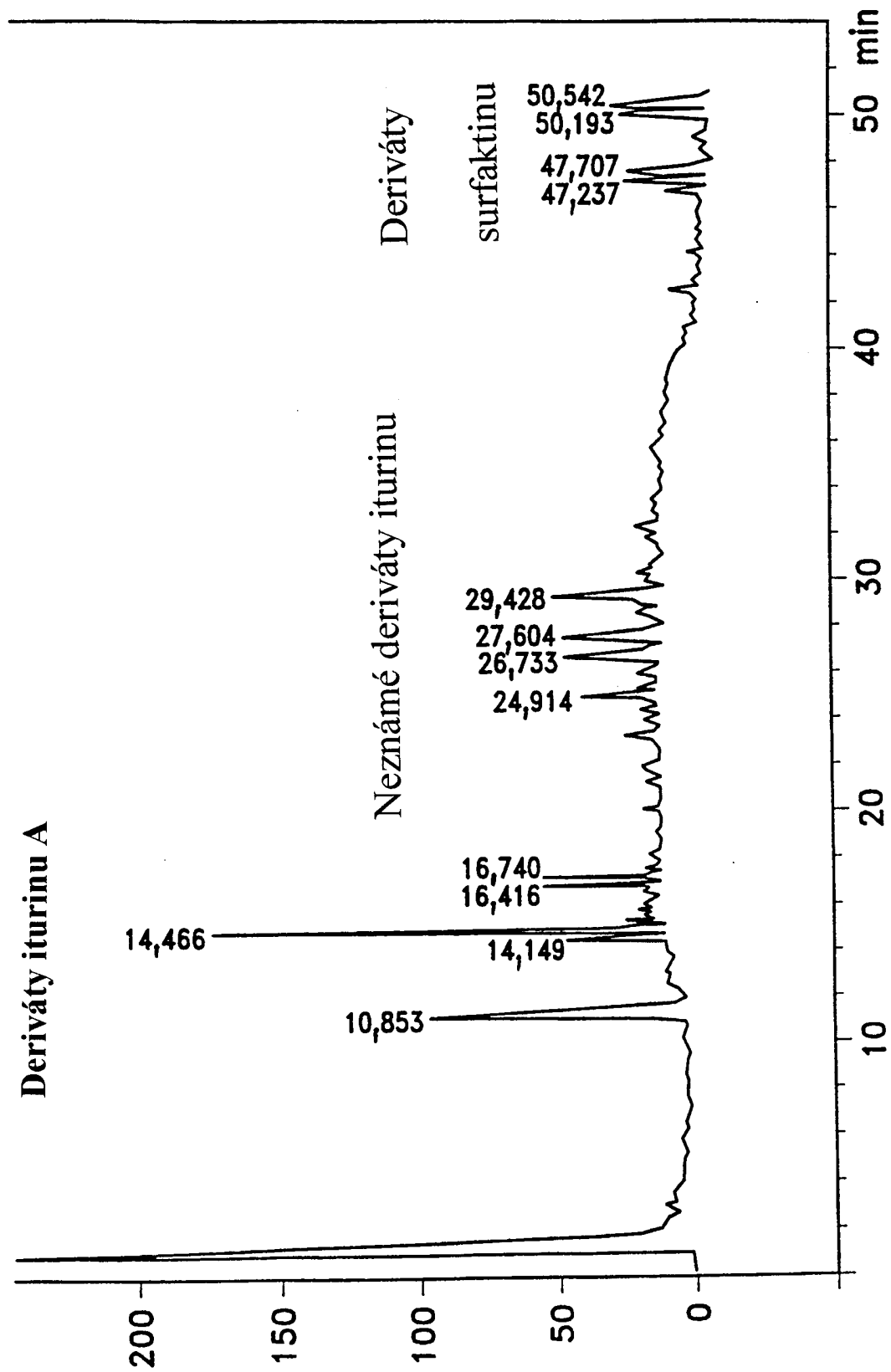
Plipastatin B1, X = Val, R = CH₃(CH₂)₁₂-

Plipastatin B2, X = Val, R = CH₃CH₂CHCH₃(CH₂)₁₀-

Obr. 1

08.10.99

2/2



Obr. 2