

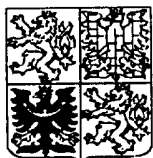
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

284 829

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1524-94**

(22) Přihlášeno: **17. 10. 90**

(30) Právo přednosti:
17. 10. 89 GB 89/8923407

(40) Zveřejněno: **15. 03. 95**
(Věstník č. 3/95)

(47) Uděleno: **18. 01. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17. 03. 99**
(Věstník č. 3/99)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
A 01 N 63/00

(73) Majitel patentu:

ZENECA LIMITED, London, GB;

(72) Původce vynálezu:

Fattori Maria, Massa, IT;

**Horemans Stefaan Renaat Maria, Tienen,
BE;**

Lefébvre Marc, Tienen, BE;

Powell Keith Adrian, Bracknell, GB;

Renwick Annabel, Bracknell, GB;

(74) Zástupce:

**Traplová Jarmila JUDr., Přístavní 24, Praha
7, 17000;**

(54) Název vynálezu:

Fungicidní prostředek

(57) Anotace:

Fungicidní prostředek, který obsahuje jako účinnou látku mikroorganismus kmene *Pseudomonas fluorescens* ve směsi s nosičem přijatelným v zemědělské praxi. Mikroorganismy *Pseudomonas fluorescens* byly uloženy 1.9.1989 za podmínek Budapeštské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeen, Velká Británie pod čísly vkladů 40 186, 40 187, 40 188 a 40 190.

CZ 284 829 B6

Fungicidní prostředek

Oblast techniky

5

Vynález se týká fungicidního prostředku, který jako účinnou látku obsahuje mikroorganismus kmene *Pseudomonas fluorescens*, a jeho použití pro ochranu rostlin proti napadení plísní.

10 Dosavadní stav techniky

15 V mikrobiologické praxi je obvyklé vyhledávat mikroorganismy mající zajímavé vlastnosti zkoumáním velkého počtu, obvykle mnoha tisíc, organismů z půdy na jejich účinek významný pro zamýšlené použití. Jedním takovým použitím je izolace biologicky účinných prostředků, které jsou účinné proti vybraným druhům rostlinných patogenů. Tyto biologicky účinné prostředky lze používat jako alternativní nebo doplňující prostředky k chemickým prostředkům pro hubení patogenů.

20 V běžné praxi se odebírají vzorky půdy z míst, kde se požadovaný patogen zdá být potlačen, což může znamenat, že sám tento mikroorganismus může v půdě inhibovat patogenicitu. Z jednotlivých vzorků se potom v laboratoři izolují tyto mikroorganismy vymýváním z kořenů a nechají se růst na agaru při jedné nebo dvou teplotách optimálních pro mikrobiologický růst, obvykle od 25 do 30 °C. Tyto organismy se potom testují nejprve proti různým patogenům na agaru v sérii Petriho misek za použití metody dvojí kultury. Toto je primární zkoušení. Nadějně organismy 25 z tohoto primárního zkoušení se potom podrobí důkladnějšímu zkoumání v sérii sekundárního zkoušení za použití půdy.

Podle zkušeností autorů tohoto vynálezu organismy, které nakonec projdou dalšími testy a polními pokusy, nevykazují při prvním zkoušení ani příslušnou ani dostatečnou selektivitu. 30 Obvyklé primární zkoušení propustí velký počet organismů (obvykle okolo 20 %), které se zdají být nadějnými, ale většina z nich je potom v následujících testech zavržena. Kromě tohoto je nyní autorům tohoto vynálezu známo, že při primárním zkoušení projdou kromě organismů, které se následně ukáží jako nepoužitelné, také určité organismy, které jsou zcela schopné projít dalšími následnými testy, výsledkem toho je, že tradiční testy propouštějí organismy, které jsou 35 slabými inhibitory patogenicity a nepropouštějí organismy, které jsou dobrými inhibitory patogenicity.

Byl nalezen způsob vyhledávání organismů z půdy, který umožňuje nalezení velkého počtu potenciálně dobrých organismů a který vylučuje pokud možno nejvíce látky se špatným účinkem. 40 Tento způsob spočívá v tom, že se testuje inhibiční účinek potenciálního fungicidního prostředku ve dvou testech, přičemž první test je na inhibici vývinu patogenu ve sterilizované půdě infikované myceliem *Pythium* spp. a druhý test je dále na inhibici vývinu choroby v rostoucí rostlině náchylné k onemocnění vyvolanému přítomností komplexu způsobujícího vadnutí klíčících rostlin, načež se prostředky mající potenciální inhibiční účinek v obou testech ve 45 srovnání s kontrolou identifikují a podrobí se dalšímu zkoumání.

Tento způsob je použitelný zvláště, i když ne výlučně, pro testování mikroorganismů ze vzorků půdy na jejich možný biologický účinek, ale není žádný zvláštní důvod k tomu, aby tentýž postup nemohl být použit pro chemické prostředky, aniž by byl jakkoliv upravován.

50

Jak již bylo výše uvedeno, tradiční způsob izolace mikroorganismů není sám o sobě selektivní. Výše popsaný způsob vyhledávání organismů z půdy tedy poskytuje způsob předběžného testování mikroorganismů izolovaných ze vzorků půdy, který spočívá v tom, že se do uzavíratelné nádoby umístí vrstva vlhkého sterilního písku a na ni se umístí vlhký vzorek půdy a do

vzorku půdy se zaseje semeno rostliny náchylné k určitému onemocnění, nádoba se uzavře a umístí se do takového prostředí, které způsobuje vývin choroby, semeno se nechá vyklíčit a kořeny se nechají prorůst do vrstvy písku, vyřízne se tunel podélně oběma vrstvami, vyberou se kořeny pouze z vrstvy písku a z těchto kořenů se izolují mikroorganismy.

5

Prostředky chemické nebo mikrobiologické, které prošly těmito dvěma testy, mohou být potom dále zkoumány na inhibiční účinek proti plísňové infekci v jednom nebo ve více než jednom testu, které zahrnují:

10

a) infekci cukrové řepy organismem *Aphanomyces cochlioides* při teplotě od 12 do 15 °C,

b) infekci hrachu organismem *Pythium ultimum* při teplotě od 12 do 15 °C,

c) infekci hrachu organismem *Pythium ultimum* při teplotě od 24 do 27 °C,

d) infekci hrachu organismem *Rhizoctonia solani* při teplotě od 24 do 27 °C,

e) infekci pšenice organismem *Fusarium culmorum* při teplotě od 18 do 21 °C,

15

f) infekci sojového bobu organismem *Phytophthora megasperma* při teplotě od 20 do 24 °C,

g) infekci řezu bramboru organismem *Fusarium moniliforme* při teplotě od 20 do 24 °C,

h) infekci řezu bramboru organismem *Fusarium sambusinum* při teplotě od 20 do 24 °C a

i) infekci cukrové řepy organismem *Phoma* spp. při teplotě od 15 do 19 °C.

20

Takto lze izolovat potenciální biologicky účinné prostředky způsobem, který je určen jen pro získávání aktivních organismů z kořenů, jejich zkoušením v těchto dvou počátečních testech, kterými se identifikují organismy s vysokou potenciální aktivitou a ty se potom podrobí sériím přísných testů, kterými se identifikují prostředky, u kterých se pak při testování za nejrušnějších polních podmínek dokáže jejich vysoká účinnost. Toto představuje oproti tradičním způsobům, jak jsou uvedeny výše, značný pokrok, neboť tradičními způsoby by byly odmítnuty organismy, které prošly těmito dvěma testy, a naopak jimi prošla řada organismů, které se těmito dvěma testy ukázaly většinou jako neúčinné nebo méně účinné než kontrola.

25

30

Tímto způsobem byly izolovány čtyři mikroorganismy, které se ukázaly být obzvláště účinné proti různým plísňovým onemocněním, doprovázeným obvykle vadnutím.

Podstata vynálezu

35

Podstatou vynálezu je fungicidní prostředek, který se vyznačuje tím, že jako účinnou látku obsahuje mikroorganismus kmene *Pseudomonas fluorescens* ve směsi s nosičem přijatelným v zemědělské praxi.

40

Dále je podstatou vynálezu fungicidní prostředek, který se vyznačuje tím, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 186.

45

Dále je podstatou vynálezu fungicidní prostředek, který se vyznačuje tím, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 187.

50

Dále je podstatou vynálezu fungicidní prostředek, který se vyznačuje tím, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 188.

Dále je podstatou vynálezu fungicidní prostředek, který se vyznačuje tím, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 190.

5

Jako příklady typů použitelných zemědělských přípravků lze uvést směsi pro povlékání semen, kapaliny pro závlahy kořenů nebo půdy a granulované nebo práškové prostředky. Základní látky pro přípravu těchto přípravků jsou pracovníkům v oboru dostatečně známy.

- 10 Pro případ zkoušení účinnosti byla použita tradiční metoda *in vitro*, kterou bylo testováno asi 7000 organismů, a bylo zjištěno, že touto metodou "prošlo" asi 20 % organismů, zatímco způsobem dvou testů prošlo pouze 4 až 5 % organismů. Důležité je, že soubor organismů, které prošly každým z minimálně dvou testů, je velmi stejnoměrný, zatímco tradičním agarovým testem prošel zcela různorodý soubor organismů. Některé z organismů, které by třeba byly
- 15 odmítnuty tradiční vyhledávací metodou, vykazaly v následujících vyhledávacích testech a polních pokusech vysokou účinnost. Toto je základní výhoda způsobu používajícího dva testy: počátečním vyhledáváním se sníží celkový počet organismů, které vyžadují další testování a velká část těch, které byly vybrány pro další testování, vykazala potom požadovaný účinek při polních testech. Předpokládá se, že důvod tohoto je následující. Parametry testování, například
- 20 teplota a nutriční složení, jsou u tradiční metody optimalizovány, aby se podpořil růst mikroorganismu v agaru. Tato potrava je velmi rozdílná od skutečné potravy v drsném životním prostředí za podmínek, ve kterých se má mikroorganismus připravovat. Proto mnohé z mikroorganismů, které přežijí tyto počáteční testy, jsou obvykle slabé a jsou schopné pouze přežít v uzavřeném prostředí agarové kultury a následně selžou, protože přísnější druhé a další testy
- 25 jsou mnohem více přibližné skutečnému polnímu prostředí. Na druhé straně v souboru organismů existují, a zkušenosti autorů tohoto vynálezu to potvrzují, kmeny mikroorganismů, které dávají přednost polním podmínkám, například nízkým teplotám nebo potravě méně bohaté nebo různého složení. Tyto mikroorganismy nerostou dobře v agarovém testu a normálně by byly odmítnuty. Bylo však zjištěno, že dvojí testování zaručuje testovací podmínky bližší polním
- 30 podmínkám a poskytuje tak realističtější náznak schopnosti mikroorganismu prospívat v prostředí, ve kterém by měl být používán.

Vynález také popisuje způsob inhibice plísňového onemocnění rostlin, který spočívá v tom, že se na rostlinu, její semeno nebo na její růstové prostředí aplikuje účinné množství fungicidního prostředku podle vynálezu.

35

Dále vynález popisuje způsob ochrany sklizňových plodin před infekcí plísněmi, který spočívá v tom, že se na rostliny, jejich kořeny nebo semena nebo na půdu obklopující rostliny aplikuje fungicidně účinná dávka jednoho nebo více než jednoho mikroorganismu z uvedeného kmene *Pseudomonas fluorescens*.

40

Kmen NCIB 40 187 byl izolován z kořenů pšenice sebraných z rostlin rostoucích na poli při farmě známé jako "Badbury 2, Draycott Farm, Chiseldon, Swindon, Wiltshire, United Kingdom".

45

Kmeny NCIB 40 186 a 40 188 byly izolovány z půdy odebrané z pole známého jako "Stockoy Field v Jodoigne v Belgii".

Kmen NCIB 40 190 byl izolován z kořenů semenáčků pšenice z pole známého jako "Lower Garston Field, Rushall Farm, Newbury, United Kingdom".

50

Dále je uváděn popis izolace, charakteristiky a testování bakteriálních organismů na účinek proti některým plísním, které infikují sklizňové plodiny. Byl izolován velmi velký počet mikro-

organismů, identifikován a testován byl výše uvedeným způsobem, přičemž byly vybrány čtyři kmeny podle vynálezu, které v provedených testech vykazují vynikající účinek.

5 Příklady provedení vynálezu

Izolace mikroorganismů

10 Připraví se trubice z dialyzační trubice dlouhá 35 cm a široká 5,5 cm s uzávěrem 5 až 7 cm od jednoho konce. Jemný písek se promyje, vysuší a nasype se do trubice do hloubky 12 cm a zvlhčí se 20 ml destilované vody. Trubice s pískem se pro podepření uloží dovnitř skleněných zkumavek (7 cm v průměru a 30 cm dlouhých). Trubice se potom uzavřou u dna gumovou zátkou pokrytou hliníkovou fólií a navrchu zátkou z vaty a potom se zabalí do hliníkové fólie. Celá sestava se autoklávuje dvakrát při teplotě 121 °C po dobu 60 minut.

15 Vzorek půdy se odebere z určené strany půdy a dva dny po odebrání se udržuje před použitím při teplotě 4 °C na 40 % vlhkosti. Vzorek půdy se přesije sítem 4 mm a přidá se do trubice na povrch písku do hloubky 3 cm. Zasadí se semeno (hrách, pšenice, cukrová řepa, slunečnice, kukuřice nebo sója) a přikryje se půdou na celkovou hloubku 6 cm. Trubice se potom postaví kolmo do drátěného koše, který se umístí do plastického kontejneru s otvory, které umožňují výměnu vzduchu, přičemž tento kontejner minimalizuje ztráty z odpařování. Koše se potom umístí do růstové skříně a inkubují se čtyři týdny při teplotách 10 °C až 24 °C a 70 % relativní vlhkosti s cyklem 16 hodin den/8 hodin noc.

25 Po čtyřtýdenní inkubaci se plastické dialyzační trubice rozříznou předem sterilizovaným skalpelem. Z půdy a písku se vytrhají kořeny každé rostliny a rostlina se umístí na bílou plastickou misku. Vrcholové části rostliny se rozřežou a promyjí se odděleně ve sterilní vodě.

30 Rozřezané části se umístí do sterilních Erlenmeyerových baněk obsahujících 20 ml deionizované vody a vrstvu skleněných kuliček. Běhky se potom třepou v orbitálním inkubátoru při 120 otáčkách za minutu po dobu 30 minut. Za použití neředěného roztoku z kořenů a promývacích roztoků z kořenů a vrcholů rostlin z baněk se připraví zředění 1:9 ve sterilním Ringerově roztoku na zředění 10^{-3} . Alikvotní část 100 µl z každého roztoku se rozprostře na povrchy tří agarových médií majících následující složení:

35 1/10 trypton sojový agar

trypton sojový bujon	3,0 g
bakteriologický agar	17,5 g
deionizovaná voda	1000 ml

40 (prostředí se autoklávuje 15 minut při 121 °C)

agar s kořenovým extraktem	
čerstvé pšeničné kořínky	10 g
agar č. 3	17,5 g
deionizovaná voda	1000 ml

45 (čerstvé kořínky se naváží a smísí s malým množstvím deionizované vody v mixéru. Hustá suspenze se potom umístí do váčku ze čtyř vrstev hustého mušelínu a ten se potom suspenduje ve zbývajícím deionizované vodě ve dvoulitrové kádince a inkubuje se 4 dny při 20 °C. Mušelínový váček se potom odstraní a ke kořenovému extraktu se přidá agar. Prostředí se potom autoklávuje 50 15 minut při 121 °C).

agar s extraktem z půdy

vzorek půdy	10 g
agar č. 3	17,5 g
deionizovaná voda	1000 ml

5

(půda se naváží a umístí se do deionizované vody ve dvoulitrové kádince. Suspenze půdy se přikryje a inkubuje se 4 dny při 20 °C, načež se odsaje přes čtyřnásobnou vrstvu hustého mušelínu. Potom se přidá agar a prostředí se autoklávuje 15 minut při 121 °C).

- 10 Pro každé ředění jsou tři opakování. Agarové misky se inkubují při 12 °C až do 5 dnů, načež se spočte počet kolonií na každé misce a запиše se. Kde je to možné, vybere se miska, která obsahuje padesát nebo méně kolonií. Kde to není možné, udělá se na misce mřížka z padesáti průsečíků a vyberou se kolonie, které jsou na každém průsečíku nebo nejbližší k němu. Takto je selekce kolonií zcela náhodná.

15

Jednotlivé kolonie se stáhnou z misky použitím sterilního očka a kultivují se na Petriho miskách o průměru 5 cm obsahujících 1/10 trypton sojový agar (1/10 TSA). Misky se potom inkubují 5 dnů při 12 °C. Organismy se potom zkontrolují na čistotu. Kde byla smíšená kultura, organismus se naočkuje na šikmý 1/10 trypton sojový agar, aby se získaly jednotlivé kolonie.

- 20 Jedna kolonie se vybere a pěstuje se ve vedlejší kultuře na 1/10 trypton sojovém agaru. Sbírka kultur se skladuje při 4 °C.

Charakteristika mikroorganismů

- 25 Morfologie

Morfologické charakteristiky mikroorganismů jsou následující:

Morfologie buněk: gram-negativní tyčinkové bakterie

30

Morfologie kolonie:

NCIB 40 186: špinavě bílé, kulové pravidelné, neporušené, mírně konvexní, hladké, lesklé, poloprůhledné, průměr 1,5 až 2 mm

- 35 NCIB 40 187: špinavě bílé, kulové, pravidelné, neporušené, vypouklé, hladké, lesklé, poloprůhledné, průměr 1 mm

NCIB 40 188: špinavě bílé, kulové, pravidelné, neporušené, mírně konvexní, hladké, lesklé, poloprůhledné, průměr 1,5 až 2 mm

- 40 NCIB 40 190: špinavě bílé, kulové, pravidelné, neporušené, ploché, hladké, lesklé, poloprůhledné, průměr 1 mm.

Teplota růstu:

	všechny kmeny	37 °C +ve
		41 °C -ve
45		45 °C -ve
Fluorescence	všechny kmeny	+ve
Kataláza	všechny kmeny	+ve
Oxidáza	všechny kmeny	+ve
Fermentace v glukóze	všechny kmeny	-ve

50

Rychlý test (API)

	NCIB	40 186	40 187	40 188	40 190
5	redukce nitrátů	-	-	-	-
	produkce indolu	-	-	-	-
	kyselina z glukózy	-	-	-	-
	arginin dehydroláza	+	+	+	+
	ureáza	-	-	-	-
	hydrolýza eskulinu	-	-	-	-
10	hydrolýza želatiny	+	+	+	+
	beta-galaktosidáza	-	-	-	-
	asimilace glukózy	+	+	+	+
	asimilace arabinózy	+	+	+	+
	asimilace manózy	+	+	+	+
15	asimilace manitu	+	+	+	+
	asimilace N-acetyl glukózaminu	+	+	-	+
	asimilace maltózy	-	-	-	+
	asimilace glukonátu	+	+	+	+
	asimilace kaprinátu	+	+	+	+
20	asimilace adipátu	-	-	-	+
	asimilace malátu	+	+	+	+
	asimilace citrátu	+	+	+	+
	asimilace fenylacetátu	-	-	-	+
	cytochromoxidáza	+	+	+	+

25

Primární testování

Půdní test na Petriho miskách

- 30 Petriho misky (5 cm) se naplní 10 ml agaru s bramborovou dextrózou (PDA). Na tento agar se do středu umístí agarová zátka (5 mm) ze 7 dní staré kultury *Pythium ultimum* rostoucí při 20 °C. Misky se inkubují 5 dnů při 20 °C, během nichž se na misce vytvoří kolonie *P. ultimum*.

- 35 Půda "Minster Mendip" se autoklávuje 60 minut při 120 °C. Do této půdy se dají pšeničné klíčky (1 % hmotn./hmotn.) a dobře se promíchá. Přibližně 8 g půdy se umístí do každé Petriho misky a překryje se jí vzrostlé *Pythium*.

Testované bakterie rostou na 1/10 TSB nebo na 1/10 TSA deskách 48 hodin při 12 °C.

- 40 Na každou Petriho misku se aplikují 2 ml kultury: připraví se duplikátní misky.

- Zkoušení: 1/10 TSB samotný
metalaxyl (100 ppm)
testovaný organismus
45 1/10 TSB přidáný k půdě na agaru s bramborovou dextrózou nenačkovaný organismem *Pythium*

Misky se inkubují 4 dny při 10 °C.

Účinek vyjádřený ve stupnici od 0 do 3 se stanoví na základě úplné inhibice růstu plísně v půdě.

Test na plíseň bramborovou

Sterilní kotouč z filtračního papíru (průměr 9 cm) se důkladně zvlhčí vodou a umístí se na dno sterilní Petriho misky. Pro každý pokus se připraví dvě misky.

5

Kultury *Fusarium* (*Fusarium sambusinum*, *Fusarium culmorum* a *Fusarium moniliforme*) se nechají růst na agaru s bramborovou dextrózou 14 dnů při 20 °C na světle, čímž se vyprodukují konidie. Konidie se potom suspendují ve sterilním solném roztoku (0,85 %) a upraví se na 20 % transmitanci na spek trofotometru při 420 nm.

10

Polovina očka bakterie rostoucí na výživném agaru (Oxoid 24 hodin při 20 °C se suspenduje v 2,5 ml sterilního solného roztoku. Jako kontrola se připraví captan v koncentraci 2,0 g/l. Jako další kontrola se použije samotný solný roztok.

15

Suspenze kultury *Fusarium* (50 µl) se umístí do sterilní zkumavky mikrocentrifugy, jedna zkumavka pro každý pokus.

20

Do každé Petriho misky se umístí jeden plátek bramboru tenčí než 10 mm, do kterého se korkovrtem o průměru 10 mm vyříznou 4 otvory. Povrch bramborového plátku se sterilizuje ethanolem a vysuší se sterilním filtračním papírem. Plátky se užívají v průběhu 30 minut od řezání (nebo 60 minut, jestliže jsou uchovávány při 4 °C).

25

Do tří ze čtyř otvorů v bramborovém plátku se umístí 50 µl vzorek suspenze spor *Fusarium* (106 konidií na 1 ml). V jednom ze třech otvorů se smísí vzorek bakteriální suspenze (50 µl, přibližně 10⁸ buněk na 1 ml) se suspenzí *Fusarium*, do dalšího se přidá benomyl v množství 100 ppm a třetí otvor slouží jako nenaočkovaná kontrola.

Petriho misky se uzavrou víčky a inkubují se 3 dny při 20 °C.

30

Stupeň onemocnění tkáně se vyhodnotí stupnicí od 0 do 3.

Testování na *Phoma betae*

35

Z vnitřku bulvy cukrové řepy se vyříznou kousky o velikosti 2,5 × 2,5 × 1,5 mm a zvlhčí se asi 13 ml sterilní vody v plastické nádobě.

40

Povrch kousků cukrové řepy se zahrne vzorkem kultury *Phoma betae* se vzorkem předpokládaného fungicidního mikroorganismu nebo bez něho a kousky řepy se inkubují po dobu 3 týdnů.

Ke konci inkubační periody se vzorky řepy vyhodnotí na přítomnost hniloby.

Půdní testování s cukrovou řepou

45

Přírodní půda, která je známá tím, že způsobuje "vadnutí" cukrové řepy, se zvlhčí na vlhkost 45 %. Do půdy se zasijí semena neošetřené cukrové řepy a semena potažená testovanými bakteriemi. Vzorky se potom inkubují 10 dnů při 15 °C za 12 hodinového denního osvětlování. Fungicidní účinnost bakterií se vyhodnotí na bázi počtu vzešlých semenáčků ve srovnání s chemickým ošetřením tachigarenem/TMTD.

Druhé testování

Pro testování účinnosti vybraných mikroorganismů se použijí dva organismy: *Pythium ultimum* a *Rhizoctonia solani*.

5

Kultury *P. ultimum* a *R. solani* se pěstují na agarových deskách s bramborovou dextrózou po dobu 7 dnů při 20 °C.

10

Směs 200 g jemného křemenného písku, 5 g kukuřičné mouky, 4 g pšeničných klíčků Beemax a 40 ml vody se autoklávuje 20 minut při 120 °C, potom se umístí do baňky a inokuluje se čtvrtinou desky *Pythium*. Pro *Rhizoctonia* se použije tentýž substrát, ale bez kukuřičné mouky.

Baňky se inkubují 7 dnů při 20 °C.

15

Zřed'ovací série

Obsahy každé baňky s *Pythium ultimum* se smísí s jemným pískem na konečnou hmotnost 300 g.

20

Jedna baňka *Pythium* v 8 litrech hlinitopísčité půdy "Mendip Minster" = 2 normální (2N).

Tato půda se ředí čistou hlinitopísčitou půdou "Mendip" na další požadovaná zředění. Organismy se obvykle testují na *Pythium* při zředění N/8 a N/32 při 12 až 15 °C.

25

3/4 baňky inokula *Rhizoctonia solani* v 6 litrech hlinitopísčité půdy "Mendip Minster" = normální. Pro testování se používají koncentrace N/4 a N/16.

30

Pokus se provádí v květináčích o průměru 7,62 cm, přičemž květináče se naplní ze tří čtvrtin infikovanou půdou. Do každého květináče se zaseje 5 hrachů a překryjí se čistou půdou. Přidá se 35 ml vody nebo bakteriální suspenze jako zálivka pro každý květináč. Pro každé ošetření se připraví pět dvojic květináčů. Při testech biologicky účinných prostředků rostou bakterie 48 hodin při 20 °C v 1/10 TSB. Ke květináčům se přidá celá suspenze (35 ml). Jako kontroly slouží obvykle 1/10 TSB a chemický prostředek. U testů na *Rhizoctonia* se jako zálivka přidá pencycuron v koncentracích 10, 100 nebo 200 ppm a na *Pythium* se jako zálivka použije metalaxyl v koncentraci 100 ppm.

35

Rostliny se nechají růst u testu na *R. solani* 7 až 14 dnů při 20 až 25 °C a na *Pythium* 14 dnů při 12 až 15 °C. Vzházení rostlinek se monitoruje týdně. Rostliny se denně zalévají vodou. Zvláštní péče byla věnována tomu, aby byla půda během testů udržována vlhká, protože obě choroby mají sklon způsobovat uvadání rostlin.

40

Testování na *Phytophthora megasperma*

Kotouček z kultury *P. megasperma* o průměru 5 mm se umístí na misku o průměru 9 cm na médium V-8 na dobu 13 dnů při 25 °C. Médium V-8 má následující složení:

45

V-8 Campbellova šťáva	180 ml
CaCO ₃	2,7 g
destilovaná voda	720 ml
Difco agar	13,5 g

50

(Složky kromě agaru se smísí a prohřívají se 30 minut parou, přefiltrují se, pH se upraví na 7,2, přidá se agar a médium se sterilizuje 20 minut při 120 °C).

Vlhké proso (50 g + 20 ml destilované vody) se sterilizuje dvakrát 45 minut při 110 °C. Čtvrtina desky *P. megasperma* se položí dnem vzhůru na povrch prosa a inkubuje se ve tmě 28 dnů při 25 °C.

- 5 Proso infikované *P. megasperma* (o hmotnosti 22,5 g) se pečlivě v mixéru promísí se sterilizovanou půdou (1477,5 g) a vodou (112,5 g). Jako půda se použije směs 1:1:1 obj./obj. jemného křemenného písku, polní půdy o pH 7 a rašeliny, která byla sterilizována 1 hodinu při 100 °C.

- 10 Do Leonardových nádob se naváží 500 g infikovaného prosa a půdní směsi a nádoby se potom přikryjí plastickými uzávěry až do zpracovávání. Dno vodní nádržky Leonardových nádob se naplní 100 ml destilované vody.

- Na povrchu prosa a směsi půdy se vytvoří čtyři jamky pro rostliny a do každé se zasadí sojový bob (c. v. Azzurra) a překryje se okolní směsí.

- 15 Kultury testovaného organismu se připraví na deskách s živným agarem kultivovaných 24 hodin při 28 °C a v 250 ml NB baňkách (150 ml NB) kultivovaných 24 hodin při 28 °C. Vzorek 75 ml kultury se centrifuguje 5 minut při 8000 otáčkách za minutu při 20 °C. Supernatant se vyhodí, přidá se další 75 ml vzorek, centrifuguje se a supernatant se opět vyhodí. Usazenina zbylá ve zkumavce v centrifuze se opakovaně promývá 5 ml dávkami solného roztoku (9,2 g/l). Nakonec se usazenina disperguje do suspenze ve 150 ml solného roztoku.

Do každé Leonardovy nádoby se 60 ml stříkačkou injikuje 30 ml solné suspenze.

- 25 Pro srovnání s chemickými prostředky se do Leonardových nádob jako kontrola injikují 30 ml vzorky roztoku 285,5 g metalaxylu 35 % (obchodní značka APRON) v 500 ml destilované vody.

Také se nasadí neinfikované kontroly za použití vzorků neinfikovaného prosa a směsi půdy.

- 30 Semena se potom nechají růst ve skleníku při 20 °C za osvětlování 15 000 až 17 000 lux. Vyhodnocování se vyjadřuje v procentech vzcházení ve srovnání s chemickým ošetřením.

Test na *Fusarium culmorum*

- 35 Kultura *Fusarium culmorum* se pěstuje na agaru s bramborovou dextrózou 10 dnů při 20 °C, až se vytvoří konidie. Konidie se seberou a spočítají se na rozmezí koncentrací od 10⁴ do 10⁸ konidií na 1 ml. Ke 100 g pšeničných semen v nádobě se přidá 5 ml těchto konidií a nádoba se potom nechá přes noc rotovat při 10 °C.

- 40 Vzorek infikovaných semen se před setím umístí do směsi testovaných bakterií a jemného křemenného písku na 60 minut, čímž dojde k povlečení asi 10⁶ buněk na semeno. Druhý vzorek se ošetří benomylen (100 ppm) jakožto chemickou kontrolou.

- 45 Jedno sto semen se zasadí do rašelinového kompostu v sázecí misce do hloubky 2 cm. Kompost se zalije vodou na začátku pokusu, nechá se 2 týdny při 20 °C a zalije se opět pátý den po zasetí. Po tomto počátečním zalití kompostu za účelem vzklíčení semen se kompost nechá uschnout, aby se podpořil vývin choroby.

- 50 Sleduje se vzcházení semenáčků a vývin choroby. Příznaky choroby se hodnotí ve stupnici od nuly (žádné příznaky) do 4 (vážné onemocnění).

Výsledky

Asi 7000 bakteriálních půdních organismů se podrobí testování popsanému výše. Tabulka 1 (níže) sumarizuje výsledky těchto testů. Číslice ve sloupcích jsou ve stupnici od nuly (žádný fungicidní účinek) do 3 (žádné zjištěné příznaky choroby). V tabulce je také zahrnut srovnávací příklad typického neúčinného bakteriálního kmene označeného 53/87.

Tabulka 1

primární testy	NCIB	40186	40187	40188	40190	53/87
<i>Fusarium culmorum</i>		1	2	0	2	1
<i>Fusarium miniliforme</i>		1	1	0	1	1
<i>Fusarium sambusinum</i>		0	1	0	0	1
<i>Gythium ultimum</i>		2	3	2	2	0
<i>Aphanomyces</i>		3	1	0	2	0
<i>Phoma betae</i>		2	0	3	1	0
cukrová řepa/půda		3	2	2	3	0
sekundární testy	NCIB	40186	40187	40188	40190	53/87
<i>Rhizoctonia solani</i>		0	3	3	0	0
<i>Pythium ultimum</i> 15 °C		3	3	3	0	0
<i>Pythium ultimum</i> 24 °C		3	2	2	2	0
<i>Fusarium culmorum</i>		2	2	2	2	0
<i>P. megasperma</i>		2	1	1	1	0

Výsledky polních pokusů 1989

Kmeny, které byly nejslibnější v primárních a sekundárních testech byly vybrány pro polní pokusy jako biologické prostředky proti chorobě "padání klíčících rostlin" ("vadnutí") u hrachu a cukrové řepy.

Obr. 1 znázorňuje výsledky získané s kmenem NCIB 40 186 proti vadnutí hrachu. Tyto pokusy byly prováděny ve Velké Británii. Tímto kmenem bylo dosaženo ochrany okolo 80 % z ochrany dosažené chemickým ošetřením metalaxylem (obchodní značka APRON). Kmen NCIB 40 187 byl v tomto pokusu z velké části neúčinný. Na obr. 1 na ose x písmeno A znamená výsledek testu s přípravkem APRGN, písmeno B výsledek testu s mikroorganismem 40 186, písmeno C výsledek testu s mikroorganismem 40 187 a písmeno D znamená slepý pokus. Na ose y je vyneseno počet sazenic na řádek.

Obr. 2 a 3 znázorňují výsledky polních pokusů na cukrové řepě za použití kmenů NCIB 40 186 a 40 190. Tyto pokusy byly prováděny v Belgii. Bylo vybráno 6 míst na poli. Tři místa (1, 3 a 6) byla oseta cukrovou řepou v březnu a zbylá tři místa byla oseta v květnu. Obr. 2 uvádí výsledky při prvním vyhodnocování, které bylo prováděno 3 týdny po vysetí a obr. 3 uvádí výsledky po 6 až 8 týdnech po vysetí. Na obr. 2 a 3 značí písmeno A výsledek testu s přípravkem APRGN, písmeno B výsledek testu s mikroorganismem 40 186, písmeno C výsledek testu s mikroorganismem 40 190 a písmeno D znamená slepý pokus. Číslice 1 až 6 na ose x označují čísla vybraných míst na poli. Na obr. 2 na ose y je vyneseno vyhodnocení sazenic (50 % počet) a na obr. 3 na ose y je vyneseno vyhodnocení sazenic (100 % počet).

- Sumárně tyto výsledky ukazují, že vadnutí hrachu způsobené *Pythium ultimum* se aplikací kmene NCIB 40 186 sníží na hladinu srovnatelnou s hladinou dosaženou chemickým ošetřením metalaxylem. Výsledky u cukrové řepy ukazují na zlepšené vzcházení semenáčků při aplikaci kmenů NCIB 40 186 a 40 190 ve srovnání s neošetřenou kontrolou na všech 6 místech.
- 5 Vzcházení semenáčků na třech místech v přítomnosti uvedených kmenů je srovnatelné se vzcházením dosaženým při použití metalaxylu.

Výsledky polních pokusů 1990

- 10 Během polních pokusů v roce 1990 byly mikroorganismy NCIB 40 186 a 40 190 zkoušeny na jejich možnou inhibici *Pythium* spp.. Pokusy byly prováděny ve Spojených státech amerických, v Belgii a ve Francii a výsledky jsou uvedeny níže. Pro účely pokusů byly mikroorganismy aplikovány jako postřiky semen s následujícím vysušením v písku při pokusech v Evropě a jako gumovito-rašelinové přípravky ve Spojených státech amerických. Další pokusy probíhají
- 15 v ostatních částech světa, kde choroby "vadnutí" jsou endemické, například u zeleninových plodin v Malajsii. I když ještě nelze dodat výsledky pokusů z celého světa, prostě proto, že pokusy nejsou ještě kompletní a nelze je samozřejmě z důvodů sezónních omezení zemědělských postupů urychlit, lze přesto již nyní říci, že tyto určité mikroorganismy vykazují přinejmenším velkou schopnost být komerčními biologickými prostředky o ochraně rostlin. Další testování
- 20 ostatních výše uvedených mikroorganismů pokračuje v laboratoři a ve skleníku v souladu s normální praxí pro zjišťování účinnosti a bezpečnosti jak pro lidi, tak pro životní prostředí. Výsledky, které jsou v současné době k dispozici, potvrzují to, co bylo nalezeno dříve a co je již výše popsáno.
- 25 Kmeny NCIB 40 186 a 40 190 byly testovány proti vadnutí cukrové řepy při pokusech na 9 políčkách v Belgii a ve Francii. Během setí v časném jaru bylo počasí velmi teplé a suché, což způsobilo určité problémy s vývinem choroby vadnutí cukrové řepy. V každém testovaném políčku bylo vyseto celkově 200 semen. Výsledky z těchto 9 pokusů jsou následující.
- 30 Belgické a francouzské pokusy 1990

testovaná plodina: cukrová řepa
chemická kontrola: tachigaren/TMTD

		počet semen vzešlých ze 200 semen zasetých			
pokus č.		neošetřená kontrola	chemické ošetření	NCIB 40186	NCIB 40190
35	1	93	125	130 ^x	114
	2	118	141 ^x	124	127
	3	118	157 ^x	146 ^x	138 ^x
	4	107	139 ^x	131 ^x	122 ^x
	5	120	150 ^x	128	130
40	6	84	116 ^x	111 ^x	114 ^x
	7	135	153 ^x	143	138
	8	119	148 ^x	141	135
	9	134	155 ^x	144	144

x = LSD při 5 % pravděpodobnosti

45

Francouzské pokusy 1990

testovaná plodina: hrách
chemická kontrola: jak je uvedeno níže

Počet rostlin znamená střední počet rostlin, které vzešly na pruhu 5 m dlouhém 22 dnů po ošetření.

- 5 Sloupec 2 v tabulkách uvádí počet rostlin, které vzešly z 200 semen za 22 dnů po vysetí. Písmena za čísly znamenají statistickou významnost. Obecně při 5 % hladině pravděpodobnosti není žádný signifikantní rozdíl mezi hodnotami označenými stejnými písmeny.

Kontrolní ošetření

10

Testy byly prováděny v normální polní půdě bez jakýchkoliv přidaných patogenů.

ošetření	počet vzešlých
neošetřené semeno	172,58 AC
15 NCIB 40186 - 107 buněk na semeno	184,75 A
APRON - 30 g úč. látky/100 kg semen	171,50 AC
RIDOMIL 2E metalaxyl - zálivka do řádku	181,00 A
blank semeno 100 buněk/semeno	176,00 AC

20

Testy

Patogen (Pythium) se přidá v množství 200 g na metr řádku

ošetření	počet vzešlých
neošetřené semeno	111,25 I
25 NCIB 40186 - 107 buněk na semeno	144,75 DC
APRDN - 30 g úč. látky/100 kg semen	157,25 BCDF
RIDOMIL 2E metalaxyl - zálivka do řádku	164,25 AD
blank semeno 100 buněk/semeno	119,88 HI

30

Kalifornské (USA) pokusy 1990

testovaná plodina: hrách

testovaný patogen: Pythium v dávce 30 g na metr řádku

35

ošetření	% vzešlých
žádný přidaný patogen, žádné ošetření	93,13 AB
patogen + NCIB 40186 - 107 buněk/semeno	75,31 BCD
patogen + blank semeno - 100 buněk/semeno	51,56 EF
40 patogen + APRGN 30 g úč. látky/100 kg	92,81 AB

Mississippský (USA) pokus 1990

testovaná plodina: kukuřice

45

testovaný patogen: Fusarium (i) 10 g na metr řádku
(ii) 30 g na metr řádku

Vzcházení se počítá v % po 15 dnech po vyšetí

	ošetření	% vzešlých
	žádný přidaný patogen, žádné ošetření	65,833 C
5	žádný přidaný patogen, NCIB 40186 - 107 buněk/semeno	67,917 C
	žádný přidaný patogen, CAPTAN jako ošetření semene	69,583 BC
	patogen (i), žádné ošetření	51,250 D
	patogen (i) + NCIB 40186 - 107 buněk/semeno	80,000 AB
	patogen (ii), žádné ošetření	69,375 BC
10	patogen (ii) + NCIB 40186 - 107 buněk/semeno	82,708 A
	patogen (ii) + CAPTAN jako ošetření semene	63,958 C

15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Fungicidní prostředek, **vyznačující se tím**, že jako účinnou látku obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 186, 40 187, 40 188 nebo 40 190, ve směsi s nosičem přijatelným v zemědělské praxi.

2. Fungicidní prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 186.

3. Fungicidní prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 187.

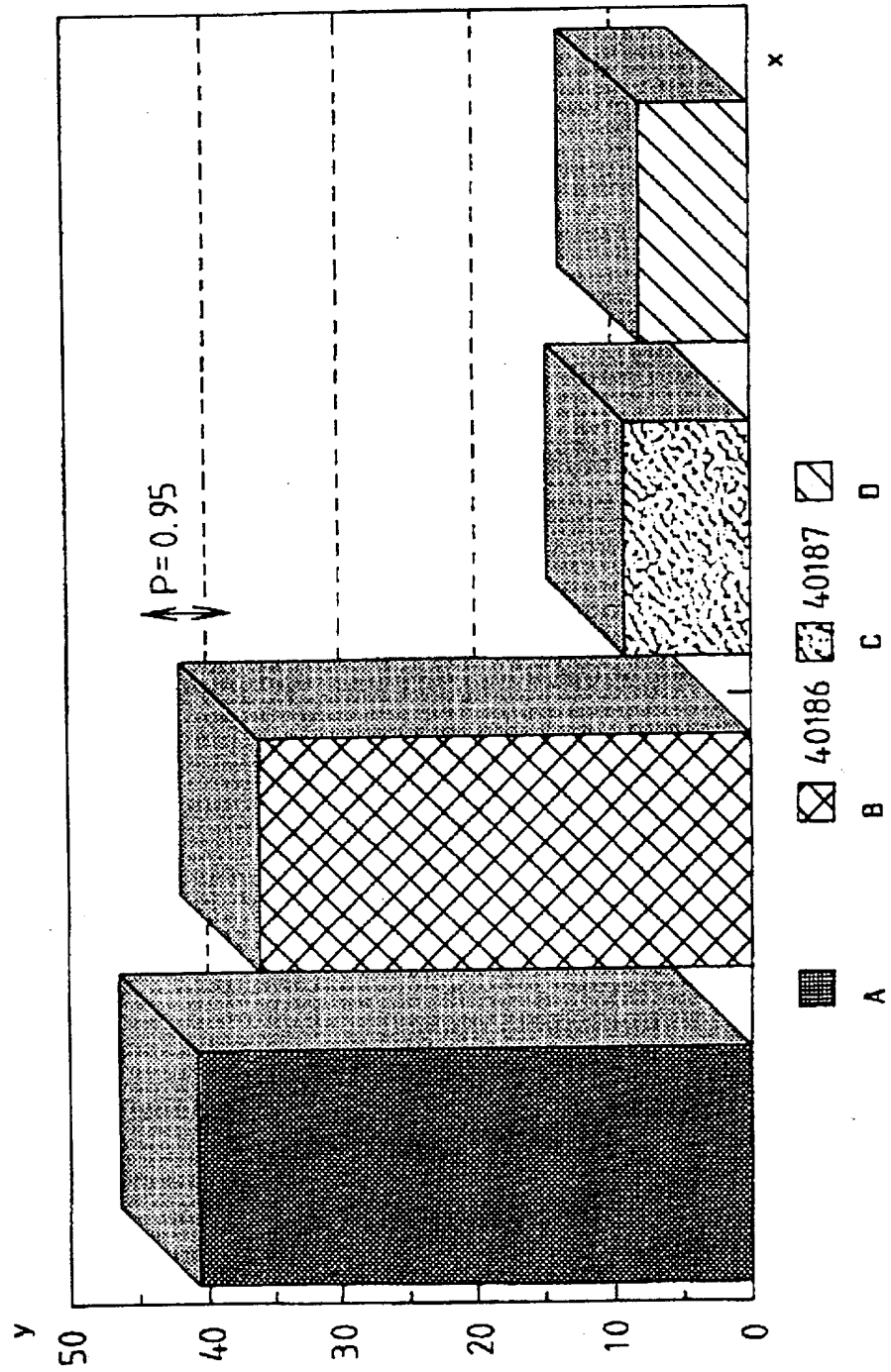
4. Fungicidní prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 188.

5. Fungicidní prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje mikroorganismus *Pseudomonas fluorescens*, jehož kultura byla uložena 1. 9. 1989 za podmínek Budapešťské dohody v "National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited", Aberdeeen, Velká Británie, pod číslem vkladu 40 190.

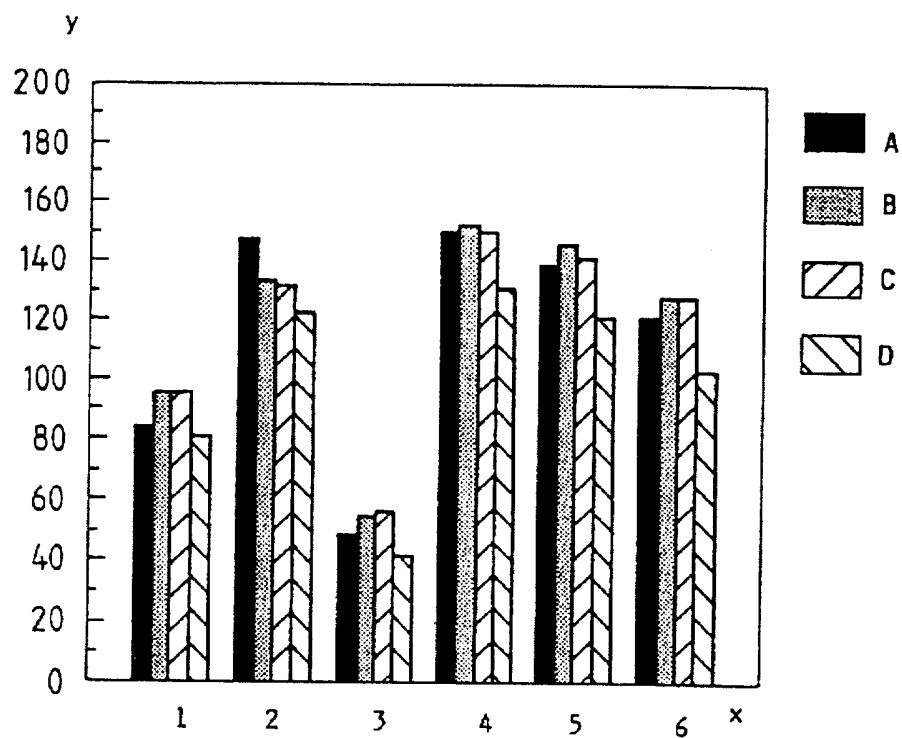
45

2 výkresy

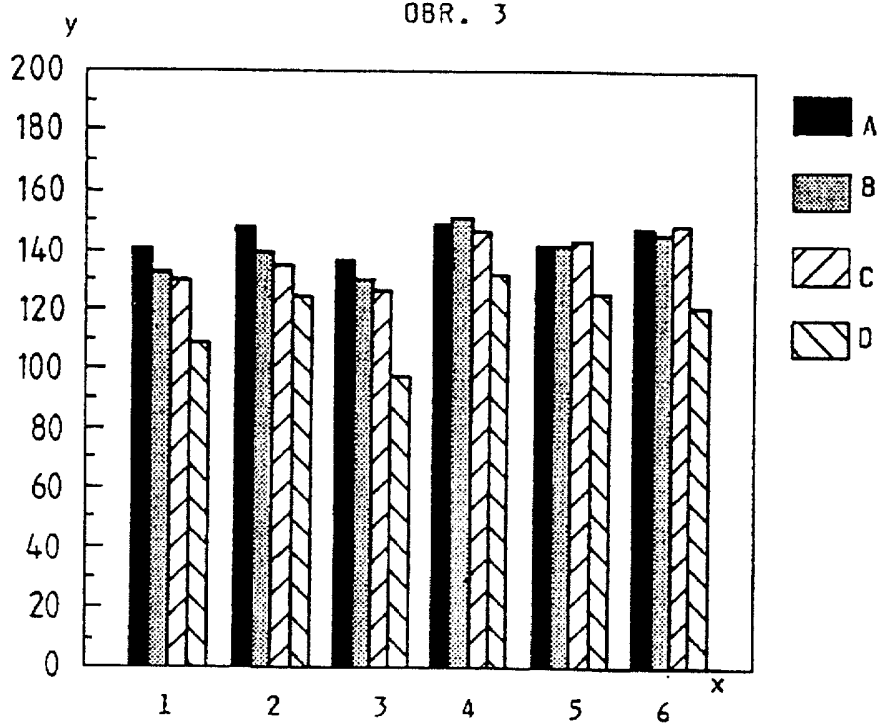
ORR. 1



OBR. 2



OBR. 3



Konec dokumentu
