

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 950

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/14 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-776**

(22) Přihlášeno: **08.12.2016**

(40) Zveřejněno: **04.10.2017**

(Věstník č. 40/2017)

(47) Uděleno: **23.08.2017**

(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **04.10.2017**

(Věstník č. 40/2017)

(56) Relevantní dokumenty:

CN 102 399 698; RU 2 070 875; CZ 292 347.

(73) Majitel patentu:

Botanický ústav AV ČR, v. v. i., Průhonice, CZ
RABBIT Trhový Štěpánov a.s., Trhový Štěpánov,
CZ

EcoFuel Laboratories s.r.o., Praha 9, Libeň, CZ
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, Dejvice, CZ
RABBIT CZ a.s., Trhový Štěpánov, CZ

(72) Původce:

Ing. RNDr. Libor Mrnka, Ph.D., Praha 4, CZ
Dr. Christoph S. Schmidt, Ph.D., Vestec, CZ
RNDr. Tomáš Frantík, CSc., Praha 8, CZ
doc. RNDr. Miroslav Vosátka, CSc., Kamenice, CZ
Ing. Zdeněk Jandejsek, CSc., Lohet, CZ
Ing. Tomáš Fulín, Divišov, CZ
Ing. Petr Kaštánek, Ph.D., Praha 2, CZ
Ing. Olga Kronusová, Praha 5, CZ
Ing. Petra Lovecká, Ph.D., Praha 6, CZ
prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc., Praha 5, CZ

(74) Zástupce:

INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název vynálezu:

**Směs endofytních hub pro zvýšení produkce
biomasy, způsob její přípravy a její použití**

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká směsi endofytních hub pro
zvýšení produkce biomasy, která obsahuje kmeny
Verticillium leptobactrum Gams CCM 8703, *Exophiala*
sp. CCM 8705 a *Halenospora/Zalerion* sp. CCM 8704.
Řešení se dále týká způsobu její přípravy a jejího použití
pro zvýšení produkce biomasy.

CZ 306950 B6

Směs endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy, způsob její přípravy a její použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká směsi endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy, způsobu její přípravy a jejího použití pro podporu produkce biomasy hostitelských rostlin zejména na marginálních a kontaminovaných půdách.

Dosavadní stav techniky

V rostlinných pletivech jsou často přítomné tzv. endofytní houby, které alespoň po část jejich životního cyklu nemají negativní vliv na rostlinného hostitele a nepůsobují u něho patogenní symptomy. Diversita a funkce těchto endofytů jsou předmětem intenzivního výzkumu mimo jiné pro jejich biotechnologický potenciál. Ten endofyty vykazují jednak z hlediska získávání nových bioaktivních látek a jednak pro potenciální agrotechnologické využití.

Pro podporu růstu hostitelských rostlin existuje několik mechanismů, například zvýšenou solubilizací málo rozpustných sloučenin fosforu, produkcí fytohormonů, zejména auxinového typu, a také produkcí sideroforů, které usnadňují výživu železem a jinými mikroživinami. Některé endofyty také syntetizují vitamíny a podílí se na regulaci průduchů, osmotického tlaku, modulaci kořenové architektury či úpravě dusíkového metabolismu. Dobře prostudované jsou efekty houbových endofytů z čeledi Clavicipitaceae (třída Sordariomycetes, kmen Ascomycota) na jejich hostitele, jimiž jsou většinou trávy mírného pásu. Tito systémoví endofyty zvyšují rezistenci svých hostitelů vůči biotickým i abiotickým stresům a podporují růst svých hostitelů. Některé jejich efekty jsou vázány na produkci alkaloidů či jiných sekundárních metabolitů, jimiž endofyty odpuzují herbivory a inhibují patogeny. Jiné efekty souvisí s komplexním působením endofytů na obranný systém rostlin nebo produkcí metabolitů podporujících růst rostlin. Přestože existují rody a druhy mikroorganismů, jejichž zástupci vykazují častěji prospěšné efekty vůči hostiteli, tyto efekty a jejich rozsah jsou vždy odvislé od daného genotypu (kmene/izolátu). Například endofyty z rodů *Neotyphodium* a *Epichloë* prokazují graminoidním hostitelům různou míru ochrany v závislosti na daném morfortypu/genotypu. Stejný endofyt tak může mít na různé hostitele pozitivní i negativní účinky. Meta-analýza efektů kořenových houbových endofytů ukázala, že pozitivní efekty jsou přítomné zejména u hostitelských rostlin totožných se zdrojovými rostlinami endofyta. Ačkoli z tohoto pravidla existují výjimky, optimální se jeví používat cílená (specificky designovaná) inokula pro daný hostitelský druh.

Na trhu je k dispozici řada komerčně významných travin v podobě osiva obsahujícího endofyty z čeledi Clavicipitaceae. Jedním z nejrozšířenějších v USA je kultivar kostřavy rákosovité Kentucky 31, který byl získán z vitálního travního porostu v r. 1931 a byl široce využíván při protierozních výsadbách a jako krmivářská plodina. Později se ukázalo, že způsobuje problémy dobytku kvůli obsahu ergotových (námelových) alkaloidů produkovaných endofyty, které zodpovídají za velkou část odolnosti tohoto kultivaru vůči různým stresům. Pro krmivářské účely byl tento kultivar nahrazen kultivarem Jesup obsahujícím MaxQ™ endofyty (kmeny *Neotyphodium coenophialum* AR502 a AR542), které neprodukují ergotové alkaloidy, ale podporují růst rostlin. Protože řada trav se využívá pro jiné než krmivářské účely (turfové druhy, okrasné druhy aj.), zůstává prostor i pro využití endofytů produkujících alkaloidy. Vedle endofytů z čeledi Clavicipitaceae se u travin uplatňují i další endofyty, zejména z oddělení vřeckovýtusých hub. U houby *Verticillium leptobactrum* Gams byla prokázána nematofágní účinnost potenciálně využitelná pro biologickou kontrolu rostlinných hádátek, avšak schopnost podpory růstu travin u této houby dosud nebyla publikována. Pokud jde o r. *Exophiala* sp., u kmene LHL08 izolovaného z kořenů okurky seté byla prokázána podpora růstu okurky seté za stresových podmínek a *Exophiala piscina* H93 zvýšila toleranci kukuřice k těžkým kovům a podpořila její růst.

- V současné době se s ohledem na celosvětovou podporu produkce energie z obnovitelných zdrojů prudce rozvíjí sektor cíleně pěstované rostlinné biomasy, zejména ligno–celulotických plodin, které jsou zdrojem tzv. biopaliv druhé generace. Využití rostlinné biomasy energetických plodin (např. rychle rostoucích topolů nebo ozdobnice) pro produkci obnovitelné energie však s sebou nese některé problémy. Jedním z nich je kompetice energetických plodin o ornou půdu s potravinovými komoditami. Přípravky na podporu rostlin na bázi symbiotických mikroorganismů jako jsou endofytní houby mají potenciál rozšířit oblast rentabilního pěstování energetických plodin i na nevyužitá území a omezit tak tuto kompetici. Marginální či kontaminovaná stanoviště bývají živinově nevyvážená a vyznačují se zvýšenou mírou stresu. Na těchto stanovištích mohou endofytní houby zmírnit důsledky stresu pro hostitelskou rostlinu a podpořit její růst. Použití endofytních hub může podobně jako v případě mykorhizních hub (jiné skupiny symbiotických mikroorganismů) snižovat potřebu minerálního hnojení a také použití pesticidů díky přímé a nepřímé ochraně vůči některým patogenům a herbivorům.
- Současná řešení (např. patenty US 8975489 B2, US 7232565 B2 a 9277751 B2) popisují využití některých endofytů pro podporu růstu a ochranu rostlin včetně různých druhů trav, ale nedokládají jejich využitelnost na marginálních a rizikovými prvky zatížených plochách.

20 Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká směsi tří endofytních hub z oddělení vřeckovýtusých hub (*Verticillium leptobactrum* Gams kmen MR67, *Exophiala* sp. kmen MR72 a *Halenospora/Zalerion* sp. kmen MR75) izolovaných z ozdobnice obrovské na živinově chudém stanovišti a jejich prorůstového efektu na rostliny, a to zejména, ale nikoli výhradně, z čeledi lipnicovitých (Poaceae). Předkládaný vynález popisuje využití unikátní směsi endofytních hub pro podporu růstu rostlin, zejména lipnicovitých a výhodně ozdobnice (r. *Miscanthus*).

Předmětem předkládaného vynálezu je směs endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy, která obsahuje kmeny *Verticillium leptobactrum* Gams kmen MR67, *Exophiala* sp. kmen MR72 a *Halenospora/Zalerion* sp. kmen MR75 (dále jen "směs podle předkládaného vynálezu"). Uvedené kmeny endofytních hub jsou uloženy ve sbírce kultur hub České sbírky mikroorganismů (CCM) vedené na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně dle Budapešťské smlouvy o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů k účelům patentového řízení pod čísly CCM 8703 (*Verticillium leptobactrum* Gams kmen MR67), CCM 8704 (*Halenospora/Zalerion* sp. kmen MR75) a CCM 8705 (*Exophiala* sp. kmen MR72).

Ve výhodném provedení jsou kmeny CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 ve směsi podle předkládaného vynálezu zastoupeny ve vzájemném stejném hmotnostním poměru.

Předmětem předkládaného vynálezu je rovněž způsob přípravy směsi endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy, který obsahuje následující kroky:

- a) jednotlivé kmeny CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 se pěstují odděleně na růstovém médiu v submerzní kultuře do dosažení požadovaného množství jednotlivých kultur, s výhodou za následujících podmínek: doba růstu dva až čtyři týdny, kontinuální míchání a aerace v nádobách s vnitřním členěním, jako jsou tzv. baffled flasks, při teplotě 20 až 26 °C, do dosažení požadovaného množství jednotlivých kultur, s výhodou do dosažení množství jednotlivých kultur alespoň 80 g/L;
- b) následně se z jednotlivých submerzních kultur kmenů hub odstraní růstové médium, s výhodou filtrací za sterilních podmínek;
- c) vláknitá mycelia jednotlivých submerzních kultur se smíchají, s výhodou v hmotnostním poměru 1 : 1 : 1;
- d) výsledná směs se následně resuspenduje, s výhodou v roztoku MgSO₄, Ringerově roztoku a/nebo fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl), nejvýhodněji v roztoku MgSO₄, s výhodou v pomě-

ru mycelia : roztoku 1 hmotnostní díl : 4 objemové díly, a desintegruje po dobu alespoň 30 minut za vzniku myceliální suspenze směsi endofytních hub, přičemž desintegrace se provede s výhodou pomocí sterilních čepelí a magnetického míchadla na magnetické míchače, průchody zužující se trubicí či intenzivním roztřepáváním.

5

V případě, že se použije roztok MgSO_4 , je jeho koncentrace s výhodou v rozmezí od 0,01 M do 1 M, výhodněji v rozmezí od 0,05 M do 0,15 M, nejvýhodněji je koncentrace MgSO_4 0,1 M.

Růstové médium je s výhodou vybrané ze skupiny obsahující sladový extrakt (malt extract, ME), bramborový extrakt s glukózou (potato–dextrose, PD), bramborovo–mrkvový extrakt (potato–carrot, PC), kukuřičný extrakt (corn meal, CM), nejvýhodněji je růstovým médiem sladový extrakt.

V jednom provedení se výsledná směs z kroku d) poté naředí na výslednou hustotu směsi (suspenze) v rozmezí od 1 do 100 g mycelia/L, s výhodou od 5 do 25 g mycelia /L, nejvýhodněji 15 g mycelia/L. S výhodou se k naředění použije roztok o téže složení a molaritě jako roztok, který byl použit pro resuspendování směsi v kroku d) předchozího odstavce.

V jiném provedení se směs endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy imobilizuje na inertní matici. Imobilizace se provede tak, že po kroku d) přípravy směsi endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy se desintegrovaná myceliální suspenze z kroku d) spolu s živinovým roztokem za sterilních podmínek smísí s inertní maticí, s výhodou v poměru 1 litr inertní matrice : 70 g desintegrované myceliální suspenze : 70 ml živinového roztoku, a tato směs se neprodyšně zataví v silnostěnném plastovém obalu. Živinovým roztokem je s výhodou sterilní suspenze bramborového těsta o hustotě 15 g/l. Imobilizované inokulum je skladováno v temnu a chladu, s výhodou při teplotě v rozmezí od 4 do 10 °C. Neprodyšně zatavená směs se skladuje v silnostěnném plastovém obalu až do jejího dalšího použití.

Inertní matrice je s výhodou vybraná ze skupiny zahrnující rašelinu, diatomit, kaolinit, bentonit, apatit, zeolit, perlit, piliny a jejich směsi, nejvýhodněji je inertní maticí rašelina.

30

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití směsi podle předkládaného vynálezu pro podporu produkce biomasy hostitelské rostliny. S výhodou lze zvýšení produkce biomasy využít při pěstování hostitelských rostlin na marginálních a kontaminovaných stanovištích, s výhodou kontaminovaných směsí rizikových prvků, nejvýhodněji pak As, Cd, Pb a Zn.

35

Předmětem předkládaného vynálezu je také způsob podpory růstu a produkce biomasy hostitelské rostliny s využitím směsi podle předkládaného vynálezu, zejména ve formě její myceliální suspenze, který obsahuje následující kroky:

a) kořenový systém hostitelské rostliny se namočí do myceliální suspenze směsi endofytních hub obsahující kmeny CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 na dobu 1 až 2 hodin, přičemž množství myceliální suspenze při hustotě v rozmezí od 1 do 100 g mycelia/litr potřebné na inokulaci 1 tisíce explantátových rostlin je v rozmezí 0,5 až 100 litrů, s výhodou 1 až 10 litrů, nejvýhodněji 4 litry;

b) následně se hostitelská rostlina vsadí do pěstebního substrátu, popřípadě se myceliální suspenze aplikuje do substrátu sazenice hostitelské rostliny v množství 0,5 až 50 ml/sazenici, s výhodou na kořeny a do vzdálenosti do 10 cm od kořenů sazenice, a sazenice se ponechá růst po dobu 4 až 8 týdnů ve skleníku;

c) poté se hostitelské rostliny otuží po dobu 3 až 7 dní ve venkovních podmínkách a přesadí se ze skleníku na konečné stanoviště. S výhodou se tento krok provede poté, co pomine nebezpečí jarních mrazíků.

50

Předmětem předkládaného vynálezu je také způsob podpory růstu a produkce biomasy hostitelské rostliny s využitím směsi podle předkládaného vynálezu, zejména ve formě imobilizované na inertní matici, který obsahuje následující kroky:

- a) na vlhký kořenový systém hostitelské rostliny se aplikuje směs endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy, obsahující kmeny CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704, imobilizovaná na inertní matrici (dále "imobilizované inokulum"), výhodně o hustotě 1 až 200 g/litr matrice, výhodněji o hustotě 70 g/litr matrice, přičemž množství inertní matrice potřebné na inokulaci 1 tisíce explantátových rostlin je v rozmezí 0,5 až 100 litrů, s výhodou 1 až 10 litrů, nejvýhodněji 5 litrů; přičemž aplikace se s výhodou provede překrytím vlhkého kořenového systému imobilizovaným inokulem, čímž dojde k ulpění částic inokula na kořenovém systému, a jeho lehkým sklepnutím; adherované imobilizované inokulum se na kořenech ponechá;
- b) následně se hostitelská rostlina s adherovaným imobilizovaným inokulem vsadí do pěstební substrátu, popřípadě se imobilizované inokulum aplikuje na substrát do sadební jamky sazenice hostitelské rostliny, výhodně v množství 5 ml inokula/sazenici, a sazenice se ponechá růst po dobu 4 až 8 týdnů ve skleníku;
- c) poté se hostitelské rostliny otuží po dobu 3 až 7 dní ve venkovních podmínkách a přesadí se ze skleníku na konečné stanoviště. S výhodou se tento krok provede poté, co pomine nebezpečí jarních mrazíků.

S výhodou se aplikace imobilizovaného inokula z kroku b) provede na kořeny a do vzdálenosti do 10 cm od kořenů sazenice hostitelské rostliny.

- S výhodou lze použít *in vitro* mikropropagované hostitelské rostliny, například rostliny ozdobnice obrovské, před jejich vysazením do substrátu.

Pěstební substrát je s výhodou vybrán ze skupiny živinově chudých substrátů na bázi rašeliny, písku, zeolitu, perlitu, kokosového vlákna, mapita, kamenné vlny a keramzitu nebo jejich směsí s kompostem, vermikompostem, zahradnickou zeminou, minerálními a organickými hnojivy, výhodněji je pěstebním substrátem směs rašeliny:písku:zeolitu v objemovém poměru 6:3:1. Skleníkové pěstování sazenic hostitelské rostliny se provádí za podmínek vhodných pro hostitelskou rostlinu, jako jsou pravidelná zálaha, teploty nad 12 °C a dostatečná intenzita osvětlení. Odborník v oboru by byl schopen určit vhodné pěstební podmínky hostitelských rostlin. Hostitelsky specifické endofytní houby se inokulují na *in vitro* mikropropagované rostliny, což vede ke zvýšení produkce biomasy v raném stádiu vývoje rostliny, které je klíčové pro její etablování na stanovišti, konkurenci vůči plevelům a založení rhizomů pro dobré přezimování. Získanou biomasu vzrostlých rostlin lze posléze konvertovat některým z dostupných procesů (přímé spalování, fermentace, pyrolýza) na energii nebo využít jiným způsobem adekvátním pro danou rostlinu.

Hostitelskou rostlinou jsou s výhodou rostliny čeledi lipnicovitých včetně obilnin, zejména ozdobnice (r. *Miscanthus*), chřastice (r. *Phalaris*), trst' (r. *Arundo*), psineček (r. *Agrostis*), ovsík (r. *Arrhenatherum*), kostrava (r. *Festuca*), sveřep (r. *Bromus*), kukuřice (r. *Zea*), ječmen (r. *Hordeum*), pšenice (r. *Triticum*), žito (r. *Secalé*), oves (r. *Avena*), proso (r. *Panicum*), rýže (r. *Oryza*), čirok (r. *Sorghum*), výhodněji je hostitelskou rostlinou ozdobnice (r. *Miscanthus*) a nejvýhodněji ozdobnice obrovská (*Miscanthus × giganteus*).

Objasnění výkresů

- Obr. 1. Vliv inokulace ozdobnice *Miscanthus × giganteus* různými kmeny endofytních hub (MRx a MLx) uspořádanými dle jejich taxonomické příslušnosti na produkci biomasy v květináčovém experimentu. Uvedené hodnoty představují průměr ± SEM pro biomasu kořenů, rhizomů (oddenků) a nadzemní listovou biomasu. * značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole na hladině $p < 0,05$; (*) značí statisticky významný rozdíl oproti kontrole na hladině $p < 0,08$; znaménka statistické významnosti jsou zobrazena v rostlinném pletivu, k němuž se vztahují, případně nad sloupcem, pokud jde o celkovou biomasu. Kmeny vybrané do inokulační směsi (MR 72, odpovídající CCM 8705; MR75 odpovídající CCM 8704 a MR 67 odpovídající CCM 8703) jsou označeny rámečkem.

Obr. 2. Směsný preparát endofytních hub CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 imobilizovaný na neutralizované jemně mleté rašelině. Bílé šipky ukazují světlé houbové hyfy kolonizující inertní rašelinnou matici. Uvedené měřítko znázorňuje 0,5 mm.

5 Obr. 3. Inokulované rostliny ozdobnice *Miscanthus × giganteus* cv. Illinois v sadební vaně po několika týdnech růstu.

Obr. 4. Spon vysazených rostlin ozdobnice *Miscanthus × giganteus*. Čtverec označuje experimentální blok (25 rostlin) o ploše 16 m², prázdnými kroužky jsou označeny rostliny, jejichž nadzemní biomasa byla na konci vegetační sezóny změřena a sklizena.

Obr. 5. Vliv inokulace ozdobnice *Miscanthus × giganteus* směsí endofytních hub CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 na její přežívání a růst na nekontaminované půdě (Střítež) po první sezóně. Hodnoty inokulované varianty (F) jsou vztaženy vůči kontrole (C) a uvedeny jako průměr v % ± SEM. * statisticky významný rozdíl proti kontrole na hladině p<0,05. Absolutní průměrné hodnoty pro kontrolní rostliny činily 80 % (přežívání), 80,5 cm (výška) a 34,1 g (hmotnost sušiny nadzemní biomasy).

Obr. 6. Vliv inokulace ozdobnice *Miscanthus × giganteus* směsí endofytních hub CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 na její přežívání a růst na ploše kontaminované rizikovými prvky (Nové Podlesí) po první sezóně. Hodnoty inokulované varianty (F) jsou vztaženy vůči kontrole (C) a uvedeny jako průměr v % ± SEM. * statisticky významný rozdíl proti kontrole na hladině p<0,05. Absolutní průměrné hodnoty pro kontrolní rostliny činily 78 % (přežívání), 31,3 cm (výška) a 0,9 g (hmotnost sušiny nadzemní biomasy).

25

Příklady uskutečnění vynálezu

30 Příklad 1: Izolace endofytních hub z ozdobnice

Izolace endofytních hub byla provedena na počátku září 2013 s pomocí modifikované "dilution-to-extinction" metody dle Unterseher & Schnittler (2009) a to z listů a kořenů ozdobnice obrovské *Miscanthus × giganteus* rostoucí na živinově chudé lokalitě v Bezděkově (půdní parametry pH 5,7; C_{organický} 0,6 %; N 0,16 %; výměnné koncentrace živin: P 47 mg/kg, Ca 1129 mg/kg, Mg 120 mg/kg, K 154 mg/kg). Listy a kořeny ozdobnice byly omyty kohoutkovou vodou, povrchově sterilizovány (5 % NaOCl odpovídající 2,2 % aktivního chloru), sterilizovaný rostlinný materiál poté homogenizován (Ultra-Turrax IKA-T10, stupeň 6, 1 min) ve sterilním 0,01M MgSO₄, zředěn a nanesen na 96-jamkové mikrotitrační destičky s agarovým médiem. Agarové médium bylo dvou typů, živinově chudé SNA a živinově bohaté MEA (2% sladový extrakt, 0,2% masový pepton). Do médií byla přidána antibiotika tetracyklin (100 mg/L), streptomycin sulfát (80 mg/L) a penicilin (60 mg/L), aby byl potlačen růst bakterií. Vyroslé kolonie hub byly přeneseny na Petriho misky s SNA a MEA médiem a na těchto médiích charakterizovány dle morfologických kritérií (barva, vzhled, densita mycelia, velikost kolonie, další charakteristické rysy, přítomnost vzdušného mycelia, sporulace). Celkem bylo získáno 121 endofytních kmenů, z toho 110 z kořenů a 11 z listů. Podle morfologických kritérií byly rozřazeny do tzv. morfoskupin a vybrání zástupci morfoskupin molekulárně identifikováni na základě sekvence ITS (rDNA). Sekvenování byli vždy 2 zástupci morfoskupiny a v případě, že se molekulární identita zástupců neshodovala, byli následně sekvenováni všichni zástupci dané morfoskupiny. Nejčastějším endofytem s 34 izolovanými kmeny byla houba *Fusarium oxysporum* (řád Hypocreales), následovaná izoláty rodů *Periconia* (řád Pleosporales), *Exophiala* (řád Chaetothyriales), *Microdochium* (řád Amphispheariales) a *Leptodontidium* (řád Helotiales). Mezi houby vyskytující se s nízkou frekvencí náležely izoláty rodů *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Ceratocystis*, *Leptospora* a *Mollisia* a další, včetně rodů u nichž jsou známi zástupci s patogenními vlastnostmi jako *Botrytis*, *Leptosphaeru-*

lina a *Peltaster*. Patogeny byly s výjimkou jednoho izolátu r. *Fusarium* z dalších testů vyloučeny. Pro testy v květináčovém experimentu bylo vybráno 1 až 5 zástupců každé skupiny.

5 Příklad 2: Pilotní květináčový test pro výběr vhodných kmenů endofytních hub

Vliv vybraných kmenů endofytních hub na růst ozdobnice jsme testovali v květináčovém experimentu, na jehož základě byly následně vybrány houby pro směsný inokulační preparát. Testováno bylo 35 kmenů houbových endofytů. Experiment byl proveden v živinově chudém γ -záření sterilizovaném substrátu (písek:půda:zeolit 60:30:10 [objemové podíly]; celkový N 0,09 %; výměnný P [Mehlich III] 46 mg/kg; pH 7,5). Výsledek experimentuje na Obr. 1. Do směsi byly vybrány tři taxonomicky odlišné houby ve stejném hmotnostním poměru, jak bylo uvedeno dříve, a sice *Verticillium leptobactrum* Gams kmen MR67 (CCM 8703), *Exophiala* sp. kmen MR72 (CCM 8705) a *Halenospora Zalerion* sp. kmen MR75 (CCM 8704), jejichž účinek na produkci biomasy (celkové biomasy, nebo daného rostlinného pletiva) byl signifikantní nebo se signifikanci blížil.

Identita kmenu CCM 8704, který byl mezi endofyty nejsilněji podporujícími růst ozdobnice, se ukázala být komplikovaná. ITS sekvence vykazovala 99% podobnost k izolátu *Halenospora* sp., který byl izolován z kořenů borovice (Stenstrom a kol. 2013), ovšem téměř identické environmentální sekvence izolované z kořenů kukuřice byly popsány jako "nekultivovaný *Zalerion*" (Moll a kol. 2016). *Halenospora* patří mezi Leotiomycetes (Helotiales) a není s houbami rodu *Zalerion* příbuzná, protože ty se řadí mezi Sordariomycetes (Lulworthiales). Jak ukázal Bills a kol. (1999), většina izolátů popsáných jako *Zalerion* nejsou s touto skupinou příbuzné, ale vykazují příbuznost k Leotiomycetes. Autoři navrhli užší definici rodu *Zalerion*, který by zahrnoval pouze druh *Zalerion maritima*. S ohledem na skutečnost, že ITS sekvence druhu *Zalerion maritima* nevykazují bližší podobnost k našemu kmenu CCM 8704, považujeme náš kmen spíše náležející k r. *Halenospora*, ale uvádíme i alternativní řazení k r. *Zalerion*, abychom vyjádřili jeho současný nevyjasněný taxonomický status.

Příklad 3: Inokulum imobilizované na neutralizované jemně mleté rašelině

Směsný preparát endofytních hub CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 dle Příkladu 1 imobilizovaný na neutralizované jemně mleté rašelině je znázorněn na Obr. 2. Imobilizace byla provedena tak, že homogenizovaná myceliální suspenze byla spolu s živinovým roztokem za sterilních podmínek smíchána s inertní maticí, v tomto případě jemně mletou neutralizovanou rašelinou v poměru 1 litr nosiče : 70 g mycelia : 70 ml živinového roztoku a tato směs zatavena neprodyšně v silnostěnném plastovém obalu až do použití a skladována v temnu a chladu (při teplotě od 4 do 10 °C). Živinovým roztokem byla sterilní suspenze bramborového těsta o hustotě 15 g/l. Jako inertní matici lze použít i jiný materiál, výhodně ze skupiny diatomit, kaolinit, bentonit, apatit, zeolit, perlit, piliny a jejich směsi.

45 Příklad 4: Podpora růstu ozdobnice na nekontaminovaném živinově chudém stanovišti

Maloparcelový pokus byl proveden v katastru obce Dolní Královice [629332]/Střítež (parcela č. 434/3) na ploše trvalého travního porostu. Změřené půdní parametry v profilu 0 až 30 cm byly následující: celkový N 0,2 %; organický C 1,2 %; výměnný P [Mehlich III] 49 až 246 mg/kg; výměnný K [Mehlich III] 170 až 342 mg/kg; pH 6,6. Příprava plochy spočívala v celoplošné aplikaci systémového herbicidu Round-up na bázi glyfosátů ve dvou opakováních v době nástupu vegetace. Následně byla provedena hluboká orba společně s uvláčením a urovnáním pozemku prostřednictvím běžné zemědělské techniky. Sazenice *Miscanthus × giganteus* cv. Illinois z explantátových kultur množených *in vitro* byly zakoupeny od firmy VitroGen Sp. j. (Bydgoszcz, Polsko). Inokulace byla provedena vzápětí po dodání sazenic ozdobnice (cca 8 až 15 cm rostliny)

s pomocí směsi endofytních hub podle předkládaného vynálezu. Jednotlivé kmeny hub CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 byly napěstovány samostatně a to v tekuté submerzní kultuře na standardním ME (malt extrakt) médiu (po dobu 2 až 3 týdnů). Mycélium vláknitých hub bylo přefiltrováno přes vhodné sterilní síto, zváženo a převedeno do sterilního 0,1M MgSO₄ spolu se sterilní čepelí a magnetickým míchadlem. Poté bylo mycelium dezintegrováno na magnetické míchačce (cca 30 min) s cílem vytvořit homogenní myceliální suspenzi. Ve vhodně naředěné myceliální suspenzi o hustotě 15 g/L byl kořenový systém sazenic ozdobnice máčen po dobu 1 hod. Zbytek myceliální suspenze byl aplikován na kořeny vysazovaných rostlin a sadební substrát do vzdálenosti 10 cm od kořenů vysazovaných sazenic. Protože v tomto konkrétním případě houby CCM 8705 a CCM 8704 nerostly dostatečně rychle a nenaprodukovaly dostatečné množství biomasy, byla inokulace provedena nejprve houbou CCM 8703 a zbylé dvě houby byly aplikovány o dva týdny později na odkrytý kořenový systém vysazených rostlin. Sazenice byly po inokulaci přesazeny do vanových sadbovačů (viz Obr. 3). Použit byl živinově chudší substrátový mix na bázi neutralizované rašeliny (rašelina:písek:zeolit v objemových poměrech 6:3:1). Rostliny byly předpěstovány ve skleníku po dobu cca 6 týdnů před vlastní výsadbou na modelovou plochu. Během této fáze byly rostliny 1x přihnojeny lignohumátovým listovým hnojivem (cca 6 %) v dávce dle doporučení výrobce.

Přesazení rostlin na modelovou plochu proběhla cca 6 týdnů po inokulaci. Před výsadbou byly rostliny ponechány 3 dny mimo skleník, aby došlo k jejich otužení. Rostliny byly na modelovou plochu vysazovány v blocích tak, aby došlo k eliminaci heterogenity stanoviště a byla možná statistická analýza přežívání a růstových parametrů. Spon činil na všech plochách 0,8 × 0,8 m a každý blok sestával z 25 rostlin (viz Obr. 4). Výsadba probíhala ručně s pomocí vodicích šňůr, na kterých byl vyznačen spon rostlin. Každá z experimentálních variant (kontrolní a inokulovaná) byla realizována ve 4 blocích.

Vzápětí po výsadbě byla provedena umělá zálaha v dávce odpovídající přibližně 9 mm srážek. Kvůli enormnímu období sucha v r. 2015 byla zálaha dvakrát opakována a to v polovině července a v srpnu. Kromě závlahy probíhaly také odplevelovací práce. Odplevelení bylo provedeno vyžínáním (2 zásahy za sezónu).

Měření mortality a biometrických parametrů spolu se sklizní nadzemní biomasy proběhlo v září, na konci první vegetační sezóny (cca po 5 měsících růstu). Z výsledků na Obr. 5 a v Tabulce 2 je patrné, že aplikace směsi endofytních hub signifikantně zvýšila produkci nadzemní biomasy (cca o 40 %), ale neovlivnila maximální dosaženou výšku a přežívání rostlin. Přežívání kontrolních rostlin činilo 80 %, dosažená výška 81 cm a výnos biomasy 34 g sušiny/vysazenou sazenici.

Příklad 5: Podpora růstu ozdobnice na stanovišti kontaminovaném těžkými kovy

Druhý maloparcelový pokus byl proveden na ploše kontaminované rizikovými prvky v katastru obce Podlesí nad Litavkou [723886] (parcela č. 1161/2). Podobně jako v Příkladu 4 byla plocha před konverzí na modelovou plantáž udržována jako trvalý travní porost. Změřené půdní parametry v profilu 0 až 50 cm jsou uvedeny v Tabulce 1. Příprava plochy, houbového inokula a sazenic ozdobnice byla totožná s procedurami uvedenými v Příkladu 4.

Tabulka 1. Půdní charakteristiky kontaminované plochy v Podlesí. Uvedeny jsou výměnné (Mehlich III) i celkové koncentrace prvků (mg/kg).

N	Cox	pH	pH	P		K		Zn		Cd		Pb	
[%]	[%]	H ₂ O	KCl	vým.	celk.	vým.	celk.	vým.	celk.	vým.	celk.	vým.	celk.
0,18	1,16	5,9	5,3	33,7	124,8	83,2	149,8	21,7	69,7	2,2	3,7	520,3	1054,2

Analogicky s Příkladem 4 proběhlo měření mortality a biometrických parametrů spolu se sklizní nadzemní biomasy v září, tj. přibližně po 5 měsících růstu. Z výsledků znázorněných na Obr. 6 a Tabulky 2 je zřejmé, že aplikace směsi endofytních hub signifikantně zvýšila produkci nadzemní biomasy (téměř na dvojnásobek biomasy kontrolních rostlin), ale neovlivnila maximální dosaženou výšku a přežívání rostlin. Z absolutních hodnot (v kontrolní variantě šlo přibližně o 1 gram sušiny/vysazovanou sazenici) je nicméně zřejmý velmi malý přírůst rostlin. Příklad 4 tak dokládá příznivé působení směsi hub na ozdobnici vystavenou abiotickému stresu v podobě kontaminace rizikových prvků, nikoli perspektivnost pěstování této energetické plodiny na daném typu stanoviště za srovnatelných půdně-klimatických podmínek.

Tabulka 2: Vliv inokulace ozdobnice *Miscanthus* × *giganteus* směsí endofytních hub CCM 8703, CCM 8705 a CCM 8704 na její přežívání a růst na nekontaminované (Střítež, Příklad 4) a kontaminované (Nové Podlesí, Příklad 5) půdě po první sezóně. Hodnoty inokulované varianty (F) jsou vztaženy vůči kontrole (C) a uvedeny jako průměr v % ± SEM. * statisticky významný rozdíl proti kontrole na hladině $p < 0,05$.

Lokalita	Varianta	přežívání	výška	nadzemní biomasa
Střítež	C	100,0±0,0	100,0±3,2	100,0±8,4
	F	108,0±9,0	103,8±2,7	142,5±16,3*
Nové Podlesí	C	100,0±0,0	100,0±4,6	100,0±12,7
	F	92,9±20,6	109,5±5,5	198,4±24,7*

Průmyslová využitelnost

Směs endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy obsahující kmeny *Verticillium lepto-bactrum* Gams kmen MR67, *Exophiala* sp. kmen MR72 a *Halenospora/Zalerion* sp. kmen MR75 zvyšuje výnos biomasy hostitelské rostliny na živinově chudší i těžkými kovy zatížené lokalitě a dává tak předpoklad dobrému přezimování a růstu rostlin v následujícím období. Předpokládaný sektor využití je pěstování rychle rostoucích trav, zejména pak ozdobnice r. *Miscanthus*, pro energetické účely. Použití směsi nezatěžuje životní prostředí cizorodými látkami a vybrané kmeny hub jsou nativní v ČR.

Seznam citované nepatentové literatury

Bills G, Platas G, Pelaez F, Masarekar P (1999) Reclassification of a pneumocandin-producing anamorph, *Glarea lozoyensis* gen. et sp. nov., previously identified as *Zalerion arboricola*. Mycological Research 103, 179–192

Moll J, Hoppe B, König S, Wubet T, Buscot F, Krüger D (2016) Spatial Distribution of Fungal Communities in an Arable Soil. PLoS ONE 11, E0148130

Stenstrom E, Ndobe NE, Jonsson M, Stenlid J, Menkis A (2013) Root-associated fungi of healthy-looking *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings in Swedish forest nurseries Scandinavian Journal of Forest Research 29: 12–21.

Unterseher M. a Schnittler M. (2009) Dilution-to-extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) – Different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. Mycological Research 113: 645–654

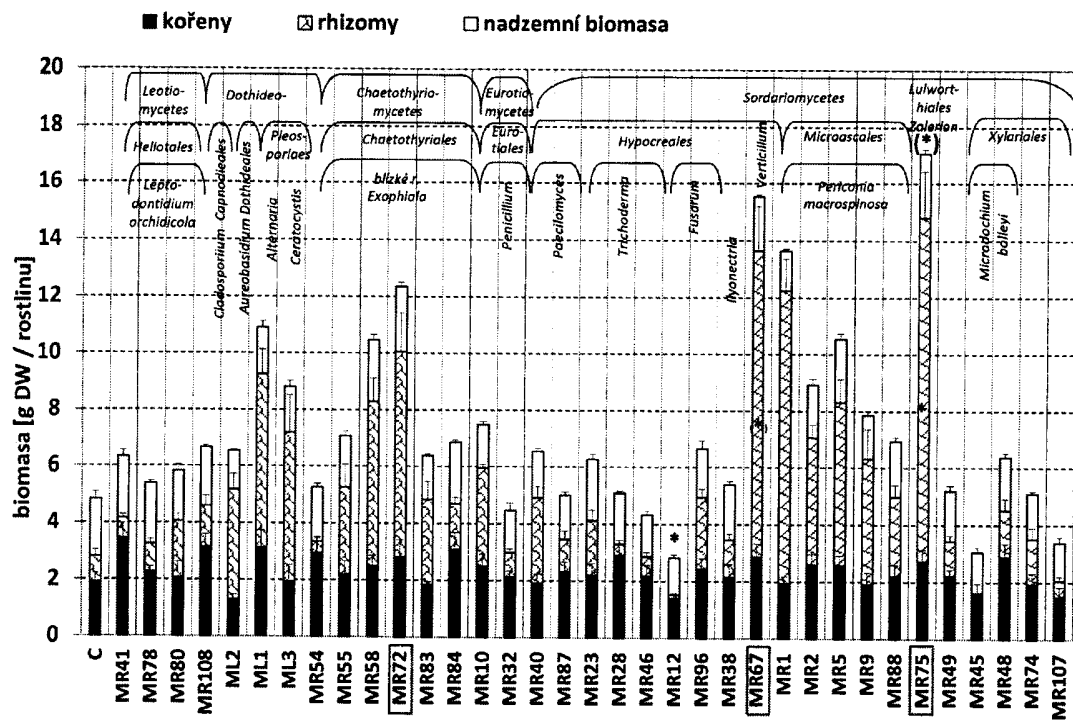
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Směs endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy hostitelských rostlin, **v y z n a č u - j í c í s e t í m**, že obsahuje kmeny *Verticillium leptobactrum* Gams CCM 8703, *Exophiala* sp. CCM 8705 a *Halenospora/Zalerion* sp. CCM 8704.
2. Směs podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že kmeny *Verticillium leptobactrum* Gams CCM 8703, *Exophiala* sp. CCM 8705 a *Halenospora/Zalerion* sp. CCM 8704 jsou zastou-
peny ve stejném hmotnostním poměru.
3. Způsob přípravy směsi endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje následující kroky:
 - 15 a) jednotlivé kmeny *Verticillium leptobactrum* Gams CCM 8703, *Exophiala* sp. CCM 8705 a *Halenospora/Zalerion* sp. CCM 8704 se pěstují odděleně na růstovém médiu v submerzní kultuře do dosažení požadovaného množství mycelia jednotlivých kultur;
 - b) následně se z jednotlivých kolonií kmenů hub odstraní růstové médium, s výhodou filtrací za sterilních podmínek;
 - 20 c) vláknitá mycelia jednotlivých submerzních kultur se smíchají, s výhodou ve stejném hmotnostním poměru;
 - d) výsledná směs se následně resuspenduje, s výhodou v roztoku $MgSO_4$, Ringerově roztoku a/nebo fyziologickém roztoku, nejvýhodněji v roztoku $MgSO_4$, a desintegruje po dobu alespoň 30 minut za vzniku homogenní myceliální suspenze směsi endofytních hub.
 - 25 4. Způsob podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se výsledná směs z kroku d) poté naředí na výslednou hustotu suspenze v rozmezí od 1 do 100 g mycelia/L.
 5. Způsob podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se po kroku d) desintegrovaná myceliální suspenze z kroku d) spolu s živinovým roztokem za sterilních podmínek smísí s inertní matricí a tato směs se neprodyšně zataví v silnostěnném plastovém obalu a skladuje v temnu a chladu až do jejího dalšího použití.
 - 30 6. Použití směsi podle nároku 1 nebo 2 pro podporu produkce biomasy hostitelské rostliny.
 - 35 7. Způsob podpory růstu a produkce biomasy hostitelské rostliny s využitím směsi podle nároku 1 nebo 2, zejména ve formě myceliální suspenze, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje následující kroky:
 - 40 a) kořenový systém hostitelské rostliny se namočí do myceliální suspenze směsi endofytních hub obsahující kmeny *Verticillium leptobactrum* Gams CCM 8703, *Exophiala* sp. CCM 8705 a *Halenospora/Zalerion* sp. CCM 8704 na dobu 1 až 2 hodin, přičemž množství myceliální suspenze při hustotě v rozmezí od 1 do 100 g mycelia/litr, potřebné na inokulaci 1 tisíce explantátových rostlin, je v rozmezí 0,5 až 100 litrů;
 - b) následně se hostitelská rostlina vsadí do pěstebního substrátu, popřípadě se myceliální suspenze aplikuje do substrátu sazenice hostitelské rostliny v množství 0,5 až 50 ml/sazenici, a sazenice se ponechá růst po dobu 4 až 8 týdnů ve skleníku;
 - 45 c) poté se hostitelské rostliny otuží po dobu 3 až 7 dní ve venkovních podmínkách a přesadí se ze skleníku na konečné stanoviště.
 - 50 8. Způsob podpory růstu a produkce biomasy hostitelské rostliny s využitím směsi podle nároku 1 nebo 2, zejména ve formě imobilizované na inertní matrici, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že obsahuje následující kroky:

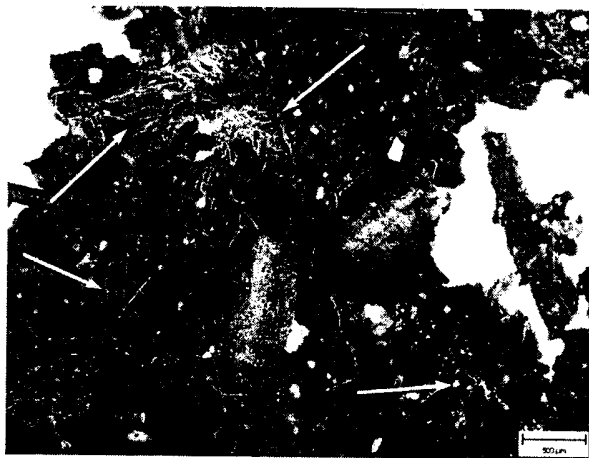
- 5 a) na vlhký kořenový systém hostitelské rostliny se aplikuje směs endofytních hub pro zvýšení produkce biomasy, obsahující kmeny *Verticillium leptobactrum* Gams CCM 8703, *Exophiala* sp. CCM 8705 a *Halenospora/Zalerion* sp. CCM 8704, imobilizovaná na inertní matrici, s výhodou o hustotě 1 až 200 g/litr matrice, přičemž množství inertní matrice potřebné na inokulaci 1 tisíce explantátových rostlin je v rozmezí 0,5 až 100 litrů;
- b) následně se hostitelská rostlina s přitisknutou inertní matricí vsadí do pěstebního substrátu, popřípadě se inertní matrice obsahující imobilizovanou směs endofytních hub podle vynálezu aplikuje do substrátu sazenice hostitelské rostliny, a sazenice se ponechá růst po dobu 4 až 8 týdnů ve skleníku;
- 10 c) poté se hostitelské rostliny otuží po dobu 3 až 7 dní ve venkovních podmínkách a přesadí se ze skleníku na konečné stanoviště.
- 15 **9.** Použití podle nároku 6 a/nebo způsob podle nároku 7 nebo 8, kde hostitelskou rostlinou je rostlina z čeledi lipnicovitých, s výhodou je hostitelskou rostlinou ozdobnice r. *Miscanthus*, nejvýhodněji ozdobnice obrovská *Miscanthus* × *giganteus*.

20

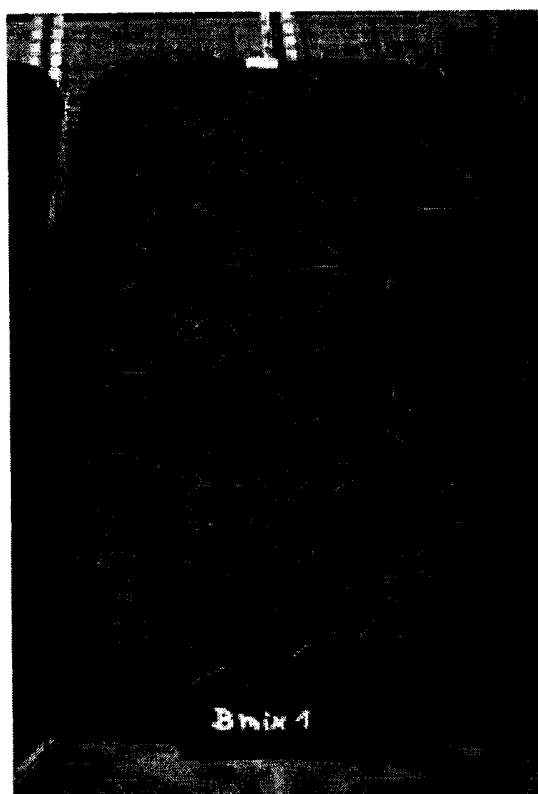
3 výkresy



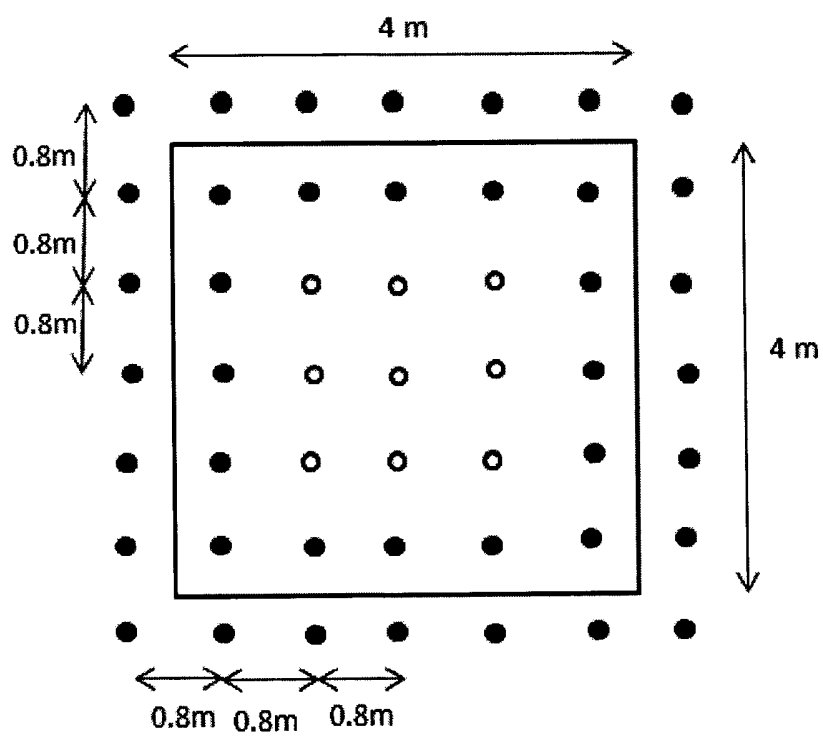
Obr. 1



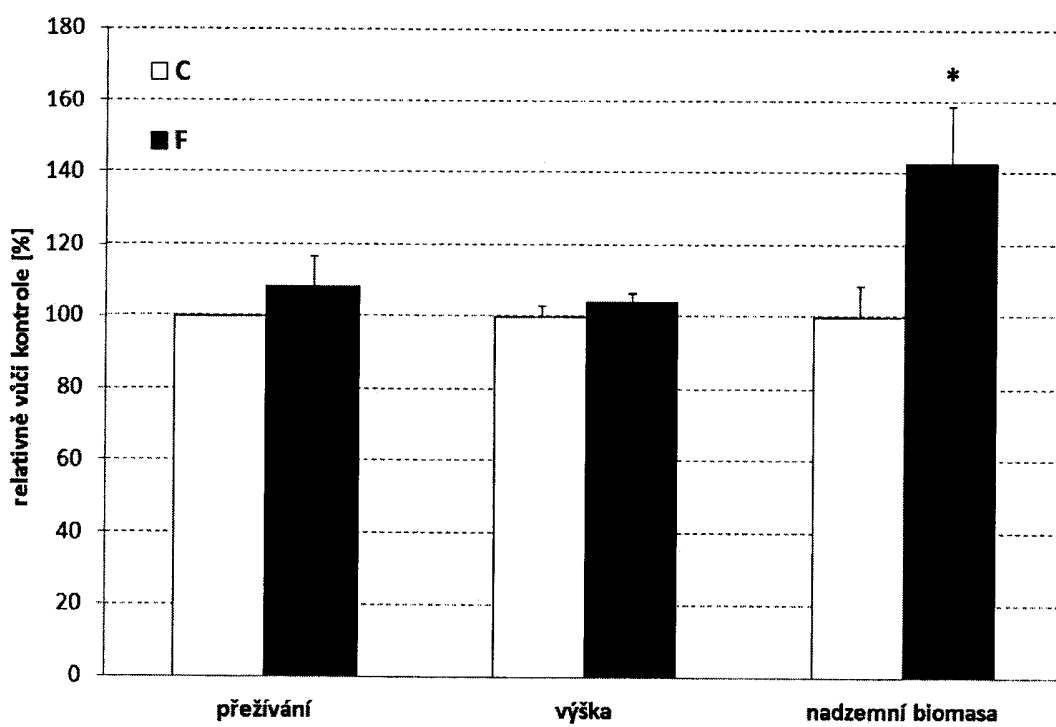
Obr. 2



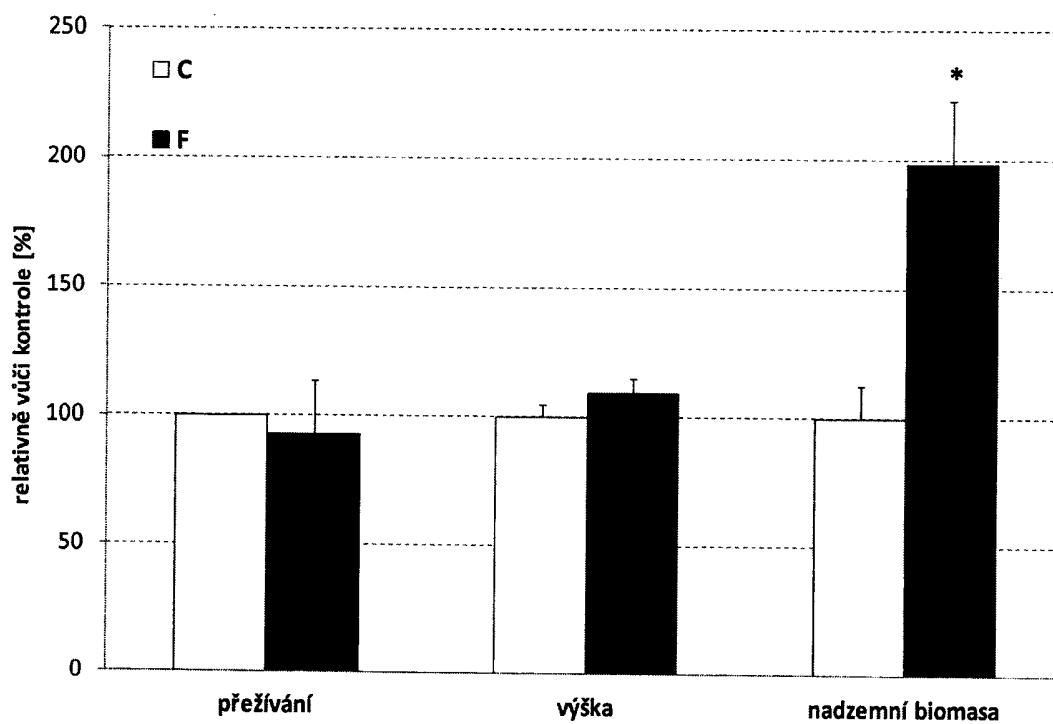
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6