

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 32 259

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A01N 63/04* (2006.01)  
*A01N 63/02* (2006.01)  
*A01N 25/02* (2006.01)  
*A01P 15/00* (2006.01)  
*C12R 1/79* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35411**  
(22) Přihlášeno: **27.09.2018**  
(47) Zapsáno: **29.10.2018**

- (73) Majitel:  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České  
Budějovice, České Budějovice 2, CZ
- (72) Původce:  
Ing. Rostislav Zemek, CSc., Staré Hodějovice, CZ  
Ing. Jiří Nermut, Ph.D., České Budějovice 2, CZ  
Ing. Jana Konopická, Veselí nad Lužnicí, Veselí  
nad Lužnicí I, CZ  
Ing. Andrea Bohatá, Ph.D., Plzeň, Skvrňany, CZ
- (74) Zástupce:  
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova tř.  
1847/5, 370 01 České Budějovice, České  
Budějovice 3

- (54) Název užitného vzoru:  
**Insekticidní a akaricidní aditivum do  
nosného substrátu pro pěstování rostlin**

CZ 32259 U1

## Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin

### Oblast techniky

5

Technické řešení se týká insekticidního a akaricidního aditiva do půdního nosného substrátu.

### Dosavadní stav techniky

10

Ochrana většiny kulturních plodin a ovocných a okrasných dřevin před živočišnými škůdci spočívá především v aplikaci pesticidů postřikem nadzemních částí rostlin. Životní cyklus řady hmyzích škůdců je však vázán na půdní prostředí, kde škodí na kořenech, jako jsou např. larvy smutnic, kovaříků či lalokonosců, nebo do půdy zalézají za účelem kuklení či přezimování, jako jsou např. třásněnky, mandelinka bramborová či makadlovka *Tuta absoluta*. Aplikace chemických insekticidů a akaricidů, tedy pesticidů určených k hubení hmyzu a roztočů, přímo do půdy není žádoucí z důvodů rizika kontaminace spodních vod a kumulace reziduí v půdě. Hmyzí škůdce vyskytující se v půdě však lze úspěšně potlačit pomocí jejich přirozených antagonistů, tj. entomopatogenních hub a entomopatogenních hlístic. Obě skupiny organismů se běžně vyskytují v přirozeném půdním prostředí, ne vždy jsou však dostatečně účinné, ať již z důvodu nízké patogenicity daného kmene, nebo nízké koncentraci infekčních částic v půdě. Většina komerčně vyráběných pěstebních substrátů tyto organismy běžně neobsahuje a nechrání tak pěstované rostliny před škůdci.

15

20

25

Technické řešení podle CZ 31982 popisuje pěstební substrát s insekticidními a akaricidními účinky obsahující entomopatogenní houbu z rodu *Isaria*. Nevýhodou uvedeného řešení je zejména skutečnost, že entomopatogenní houby nejsou dostatečně virulentní proti všem škůdcům vyskytujícím se v půdě a pěstebních substrátech, nepůsobí např. na zástupce řádu dvoukřídlí. Vysokou účinnost na larvy dvoukřídlého hmyzu i další hmyzí škůdce vykazují entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis*. Entomopatogenní hlístice jsou na trhu jako samostatné přípravky na ochranu rostlin určené pro aplikaci pomocí závlivky. Nevýhodou těchto přípravků je omezená doba jejich přežívání v půdách a substrátech bez vhodného hmyzího hostitele, a tudíž je nelze použít preventivně.

30

35

Úkolem technického řešení je proto vytvoření insekticidního a akaricidního aditiva do půdního nosného substrátu, které by odstraňovalo výše uvedené nedostatky, obohacovalo půdu, pěstební substrát či kompost o užitečné mikroorganismy a makroorganismy a zlepšovalo tak jejich biologickou aktivitu, redukovalo výskyt širokého spektra půdních škůdců a mělo pozitivní vliv na fyzikální vlastnosti půdy, jako je provzdušnění, a v konečném důsledku zlepšovalo výnosové parametry pěstovaných plodin a kvalitu produkce s minimálním dopadem na životní prostředí.

40

### Podstata technického řešení

45

Vytčený úkol je vyřešen pomocí insekticidního a akaricidního aditiva do nosného půdního substrátu pro pěstování rostlin podle tohoto technického řešení. Podstata technického řešení spočívá v tom, že aditivum je tvořeno směsí alespoň jednoho kmene entomopatogenní houby rodu *Isaria* (synonymum *Paecilomyces*) v koncentraci v rozmezí  $10^5$  až  $10^7$  infekčních částic na 1 ml nosného substrátu a alespoň jednoho kmene entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* v rozmezí  $10^2$  až  $10^4$  infekčních částic na 1 ml nosného substrátu.

50

Infekční částice entomopatogenní houby jsou ve formě spor nebo ve formě fragmentů mycelia. Entomopatogenní hlístice je ve formě invazních larev. Ve výhodném provedení je kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) CCM 8367, kmen entomopatogenní hlístice je *Steinernema feltiae* NFUST a nosič je pěstební substrát, čistá

55

rašelina nebo písek. V dalším výhodném provedení jsou obě složky, tj. entomopatogenní houba a entomopatogenní hlístice odděleny a mísí se až před aplikací.

Výhody půdního insekticidního a akaricidního aditiva na bázi entomopatogenních hub a hlístic podle tohoto technického řešení spočívají zejména v tom, že obohacuje půdu nebo pěstební substrát o užitečné mikroorganismy a makroorganismy a využívá jejich synergického účinku. Kombinováním výše zmíněných dvou bioagens se dosahuje rozšíření účinnosti na více druhů hmyzích škůdců a škodlivých roztočů vyskytujících se v půdě. Výhodou entomopatogenní hlístice je její rychlé působení a schopnost najít škůdce i na vzdálenost několika centimetrů, přičemž během svého pohybu přispívají k lepšímu provzdušnění půdy a rozšíření spor druhého bioagens. Výhodou entomopatogenní houby je schopnost růst saprofytický na organické hmotě, kolonizovat půdu či pěstební substrát a působit tak po delší období po aplikaci. Výše uvedené půdní insekticidní a akaricidní aditivum zlepšuje biologickou aktivitu půdy či substrátu a ve výsledku má pozitivní vliv na výnosové parametry pěstovaných plodin a kvalitu produkce s minimálním dopadem na životní prostředí.

Kmen českého původu CCM 8367 entomopatogenní houby *I. fumosorosea* je uložený ve Sbírce mikroorganismů v Brně jako patentová kultura. Insekticidní a akaricidní účinky tohoto kmene byly prokázány již dříve. Infektivní částice houby lze získat stacionární neboli povrchovou kultivací na pevném příp. tekutém médiu nebo submerzní kultivací.

Ve výhodném provedení je entomopatogenní houba kultivována ve fermentorech za použití vhodného tekutého média, např. na bázi glukózy, maltózy, škrobu a peptonu. Krátkodobě lze houbu skladovat v podobě zamrazených blastospor. Pro dlouhodobé uchování je vhodné použít konidiospory, které se nejprve lyofilizují a poté uloží v kapalném dusíku při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo v hlubokomrazícím boxu při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . K adjustaci do inertního nosného substrátu lze ve výhodném provedení použít techniku rozprašování suspenze infektivních částic entomopatogenní houby ve vhodném mísícím zařízení.

Kmen hlístice *Steinernema feltiae* NFUST pocházející z Izhevsk z Ruska, je uložen ve sbírce entomopatogenních hlístic Biologického centra AV ČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Druhá identita byla potvrzena morfologicky i sekvenováním ITS oblasti rDNA (Genbank přístupové číslo: KT809344). Invazní larvy entomopatogenní hlístice lze získat chovem hlístic na hmyzím hostiteli, kterým je poslední larvální instar housenky zavíječe voskového, *Galleria mellonella*, nebo průmyslově *in-vitro* kultivací ve fermentorech. Množení hlístic se provádí nákazou housenek zavíječe voskového na vlhkém filtračním papíru v Petriho misce v dávce cca 50 až 100 invazních larev na jednu housenku zavíječe. Po uhynutí housenek jsou tyto přemístěny na vodní pasti (White Trap), přibližně za 7 dní se z mrtvých hostitelů začnou uvolňovat nové invazní larvy, které zůstávají uvězněny v nízkém vodním sloupci, odkud jsou tyto slévány a čištěny opakovanou sedimentací ve vodě. Vyčištěné invazní larvy je pak možné použít pro přímou aplikaci nebo skladování. Celý proces množení se odehrává při pokojové teplotě cca  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dlouhodobě lze entomopatogenní hlístice skladovat ve stádiu invazních larev při teplotě kolem  $5$  až  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  v nízkém vodním sloupci, vlhkém písku či vermikulitu nebo v molitanové drti.

45

#### Objasnění výkresů

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujících vyobrazeních, kde:

50 obr. 1 znázorňuje graf závislosti mortality škůdců na typu ošetření,

obr. 2 znázorňuje graf závislosti perzistence *Steinernema feltiae* na podmínkách a době skladování,

55 obr. 3 znázorňuje graf vlivu ošetření na líhnutí škůdců z pěstebního substrátu.

Příklad uskutečnění technického řešení

## 5 Příklad 1

Suspenze infekčních částic entomopatogenní houby *I. fumosorosea* CCM 8367 byla připravena z blastospor, které byly získány submerzní kultivací. Do 95 ml sterilního tekutého kultivačního média na bázi PDB v 250 ml Erlenmeyerově baňce bylo naočkováno 5 ml houbové suspenze. Inkubace probíhala na orbitální třepačce při rychlosti 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C po dobu čtyř dnů. Po inkubaci byla konečná suspenze filtrována přes sterilní gázu, aby se oddělilo mycelium a shluky spor. Koncentrace blastospor v suspenzi byla počítána pomocí Neubauerovy komůrky a následně byla upravena na požadovanou koncentraci. Do suspenze bylo přidáno smáčecí činidlo Tween 80® v koncentraci 0,02 % (v/v). Test klíčivosti prokázal 100% klíčivost blastospor. Invazní larvy *S. feltiae* NFUST byly získány z infikovaných housenek zavíječe voskového pomocí tzv. vodních pastí. Koncentrace invazních larev ve vodní suspenzi byla ustavena na 2 000 invazních larev na 1 ml vody.

Připravenými suspenzemi obou bioagens byl ošetřen komerční pěstební substrát na bázi rašeliny nasycený do plastových kelímků v množství 180 ml substrátu na kelímek. Byla použita dávka 10<sup>8</sup> blastospor houby a 1 000 invazních larev hlístic na jeden kelímek. Paralelně byly založeny varianty, ve kterých byl substrát ošetřen pouze *I. fumosorosea*, *S. feltiae* nebo sterilní vodou se smáčedlem představující kontrolu. Do každého kelímku byla následně umístěna jedna larva posledního instaru mandelinky bramborové, *Leptinotarsa decemlineata*. Kelímky byly zakryty fólií a umístěny do inkubátoru s konstantní teplotou 25 °C a následně denně kontrolovány pro stanovení počtu vylíhlých dospělců. Současná aplikace obou bioagens se ukázala jako nejúčinnější, jak je patrné z následující tabulky a obrázku 1. Po ukončení pokusu bylo z 50 larev v substrátu nalezeno 11 mumifikovaných s mykózou *I. fumosorosea*, 28 jedinců bylo rozloženo v důsledku parazitace *S. feltiae* a 3 jedinci byli mrtví bez symptomů mykózy či parazitace. Na obr. 1 je tedy znázorněno porovnání účinnosti ošetření nosného substrátu entomopatogenní houbou *I. fumosorosea* CCM 8367 v kombinaci s parazitickou hlísticí *S. feltiae* NFUST oproti variantě ošetřenou pouze jedním bioagens či oproti kontrole, v níž byla aplikována pouze voda se smáčedlem Tween 80®. Chybové úsečky u sloupců znázorňují 95 % konfidenční limity.

Ošetření	Počet larev	Počet vylíhlých imág
kontrola	120	112
<i>Isaria fumosorosea</i>	80	45
<i>Steinernema feltiae</i>	40	22
<i>Isaria fumosorosea</i> + <i>Steinernema feltiae</i>	50	8

35

## Příklad 2

Suspenze entomopatogenní houby a entomopatogenní hlístice podle příkladu 1 byly formulovány do inertních nosičů, kterým byla v případě *I. fumosorosea* rašelina a v případě *S. feltiae* písek frakce 0,8 mm. Dávkování bylo zvoleno tak, aby koncentrace houby byla 2×10<sup>6</sup> blastospor na 1 ml rašeliny a koncentrace hlístic byla 1 500 invazních larev na 1 ml suchého písku. Invazní larvy hlístic byly do písku přidány v objemu 1 ml vody a následně byl písek ještě zvlhčen dalšími 9 ml vody (celkem tedy 10 ml vody, 67 ml písku a 100 000 invazních larev hlístic). Takto připravené formulace obou bioagens tvoří dvě složky insekticidního a akaricidního aditiva do nosného substrátu pro pěstování rostlin. Bylo vyrobeno několik dávek, které byly samostatně zabaleny do uzavíratelných polyethylenových (PE) sáčků a umístěny do termostatu.

50 Ihned po aplikaci *I. fumosorosea* do rašeliny a poté po měsíci skladování v PE sáčcích o rozměrech 15×20 cm při 9 °C byly z každého sáčku odebrány tři vzorky o objemu 25 ml, tyto byly eluovány ve 100 ml sterilní vody s přidávkem smáčedla Tween 80® v 250 ml

Erlenmayerově baňce. Vzorke byly umístěny na orbitální třepačce po dobu 20 minut, 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C. Jeden mililitr výluhu byl potom zředěn v 9 ml sterilní vody se smáčedlem Tween 80<sup>®</sup>, 0,5 ml suspenze bylo přeneseno pipetou a rovnoměrně rozetřeno po povrchu selektivního růstového média s látkou Dodine. Petriho misky byly následně inkubovány po dobu jednoho týdne při 25 °C. Po tomto období byl stanoven počet kolonií *I. fumosorosea* na misce. Následující tabulka ukazuje, že koncentrace infekčních částic (CFU) v rašelině ( $\bar{x} = 1,98 \times 10^6 / 1 \text{ ml}$ ) odpovídala vypočtené koncentraci blastospor entomopatogenní houby při výrobě insekticidního a akaricidního aditiva. Z tabulky je dále patrné, že během skladování po dobu jednoho měsíce došlo k mírnému navýšení CFU ( $\bar{x} = 2,52 \times 10^6 / 1 \text{ ml}$ ).

Čas od výroby	Průměrná koncentrace infekčních částic <i>Isaria fumosorosea</i> v 1 ml rašeliny				
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
0	$2,11 \times 10^6$	$1,91 \times 10^6$	$2,01 \times 10^6$	$1,91 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6$
1 měsíc	$2,57 \times 10^6$	$2,48 \times 10^6$	$2,58 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$	$2,49 \times 10^6$

Písek s invazními larvami *S. feltiae* byl skladován při teplotách 5, 16 a 20 °C v uzavřených sáčcích (7×10 cm) a při stejných teplotách ve ventilovaných sáčcích (do stěny sáčku byly propíchnuty dva malé otvory pro volný přístup vzduchu) stejné velikosti. V intervalu 7 dní byl odebrán z každé teploty 1 sáček uzavřený a jeden ventilovaný a pomocí Baermannových nálevek byly invazní larvy extrahovány, aby mohl být stanoven jejich počet ve výluhu. Na sítko Baermanovy nálevky byla z prostorových důvodů umístěna vždy 1/10 důkladně promíchaného objemu sáčku. Počet entomopatogenních hlístic byl stanoven počítáním jedinců pod binokulární lupou. Tito jedinci byli zároveň mechanicky podrážděni, abychom ověřili, že se jedná o živé aktivní jedince. Z obrázku 2 je patrné, že entomopatogenní hlístice v daném nosném substrátu přežívají ve všech teplotách po dobu nejméně 5 týdnů, ačkoliv dochází k mírnému poklesu jejich koncentrace v závislosti na čase a teplotě skladování. Nižší počty jedinců, než by odpovídalo 1/10 objemu přípravku (tj. 10 000 larev) jsou pravděpodobně způsobeny (zvláště v prvních týdnech) přirozenými vlastnostmi entomopatogenních hlístic, jejichž cca 1/3 invazních larev zůstává neaktivní a nemůže tak být Baermanovou nálevkou zachycena. Tyto larvy jsou nicméně živé a v přítomnosti hostitelů schopné infekce. Z obrázku vyplývá, že tuto složku insekticidního a akaricidního aditiva je nejvhodnější skladovat v uzavřeném obalu při teplotě 5 nebo 16 °C, kde přežívá po 5 týdnech největší počet jedinců. Tyto výsledky zároveň jasně naznačují schopnost hlístic přetrvat za daných podmínek po dobu delší než testovanou.

### Příklad 3

Insekticidní a akaricidní aditivum na bázi entomopatogenní houby *I. fumosorosea* a entomopatogenní hlístice *S. feltiae* podle příkladu 2 bylo aplikováno do směsi dvou komerčně dostupných pěstebních substrátů: bio substrátu s guanem bez rašeliny a substrátu pro rajčata, papriky a okurky, které byly smíchány v poměru 1:1. Oba substráty byly již zamořeny larvami smutnic. Touto směsí substrátů byly do 2/3 naplněny plastové kelímky o objemu 200 ml. Poté bylo u ošetřené varianty přidáno insekticidní a akaricidní aditivum v dávce 10 ml rašeliny inokulované entomopatogenní houbou a 3 g vlhkého písku s *S. feltiae* na jeden kelímek. Insekticidní a akaricidní aditivum bylo lehce zapraveno do nosného substrátu a zavlaženo 10 ml vody. Kontrolní varianta byla pouze zavlažena 10 ml vody.

Kelímky byly poté uzavřeny průhledným plastovým víčkem, jehož spodní strana byla natřena lepem na hmyz a kelímky byly umístěny do klimatizovaného boxu s teplotou 21 °C a fotoperiodou 16L:8D. Po třech, pěti a devíti týdnech od založení pokusu byli spočítáni vylíhlí dospělci smutnic. Z obrázku 3 je patrné, že ošetření pěstebního substrátu aditivem má dlouhodobý účinek. Zatímco v neošetřené kontrole se v průměru vylíhlo celkem 8,55 smutnic na jeden kelímek, v ošetřené variantě jich bylo pouze 2,00. V průběhu pokusu tak došlo k redukci

škůdce o 77 %.

### Průmyslová využitelnost

5

Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin podle tohoto technického řešení lze použít zejména při pěstování pokojových i venkovních květin a bylin pěstovaných v květináčích, truhlících či na záhonech, k ochraně skleníkových kultur, zejména zeleniny a ovocných a okrasných keřů a stromů a dalších plodin. Je určeno pro aplikaci do půdy, k obohacení pěstebních substrátů a kompostů a k moření osiva a sadby. Uplatnění najde zejména u drobných pěstitelů a v ekologickém a bio-dynamickém zemědělství.

10

### NÁROKY NA OCHRANU

15

**1.** Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin na bázi půdy, pěstebního substrátu nebo kompostu, **vyznačující se tím**, že je tvořeno směsí alespoň jednoho kmene entomopatogenní houby rodu *Isaria* v koncentraci v rozmezí  $10^5$  až  $10^7$  infekčních částic na 1 ml nosného substrátu a alespoň jednoho kmene entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* v rozmezí  $10^2$  až  $10^4$  infekčních částic na 1 ml nosného substrátu.

20

**2.** Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kmen entomopatogenní houby je *Isaria fumosorosea* CCM 8367.

25

**3.** Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kmen entomopatogenní hlístice je *Steinernema feltiae* NFUST.

**4.** Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice kmene entomopatogenní houby jsou ve formě spor.

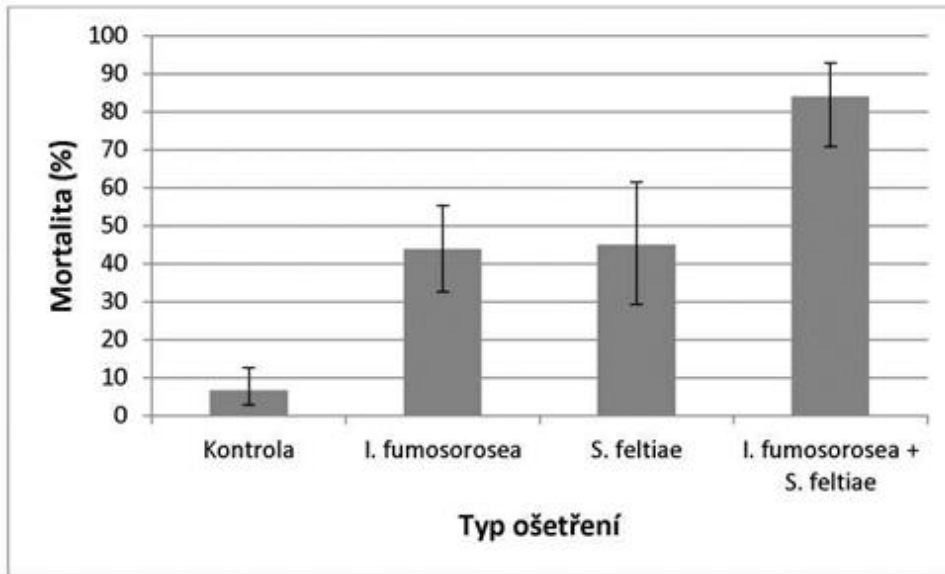
30

**5.** Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice kmene entomopatogenní houby jsou ve formě fragmentů mycelia.

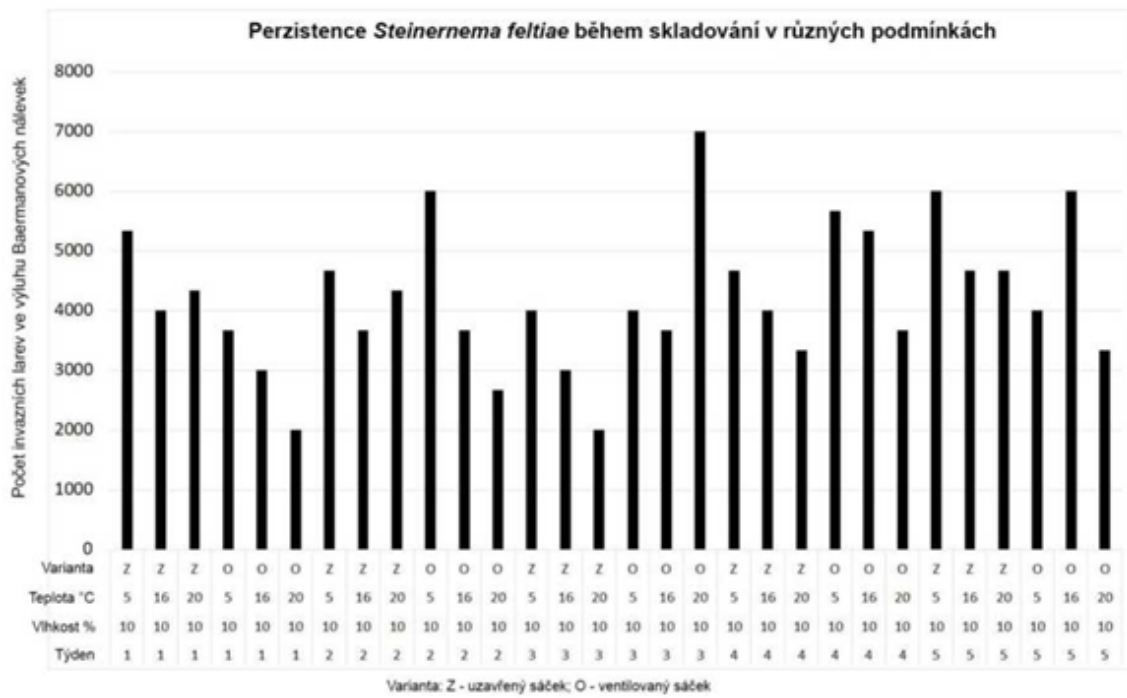
**6.** Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1 nebo 3, **vyznačující se tím**, že infekční částice kmene entomopatogenní hlístice jsou ve stádiu invazních larev.

35

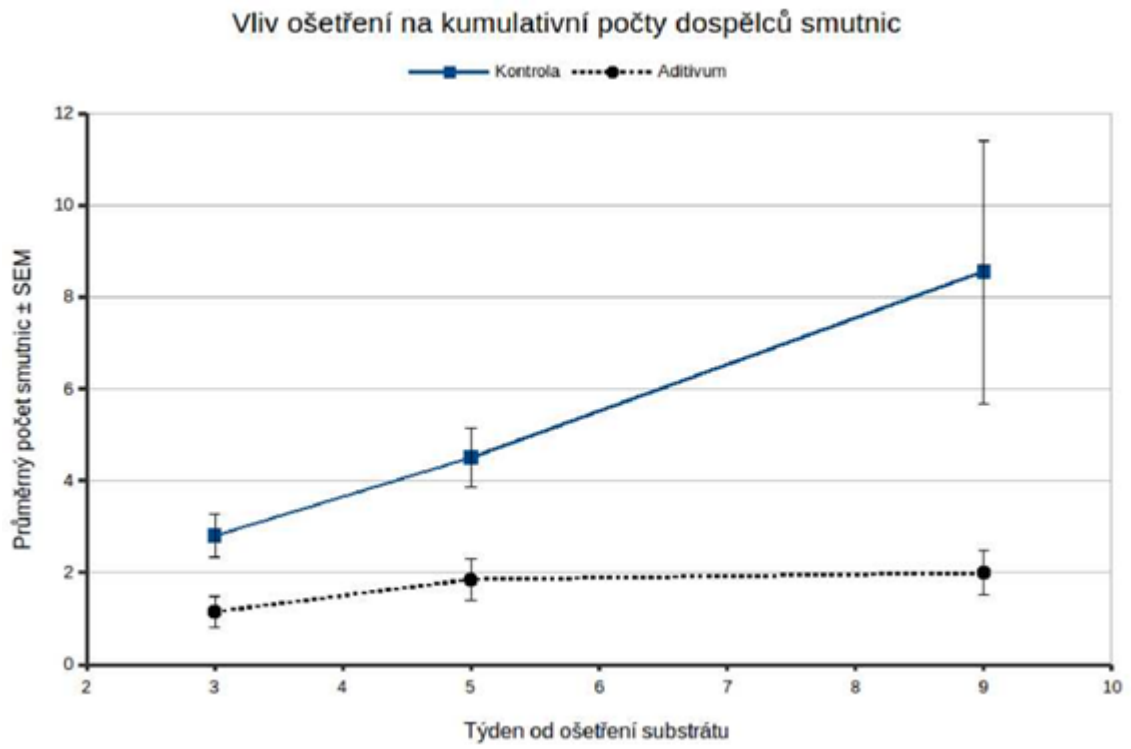
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3