

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 982

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)

A01N 25/08 (2006.01)

A01P 15/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35195**
(22) Přihlášeno: **23.07.2018**
(47) Zapsáno: **14.08.2018**

(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. 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 užitého vzoru:
**Pěstební substrát s insekticidními a
akaricidními vlastnostmi**

CZ 31982 U1

Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi.

Dosavadní stav techniky

10

Produkce pěstebních substrátů v Evropě představuje odvětví s obratem ve výši 1,3 miliardy eur. Obecně se požadavky na vlastnosti pěstebních substrátů liší, nicméně lze říci, že jsou vyžadovány tyto vlastnosti, jako je ukotvení rostliny, tedy musí být schopen udržet rostlinu, dobře zabezpečit výživu rostliny, dobrá propustnost a nasákavost vodou, vhodné pH požadované druhem rostliny a pěstební substrát by neměl obsahovat toxické látky a škůdce.

15

Pěstební substráty jsou většinou založeny na organických složkách, které zahrnují rašelinu, kokosové vlákno, dřevěné vlákno, kůru či kompost. Kompost je organický prostředek pro zlepšení pěstebních substrátů obsahující stabilizované organické látky a rostlinné živiny získané řízeným biologickým rozkladem směsi sestávající zejména z rostlinných zbytků a mající deklarované kvalitativní znaky. Rašelina je nahromaděný, částečně rozložený rostlinný materiál, který obsahuje převážně organické látky a organické kyseliny. Pro dodání přijatelných živin při přípravě čistých rašelinových pěstebních substrátů se používají minerální živiny ve formě hnojiv obsahujících dusík, fosfor a draslík. Rašelina navíc představuje dominantní pěstební médium používané v Evropě. Důvody použití samotné rašeliny nebo jejího použití jako hlavní součást pěstebních médií lze nalézt v její dostupnosti v severní Evropě, relativně nízkých nákladech, vynikajících chemických, biologických a fyzikálních vlastnostech a nízké hmotnosti.

20

25

Kultivované rostliny jsou často napadány hmyzími škůdci, přičemž více než 90 % těchto škůdců tráví část svého životního cyklu v půdě, tedy v pěstebním substrátu. Substrát, ve kterém se rostliny pěstují, proto hraje důležitou roli při jejich ochraně vůči hmyzím škůdcům. V běžném půdním prostředí se vyskytují entomopatogenní houby zajišťující přirozenou regulaci škůdců. Entomopatogenní houby mohou napadat a parazitovat na všech vývojových stádiích hmyzu, nejčastěji se však vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu. Komerčně vyráběné pěstební substráty tyto houby běžně neobsahují a nemají tak insekticidní vlastnosti tedy nejsou určené k hubení hmyzu v jeho různých vývojových stupních ani akaricidní vlastnosti tedy nejsou určené k hubení roztočů. Ochranu rostlin je pak nutné zajišťovat dodatečně pomocí chemických insekticidů, které jsou však problematické kvůli vývoji rezistence škůdců a kvůli reziduíům v životním prostředí s negativním vlivem na necílové organismy, zdraví lidí a zvířat a jejichž následné odstraňování je finančně i časově náročné.

30

35

40

Úkolem technického řešení je proto vytvoření pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi, který by odstraňoval výše uvedené nedostatky, který by snižoval škody na rostlinách způsobené hmyzími škůdci a roztoči, dále zlepšoval vitalitu rostlin a jehož použití by vedlo ke snížení spotřeby chemických pesticidů a zvýšení kvality produkce rostlin s minimálním dopadem na životní prostředí.

45

Podstata technického řešení

50

Vytčený úkol je vyřešen pomocí pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi podle tohoto technického řešení. Pěstební substrát obsahuje směs rašeliny, jílu a minerálních látek. Podstata technického řešení spočívá v tom, že dále obsahuje alespoň jeden kmen entomopatogenní houby z rodu *Isaria* (synonymum *Paecilomyces*) v koncentraci v rozmezí 10^2 až 10^7 infekčních částic na 1 ml pěstebního substrátu.

55

Ve výhodném provedení je kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* (synonymum *Paecilomyces fumosoroseus*) CCM 8367.

- 5 Infektivní částice entomopatogenní houby jsou ve formě spor nebo ve formě fragmentů mycelia.

Výhody pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi podle tohoto technického řešení spočívají zejména v tom, že snižuje škody na rostlinách způsobené hmyzími škůdci a roztoči, zlepšuje vitalitu rostlin a jeho použití vede ke snížení spotřeby chemických pesticidů a zvýšení kvality produkce rostlin s minimálním dopadem na životní prostředí.

Kmen českého původu CCM 8367 entomopatogenní houby *I. fumosorosea* je uložen 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 případně tekutém médiu nebo submerzní kultivací. Ve výhodném provedení je houba kultivována ve fermentorech za použití vhodného tekutého média, např. na bázi glukózy, maltózy, škrobu a peptonu. Aplikaci do substrátu lze ve výhodném provedení zajistit rozprašováním suspenze infektivních částic houby do substrátu ve vhodném mísícím zařízení.

20

Objasnění výkresů

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

- 25 obr. 1 znázorňuje graf závislosti úmrtnosti škůdců na koncentraci infektivních částic entomopatogenní houby v substrátu,

obr. 2 znázorňuje graf vlivu koncentrace infektivních částic na procento infikovaných dospělců vylíhlých z houbou-inokulovaného pěstebního substrátu.

30

Příklad uskutečnění technického řešení

Příklad 1

35

Pěstební substrát byl připraven na bázi vyříděné světlé a tmavé rašeliny s přidavkem mletého jílu, obohacený hnojivem se základními živinami a inokulovaný entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* kmene CCM 8367. Suspenze infektivních částic houby použitá pro inokulaci substrátu byla připravena z blastospor, které byly získány submerzní kultivací. Do 95 ml sterilního tekutého kultivačního média na bázi PDB (Sigma-Aldrich, Německo) v 250 ml Erlenmeyerově baňce bylo naočkováno 5 ml houbové suspenze. Inkubace probíhala na orbitální třepače 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 koncentraci 1×10^7 spor/ml. Do suspenze bylo přidáno smáčecí činidlo Tween 80® (Sigma-Aldrich, Německo) v koncentraci 0,05% (v/v). Test klíčivosti prokázal 100% klíčivost blastospor.

Homogenita inokulace v substrátu byla zajištěna rozprašováním suspenze blastospor pomocí airbrush pistole za použití tlaku 0,5 baru do pěstebního substrátu promíchávaného v horizontálně umístěné skleněné míchací nádobě o objemu 3 l otáčející se rychlostí 18 ot./min, přičemž byla aplikována dávka 5 ml inokula na 0,5 l substrátu. Výsledný pěstební substrát měl tyto vlastnosti: pH 6,5 až 7, vlhkost 60 až 70 %, obsah spalitelných látek v sušině 70 %, obsah infektivních částic 1×10^5 na 1 ml substrátu.

55

Příklad 2

Pěstební substrát podle příkladu 1 připravený s počáteční koncentrací 4×10^4 blastospor/ml pěstební substrátu o objemu 0,5 l byl uložen do uzavíratelných PE sáčků o rozměrech 15×20 cm a umístěn do inkubátorů s konstantní teplotou. V měsíčních intervalech byly ze sáčků odebrány vzorky substrátu o objemu 25 ml, tento byl eluován 100 ml sterilní vody s přidavkem smáčedla Tween 80® v 250 ml Erlenmayerově baňce. Vzorky byly umístěny na orbitální třepače po dobu 20 minut, 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C. Jeden mililitr eluátu byl potom zředěn v 9 ml sterilní vody se smáčedlem Tween 80®, 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. Výsledky ukázaly, že houbou obohacený pěstební substrát lze skladovat při teplotách 15 až 25 °C po dobu několika měsíců při zachování životaschopnosti entomopatogenní houby v pěstebním substrátu, jak je patrné z tabulky znázorňující koncentraci infekčních částic v 1 ml substrátu v čase.

Teplota skladování	Doba skladování v měsících						
	2	3	4	5	6	7	8
15 °C	$4,27 \times 10^4$	$5,57 \times 10^4$	$5,71 \times 10^4$	$6,19 \times 10^4$	$4,11 \times 10^4$	$4,08 \times 10^4$	$3,09 \times 10^4$
20 °C	$3,44 \times 10^4$	$5,95 \times 10^4$	$5,36 \times 10^4$	$3,31 \times 10^4$	$1,87 \times 10^4$	$1,71 \times 10^4$	$2,27 \times 10^4$
25 °C	$4,00 \times 10^4$	$2,93 \times 10^4$	$2,59 \times 10^4$	$2,08 \times 10^4$	$8,80 \times 10^3$	$6,93 \times 10^3$	$3,73 \times 10^3$

Příklad 3

Pěstební substrát podle příkladu 1 připravený s počáteční koncentrací 7×10^3 až 7×10^6 blastospor/ml substrátu byl rozmístěn do plastových kelímků v množství 180 ml/kelímek. Do každého kelímku byla umístěna jedna larva posledního instaru mandelinky bramborové. Kelímky byly zakryty parafilmem a umístěny do inkubátoru s konstantní teplotou 25 °C a následně denně kontrolovány pro stanovení počtu vylíhlých dospělců. Výsledky ukázaly, že účinnost vyjádřená procentem škůdců uhynulých v substrátu vzrůstá s rostoucí koncentrací infekčních částic, jak je patrné z obrázku 1. Vylíhlí dospělí brouci mandelinky bramborové byly následně umístěny do Petriho misek s 2% agarem, pro zjištění přítomnosti infekce u dospělců. Na rozdíl od houbou neošetřeného substrátu (kontrola) dosahovalo procento infekce až 78 %, jak je patrné z obrázku 2.

Příklad 4

Pěstební substrát podle příkladu 1 připravený s počáteční koncentrací 1×10^5 blastospor/ml substrátu byl rozmístěn do 20 plastových květináčů o objemu 100 ml. Současně byla také připravena kontrola, tedy 20 květináčů substrátu bez entomopatogenní houby. Do substrátu bylo vyseto osivo okurky seté salátové a růst škůdců-prostých rostlin byl sledován ve fytotronu. Po dvou měsících byla vyhodnocena hmotnost sušiny kořenu a nadzemní části vyrostlých rostlin. Výsledky neukázaly statisticky významné rozdíly mezi biomasou rostlin pěstovaných v houbou obohaceném substrátu (průměr±SE: $1,97 \pm 0,36$ g) a kontrolním substrátu (průměr±SE: $2,10 \pm 0,29$ g) a potvrdily tak, že pěstební substrát nemá negativní vliv na rostliny v podmínkách bez výskytu škůdců. Současně byly náhodně odebrány vzorky substrátu, v nichž byla stanovena koncentrace infekčních částic postupem podle příkladu 2. V kontrole nebyla přítomnost houby *I. fumosorosea* prokázána, zatímco v obohaceném substrátu byla koncentrace v rozmezí $6,32E+03$ až $7,36E+03$ blastospor/ml substrátu, jak je patrné z následující tabulky.

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
Kontrola	0	0	0	0	0
Obohacený substrát	$6,80 \times 10^3$	$6,32 \times 10^3$	$6,88 \times 10^3$	$6,40 \times 10^3$	$7,36 \times 10^3$

5 Průmyslová využitelnost

Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi podle tohoto technického řešení lze použít zejména pro pěstování hospodářsky významných plodin, pro výsev, rozmnožování a pěstování zeleniny, např. paprik, rajčat, okurek atd., okrasných rostlin, např. pokojových květin a dalších plodin. Uplatnění najde zejména v alternativním, ekologickém zemědělství, skleníkovém pěstování plodin a u drobných pěstitelů.

NÁROKY NA OCHRANU

15

1. Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi obsahující směs rašeliny, jílu a minerálních látek, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jeden kmen entomopatogenní houby z rodu *Isaria* v koncentraci v rozmezí 10^2 až 10^7 infekčních částic na 1 ml pěstebního substrátu.

20

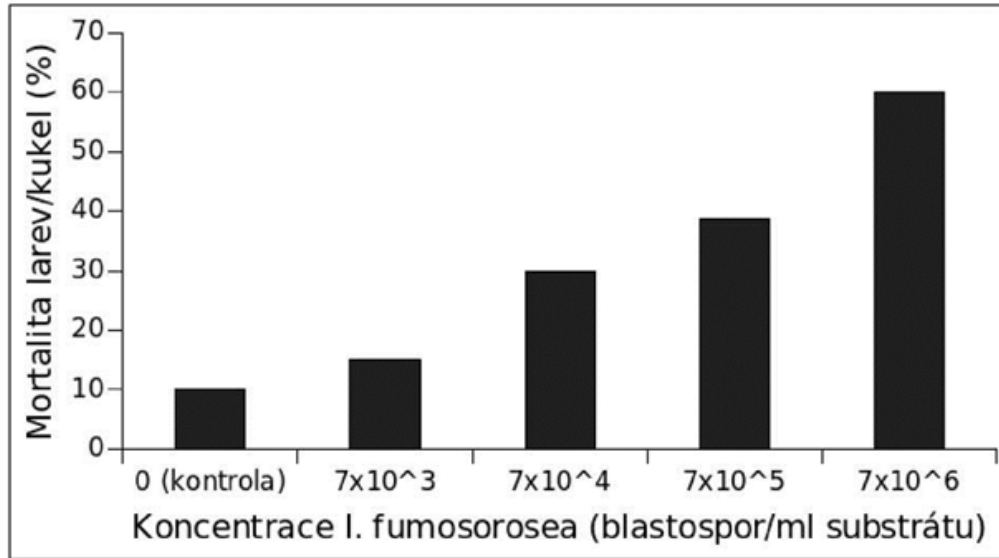
2. Pěstební substrát podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kmen entomopatogenní houby je *Isaria fumosorosea* CCM 8367.

25

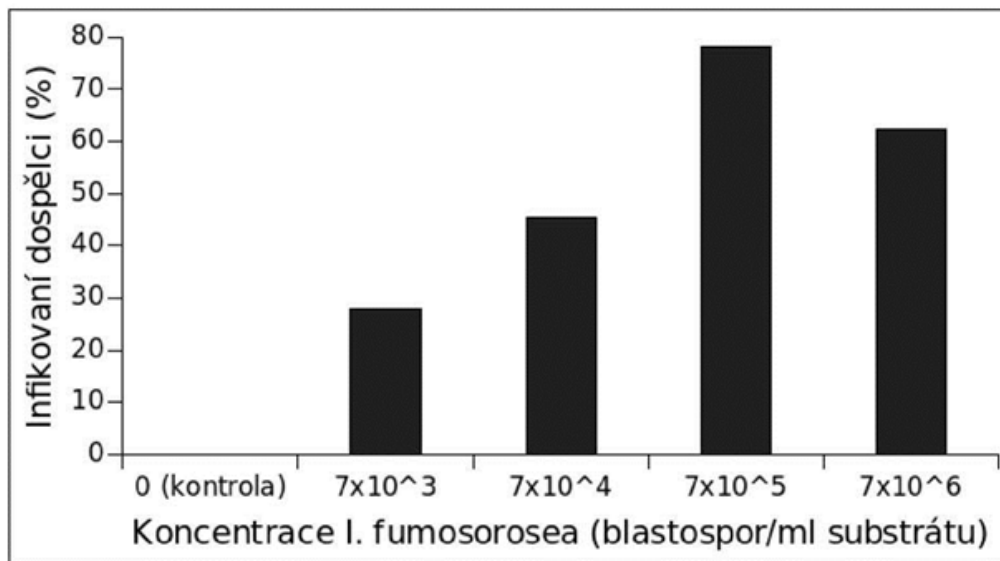
3. Pěstební substrát podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice jsou ve formě spor.

4. Pěstební substrát podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice jsou ve formě fragmentů mycelia.

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2