

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 309 915

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*A01P 7/04* (2006.01)  
*A01N 63/30* (2020.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-465**  
(22) Přihlášeno: **10.11.2022**  
(40) Zveřejněno: **31.01.2024**  
**(Věstník č. 5/2024)**  
(47) Uděleno: **21.12.2023**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **31.01.2024**  
**(Věstník č. 5/2024)**

(56) Relevantní dokumenty:

FORA, Ciprian George, et al. Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae), on the bark beetle, *Ips typographus* (L.), under field conditions. *Insects*, 29.9.2022, Vol. 13, No. 10, p. 885, ISSN 2075-4450; BARTA, Marek, et al. Entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* and their pathogenicity to *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae) in the Vitosha National Park, Bulgaria. *Journal of Forest Science*, 2020, Vol. 66, No. 10, p. 420-435, ISSN 1212-4834; MANN, Andrew J., et al. Entomopathogenic fungi to control bark beetles: a review of ecological recommendations. *Entomopathogenic fungi to control bark beetles: a review of ecological recommendations*, 2021, Vol. 77, No. 9, p. 3841-3846, ISSN 1526-498X.

CZ 308112 B6; SK 50462015 A3.

(73) Majitel patentu:

Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České  
Budějovice, České Budějovice 2, CZ  
MycoTech s.r.o., Opava, Jaktář, CZ

(72) Původce:

Alexandr Jegorov, Rudolfovo, CZ  
RNDr. Petr Šimek, CSc., České Budějovice, České  
Budějovice 7, CZ  
RNDr. Josef Satke, Ph.D., Hradec nad Moravicí,  
CZ

(74) Zástupce:

artpatent, advokátní kancelář s.r.o., Dukelských  
hrdinů 976/12, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

**Způsob zamezení šíření kůrovce lesním  
porostem**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu zamezení šíření kůrovce lesním porostem, při kterém se na lesní porost aplikuje postřik obsahující spory entomopatogenní houby, konkrétně kmen *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a/nebo kmen *Beauveria bassiana* CCM 9229. Tyto kmeny entomopatogenních hub se izolují předem přímo z kůrovce smrkového přítomného v ošetřovaném lesním porostu. Postřik má koncentraci alespoň  $10^6$  spor/ml a aplikuje se radiálně nebo frontálně do hraniční oblasti mezi napadeným a zdravým lesním porostem ve vzdálenosti 0 až 500 m od napadeného lesního porostu ve směru šíření kůrovce lesním porostem.

CZ 309915 B6

## Způsob zamezení šíření kůrovce lesním porostem

### Oblast techniky

5

Vynález se týká oblasti ekologie, konkrétně způsobu zamezení šíření kůrovce lesním porostem s cílem omezit jeho populační hustotu v prostředí.

### 10 Dosavadní stav techniky

Z důvodu klimatických změn a opakujících se suchých období je narušována rovnováha přírodních ekosystémů, čímž dochází k významným změnám v biodiverzitě projevující se oslabením lesních porostů, včetně smrkových monokultur. Jsou potlačeny mykorrhizní houby i přirození nepřátelé škůdců smrkových porostů jako jsou entomopatogenní houby a bakterie. Výsledkem je masivní rozšíření některých významných škůdců, které se navíc za takových podmínek v klimaticky příhodném roce rozmnožují ve více generacích. Napadají lesní porosty, jejich larvy vrtají chodbičky v dřevu a konzumují lýko během svého vývoje do dospělého stadia. Odhaduje se, že v Evropě mezi léty 1850 až 2000 přibližně 8 % úhynu všech jehličnanů bylo způsobeno kůrovci. V České republice a okolních zemích se jedná zejména o kalamitní výskyt několika druhů, v první řadě lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), lidově nazývaného kůrovec.

Během svého komplexního vývoje pod kůrou jehličnatého stromu jsou vystaveni kůrovci interakcím s vysokým počtem symbiotických a antagonistických organismů, do druhé skupiny patří také entomopatogenní houby. Nejznámější a rozšířené jsou kmeny rodů *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Isaria* nebo *Verticillium* (Mann AJ, Davis TS 2021, Pest Sci Manag <https://doi.org/10.1002/ps.6364>). Vzájemné působení těchto patogenů s kůrovci formou parazitismu a mutualismu (Ortiz-Urquiza A, mSystems 6(4), e00766-21, 2021) představuje komplexní proces, který probíhá na pozadí vylučování specifických chemických látek (feromonů i kairomonů), a ovlivňuje chování všech aktérů v lesním ekosystému, tedy jak hmyzího škůdce, entomopatogenu, tak i hostitelského stromu. Obtížně se studuje přímo v lesních porostech, proto praktické východisko představuje pilotní testování patogenity hub v laboratorních podmínkách. Existuje ale celá řada prací popisujících testování entomopatogenních hub proti kůrovci v lesních terénech se snahou o jejich biologickou kontrolu. Jejich použití však bylo dosud zaměřeno na ochranu napadených porostů vhodně připravenou formulací patogenního mikroorganismu se záměrem dostat do přímého kontaktu entomopatogenní houbu se škůdcem, tedy podobným způsobem, jakým jsou aplikovány rozšířené chemické insekticidy, kdy brouk po infekci sporami houby je oslaben a hyne na vyvolanou mykózu či jinou infekci vyvolanou dalšími patogeny. Pro tyto účely byl dosud nejvíce využívány kmeny rodu *Beauveria bassiana* (Fettig JC, Hilszczanski J 2015, in Bark Beetles, Elsevier 2015, Chapter 14, Management Strategies for Bark Beetles in Conifer Forests). Další metoda byla založena na kontaminaci brouků nachytaných ve feromonových pastech a jejich vypuštění zpět do postižené lokality s cílem kontaminovat houbou širší populaci škůdce (Kreutz J *et al* 2004, J Applied Entomol 128, 384 až 389).

45

Ačkoliv tyto způsoby biologického boje mají nespornou výhodu vůči chemickým insekticidům, protože nedochází ke kontaminaci přírodního prostředí a houba po aplikaci vymizí bez zanechání chemických reziduí, dosavadní popsané metody, byť často velice účinné v laboratorních pokusech, neposkytují uspokojivé výsledky v terénních podmínkách (Mann AJ, Davis TS 2021, Pest Sci Manag <https://doi.org/10.1002/ps.6364>). Dosud použité způsoby aplikace mají následující nevýhody.

50

Pokud je ošetřován napadený les, praxe ukazuje, že přímý účinek houbových preparátů je obvykle nižší než při aplikaci chemických insekticidů. Spory houby jsou rozptýleny v prostředí lesa, houba je obvykle schopná zasáhnout určitá stadia hmyzu, aplikace záleží na klimatických

55

podmínkách, způsobu aplikace a nefunguje s žádoucím dostatečným účinkem. V zasaženém lese sice dochází k určitému poklesu výskytu kůrovce a zpravidla lze nalézt infikované jedince. Lesní porost ale zůstává zasažen v takovém rozsahu, že je stejně nutno přistoupit k jeho sanaci mýcením. Při aplikaci houby v suchém stavu je účinek omezen na přímý kontakt a např. při aplikaci z letadla houba zůstává ve svrchním patře lesa vystavena UV záření, kde nejsou podmínky pro její nový růst a houba rychle z prostředí vymizí. Další nevýhodou dosud známých postupů je to, že k ošetření dochází v napadené části lesa, který je již oslaben obvykle suchem následně podpořeným těžbou napadených stromů. Takové prostředí nevytváří příhodné životní podmínky ani pro aplikovanou entomopatogenní houbu. Další nevýhodou dosud známých postupů je skutečnost, že je aplikace prováděna vesměs až v období rozpoznání akutní infekce spojeném s náletem brouků, které je obvykle vázáno na teplotně příhodné dny pozdně jarního nebo raného letního období. O období akutního výskytu kůrovce, už klimatické podmínky nemusí být vhodné pro aplikaci entomopathogenní houby, která pro klíčení konidií vyžadují vyšší vzdušnou vlhkost. Dosavadní postupy také nezohledňují chemické signály emitované jednotlivými aktéry. Četná pozorování v lesnické praxi i literatura ukazují, že pachové látky vylučované jak entomopatogeny, tak i brouky obě strany vnímají a ovlivňují jejich chování.

Úkolem vynálezu je proto najít nový, inovativní způsob zamezení šíření kůrovce lesním porostem, který by vedl k zásadnímu snížení jeho populační hustoty v prostředí, který by byl dlouhodobě účinný v průběhu celého roku bez ohledu na teplotu a vlhkost prostředí, který by nenarušoval přirozené prostředí v daném ekosystému a který by bylo možné aplikovat efektivně preventivně, ne až v případě akutní infekce.

#### 25 Podstata vynálezu

Vytčený úkol je vyřešen pomocí způsobu zamezení šíření kůrovce lesním porostem a snížení jeho populační hustoty v prostředí podle tohoto vynálezu. Při tomto způsobu se na lesní porost, konkrétně hrabanku pod smrkovým porostem aplikuje postřik obsahující spory entomopatogenní houby.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že jako entomopatogenní houba se použije kmen *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a/nebo kmen *Beauveria bassiana* CCM 9229, které se izolují přímo z lýkožrouta smrkového přítomného v ošetřovaném lesním porostu. Jejich přírodní kmeny byly získány přímo z brouků lýkožrouta smrkového přirozeně se vyskytujícího ve zdravém porostu lesní monokultury. Selektce vhodného kmene proběhla pomocí monosporických izolátů a systematického testování jejich vitality a virulence. Postřik má koncentraci alespoň  $10^6$  spor/ml a aplikuje se do hraniční oblasti mezi napadeným a zdravým lesním porostem ve vzdálenosti 0 až 500 m od napadeného lesního porostu ve směru šíření kůrovce lesním porostem v koncentraci  $4 \times 10^9$  až  $10 \times 10^9$  houbových spor na hektar plochy. Koncentrace houbových spor na plochu je v závislosti na rychlosti postupu osoby provádějící postřik nebo biologické variabilitě vstupního materiálu. K ochraně lesa je tedy použito nezasažené pásmo neboli hraniční oblast lesa ve směru šíření škůdce a je tedy použita nezasažená plocha lesní hrabanky mezi stromy, nikoli primárně stromy. Pro účely tohoto vynálezu byly otestovány kmeny *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a kmen *Beauveria bassiana* CCM 9229, které jsou specificky virulentní vůči lýkožroutovi smrkovému a lýkožroutovi severskému, jsou odolné vůči klimatickým podmínkám a přetrvávají v ekosystému minimálně jedno celé roční období. Houba je aplikována do prostředí, ve kterém je dosud les zachován a hrozí mu likvidace škůdce, a kde má houba příhodné podmínky stát se součástí živého ekosystému smrkový les – hmyzí patogen kůrovec – entomopatogenní houba.

Tento způsob biologického boje s kůrovci aplikací původem domácích entomopatogenních kmenů hub rodu *Beauveria* izolovaných přímo z ekosystémů smrkových monokultur s nízkým, rovnovážným výskytem škůdce je zcela unikátní. Jde v podstatě o vhodný způsob reintrodukce přírodní houby zpět do lesního ekosystému, buď původního, přírodního ekosystému nebo smrkové monokultury, aplikací přípravku na lesní hrabanku ve vhodném ročním období a za

příhodných klimatických podmínek. Konečným výsledkem není přímé hubení škůdce jako v případě insekticidních přípravků, ale primárně zamezení šíření kůrovce. Reintrodukcí houby do ekosystému je možno provést z napadené zóny nebo s výhodou ošetřením dosud nezasazené zóny lesa.

5

Entomopatogenní houba vnesená do dosud zachovalého lesního porostu současně emituje své charakteristické pachové látky, které registrují citlivé čichové orgány lýkožrouta a působí na něj, vedle patogenního účinku po kontaktu se sporama, také repelentně. Svědčí o tom významně snížený výskyt cílového lýkožrouta a minimální nález infikovaných jedinců brouka. Znovu zavedený výskyt entomopatogenní houby vede k nastolení původní přírodní rovnováhy mezi těmito organismy tím, že určitá část kůrovců v půdě zimuje, přičemž se přirozeným způsobem houbou po aplikaci nakazí.

V jednom výhodném provedení se postřik aplikuje radiálně k ohnisku výskytu kůrovce, kde se vytváří alespoň jedno mezikruží, v jehož středu se nachází napadený lesní porost. Mezikruží má s výhodou šířku 10 až 30 m.

V dalším výhodném provedení se postřik aplikuje frontálně, kde se aplikace provádí přibližně kolmo na očekávaný směr šíření kůrovce, tedy v alespoň jednom pásu svírajícím úhel 75° až 105° s hlavním směrem šíření kůrovce v napadeném lesním porostu. Pás má s výhodou šířku 10 až 30 m. K dosažení vyšší efektivity může být použito pásů více, ve výhodném uspořádání jsou alespoň tři a jsou uspořádány kolem napadeného lesního porostu ve tvaru písmene U nebo jsou čtyři a jsou ve tvaru uzavřeného čtyřúhelníku. K postřiku hrabanky dochází ve vzdálenosti 0 až 500 m od postižené zóny napadeného lesního porostu, tedy v zóně dosud málo nebo úplně nenapadené kůrovcem.

Aplikací v radiálním mezikruží nebo frontálních pásech na povrch terénu a při použití dostatečné koncentrace na plochu působí postřik obsahujícího spory entomopatogenní houby současně repelentně podobně jako objevené vyšší alkoholy emitované entomopatogenem. Další výhodou způsobu aplikace podle vynálezu je podstatně nižší spotřeba houbového preparátu než při plošné aplikaci, přičemž dochází k efektu takzvané horizontální transmise, kdy prostřednictvím infikovaných brouků dochází k rozšíření houby a nákaze dosud neinfikovaných kůrovců.

Způsob ochrany lesního porostu podle vynálezu se provádí tak, že je postřik obsahující spory entomopatogenní houby aplikován v pružích do hraničních ploch mezi zasaženými a nezasazenými oblastmi lesa, přibližně kolmo na očekávaný směr šíření kůrovce. Ochranný pruh může být v různé vzdálenosti od hraniční zóny v závislosti na rychlosti šíření kůrovce. Hraniční plochou je definováno území mezi částí lesa napadené kůrovcem a částí lesa, která dosud napadena není, přičemž se hodnotí směr šíření kůrovce a roční hloubka invaze, která obvykle dosahuje několika set metrů. Evaluace napadení, tedy prognóza a rozlišení napadených zón, se provádí na základě hodnocení přítomnosti kůrovce v ČR na základě Vyhlášky č. 176/2018 Sb., normy ČSN 48 1000 a u Lesů ČR a.s. pomocí dalších vytvořených vnitřních postupů. Jednoduchou praktickou metodou obvykle používanou pro hodnocení výskytu kůrovce je nalezení požeru obvykle pomocí drtinek kůry a dřeva. Tato metoda se rovněž používá pro posouzení nezbytnosti mýcení lesa. Další metodou jsou např. feromonové lapače umožňující posoudit přímo sílu invaze kůrovce, avšak tato metoda má nevýhodu v hodnocení vymezení hraničních ploch, protože umožňuje nalákat kůrovce z napadené zóny do zóny dosud nenapadené.

Entomopatogenní houba je s výhodou použita pro přímou aplikaci spor živé kultury houby, což představuje nejjednodušší metodu aplikace. Druhou možností je použití entomopatogenní houby ve formě fyzikálního nebo chemicky upraveného homogenního inokula houby s cílem zlepšení jeho mechanických vlastností, homogenity nebo stability. Fyzikálně se homogenní inokulum upravuje s použitím různých otáček a doby homogenizace, tak aby nedošlo k poškození spor a

následně filtrací, a to na základě velikosti trysek aplikátoru postřiku. Chemicky se homogenní inokulum upravuje zejména přidavkem detergentů.

5 Postřik tedy ve výhodném provedení obsahuje dále detergenty, přednostně detergenty snadno biologicky odbouratelných, a to v koncentraci 0,01 % až 2 % hmotn., jako je např. např. bioodbouratelný tenzid Tween 80. Hlavním účelem přidavků detergentů je dosažení homogenity suspenze. Dále mohou být přidávány látky určené k chemické stabilizaci, a to v koncentraci 0,01 % až 1 % hmotn., např. chloramfenikol jantaran, nebo k zajištění výživy houby, a to v koncentraci 0,01 % až 4 % hmotn. s odpovídajícím obsahem aminokyselin, solí, peptonů nebo 10 kaseinového hydrolyzátu ve vhodném živém médiu. Přednostně je postřik prováděn při chladném počasí s předchozím výskytem srážek, které má výhodu pro lepší možnost reintrodukce houby do lesního ekosystému. Způsob podle vynálezu tedy není vázán na přímé zasažení kůrovců postřikem. Alternativně může být použita stabilizovaná formulace houby ve formě houbových spor v suché formulaci, která je aplikována rovněž přímo na terén.

15 Výhody způsobu zamezení šíření kůrovce lesním porostem podle tohoto vynálezu spočívají zejména v tom, že je účinný v průběhu celého roku bez ohledu na teplotu a vlhkost prostředí, rychle a účinně působí proti kůrovcům, nenarušuje přirozené prostředí v daném ekosystému a je navíc možné ho aplikovat efektivně preventivně, ne až v případě akutní infekce.

20

#### Objasnění výkresů

Uvedený vynález bude blíže objasněn na následujících vyobrazeních, kde:

25

obr. 1 znázorňuje mapu použití postřiku v terénu.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

30

##### Charakterizace kmene

Izoláty entomopatogenních hub byly získány pečlivým sběrem brouků lýkožrouta smrkového ze 35 zdravých smrkových kmenů sloužících jako horizontální lapáky v nezasazeném lese, kde panovala přírodní rovnováha mezi výskytem patogenu a zdravého lesního ekosystému. Následná izolace byla poté provedena z kultivací na Petriho miskách na chudém agarovém médiu.

##### Příklad 1: Kultivace houby *Beauveria pseudobassiana*, CCM 9191

40 Kultura byla kultivována na agarem ztuženém médiu ME (HiMedia), obohaceném o 0,05%  $K_2HPO_4$  a 0,015% thiamin HCl po dobu 12 dnů při teplotě 23 °C při zachování režimu světlo/tma 12/12 hodin. Po skončení sporulační fáze byla připravena suspenze inokulačních částic v Ringerově roztoku. Suspenze obsahovala buněčné partikule, zejména spory, hyfy a hyfové zlomky. Touto suspenzí z agaru setřené mycelia byly naočkovány 250ml Erlenmeyerovy 45 baňky s bočními výstupky s inokulačním médiem o složení (% hmotn.) glukóza 2, maltodextrin 1, tryptone (Scharlau) 2,  $KH_2PO_4$  0,1,  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0,05, pH 5,4, a kultivovány na rotační třepače po dobu 120 až 144 hodin při teplotě 23 °C, 150 otáčkách za minutu a excentricitě 6,0 cm.

50 Homogenní inokulum po skončení inokulační fáze bylo přeočkováno do čerstvě připraveného produkčního média o složení (% hmotn.): glukóza 2, Sorbidex P 16612 (Brenntag) 1, *D*-mannosa 1, hydrolyzáat hrachové bílkoviny (Focus Ingredients) 1,5, glycin 0,5, KCl 0,3, NaCl 0,15,  $CaCl_2$  0,01,  $KH_2PO_4$  0,1,  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0,05,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  0,01,  $FeSO_4 \cdot 5 H_2O$  0,005, pH 5,4, vždy 10 % objem/objem a kultivuje v 500ml Erlenmeyerových baňkách se 150 ml kapalného média za 55 stejných kultivačních podmínek jako při přípravě inokula po dobu 5 až 8 dnů.

Produkčním médiem o stejném složení s dvojnásobným množstvím C-zdrojů a komplexních N-zdrojů byl připraven substrát pro stacionární kultivaci na pevném nosiči. Loupané proso bylo promýváno trojnásobně do mírného nabobtnání po dobu 20 minut v teplé demineralizované vodě.

5 Po separaci pevné a kapalné složky bylo proso zalito v celém objemu produkčním médiem a pomalu promícháno po dobu 10 minut. Vlhké proso bylo separováno a rozplněno do 2000 ml Erlenmeyerových baněk, vždy 400 g prosa na 1 baňku. Takto připravený pevný substrát s produkčním médiem byl dvojnásobně sterilizován po dobu 20 minut a teplotě 121 °C se 24 hodinovou prodlevou.

10

Submerzní kulturou byly naočkovány 2 000 ml Erlenmeyerovy baňky s pevným nosičem, vždy 100 ml na 1 baňku a důkladně promíchány, aby byla zajištěna homogenita rozvrstvení buněčné biomasy v celém objemu. Po 12 hodinách, po naklíčení a aklimatizaci kultury na pevném substrátu bylo provedeno ještě jedno krátké rozmíchání obsahu v baňce. Stacionární kultivace při 15 teplotě 24 °C ve tmě. Po 6 dnech kultivace snížena kultivační teplota na 21 °C. Dále kultivace ještě 12 dnů za stejných kultivačních podmínek.

Příklad 2: Kultivace houby *Beauveria bassiana*, kmen CCM 9229

20 Kmen byl udržován na agarem ztuženém médiu PDA (HiMedia), obohaceném o 0,25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,03% thiamin HCl po dobu 16 dnů při teplotě 23 °C při zachování režimu světlo/tma 12/12 hodin. Po skončení sporulační fáze byla připravena suspenze inokulačních částic stěrem mikrobiologickým tampónem ve fyziologickém roztoku. Suspenze obsahovala buněčné partikule, zejména spory, hyfy a hyfové zlomky. Touto suspenzí z agaru setřeného mycelia byly 25 naočkovány 250ml Erlenmeyerovy baňky s bočními výstupky s inokulačním médiem o složení (% hmotn.) glukóza 3, sladidinový extrakt 1, sójový pepton (Roth) 1,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,05, pH 5,3, a kultivovány na rotační třepačce po dobu 96 až 168 hodin při teplotě 23 °C, 180 otáčkách za minutu a excentricitě 6,0 cm.

30 Homogenní submerzní inokulum 1. stupně po skončení inokulační fáze bylo přeočkováno do čerstvě připraveného produkčního média o složení (% hmotn.) glukóza 4, Maldex 180 G (Brenntag) 2, Mycological peptone (HiMedia) 2, glycin 1, KCl 0,4, NaCl 0,1, CaCl<sub>2</sub> 0,005, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2, MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,05, ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,01, FeSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O 0,005, pH 5,4, vždy 10 % 35 objem/objem a kultivováno v 500ml Erlenmeyerových baňkách se 150 ml kapalného média při teplotě 23 °C, 220 otáčkách za minutu a excentricitě 6,0 cm.

Produkčním médiem o stejném složení s dvojnásobným množstvím komplexního N-zdroje byl připraven substrát pro stacionární kultivaci na pevném nosiči. Loupané proso bylo promýváno trojnásobně do mírného nabobtnání po dobu 20 minut v teplé demineralizované vodě. Po separaci 40 pevné a kapalné složky bylo proso zalito v celém objemu produkčním médiem a pomalu promícháno po dobu 10 minut. Vlhké proso bylo separováno od produkčního média a alikvotně rozděleny do 2000 ml Erlenmeyerových baněk, vždy se 400 g prosa na jednu baňku. Takto připravený pevný substrát s produkčním médiem byl dvojnásobně sterilizován po dobu 20 minut a teplotě 121 °C s 24 hodinovou časovou prodlevou.

45

Submerzní kulturou byly naočkovány 2000 ml Erlenmeyerovy baňky s pevným nosičem, vždy 100 ml na 1 baňku a důkladně promíchány, aby byla zajištěna homogenita rozvrstvení buněčné biomasy v celém objemu. Po 12 hodinách, po naklíčení a aklimatizaci kultury na pevném substrátu bylo provedeno ještě jedno krátké rozmíchání obsahu v baňce. Stacionární kultivace při 50 teplotě 24 °C ve tmě. Po 6 dnech kultivace snížena kultivační teplota na 22 °C. Dále kultivace ještě 12 až 16 dnů za stejných kultivačních podmínek.

Příklad 3: Příprava aplikačního postřiku

Obsah 2-litrové Erlenmayerovy banky byl přenesen do homogenisátoru spolu s 10 litry vody, 20 ml Tween 80, jakožto detergentu a 20 ml chloramfenikol jantaranu jakožto stabilizátoru. Suspenze byla homogenizována po dobu 2 min (Waring WSB70 5000 otáček/minutu). Vzniklá suspenze byla filtrována sítím (velikost oka 0,7 mm) umožňujícím následnou aplikaci mechanickým rozprašovačem s velikostí trysky (04 – červená nebo 05 – hnědá dle barevného značení ISO). Před aplikací v lesním porostu byl roztok naředěn 1:1 vodovodní vodou. Aplikace byla prováděna do 12 h po přípravě aplikačního roztoku, jehož teplota byla udržována v rozmezí 10 až 18 °C. Při průběžných kontrolách na Neubaurově komůrce dosahoval obsah houbových spor průměrné koncentrace  $10^{10}$  inokulačních částic spor/litr aplikačního roztoku shodně pro oba kmeny rodu *Beauveria*.

#### Příklad 4: Radiální introdukce kmene *Beauveria pseudobassiana*, CCM 9191

Experiment byl proveden začátkem dubna 2020 v lokalitě Vysoká Běta (48.9778817N, 14.2021208E, 690 m), parcelní číslo 15/3, obec Brloh, Jaronín. Reintrodukce houby *Beauveria pseudobassiana*, CCM 9191 byla provedena v době před obdobím hlavního šíření kůrovce. Postřik byl proveden na mýtině po vykácení napadené zóny. Předpokládaný směr šíření lýkožrouta smrkového byl odhadnut z vnitřku mýtiny do stěny lesa především v západním směru. Ve stěně lesa se předpokládalo dokácení individuálních nově napadených stromů ve směru šíření. V lokalitě bylo radiálně aplikováno 20 litrů aplikačního postřiku dle příkladu 3 s použitím kmene *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 postřikem na terén v koncentraci  $5 \times 10^9$  spor/ha, a to přímo do hraniční oblasti mezi napadeným a zdravým lesním porostem. Aplikace byla provedena ve formě mezikruží se šířkou 10 m. Úspěšnost reintrodukce houby byla posuzována na základě šíření kůrovce od centra výskytu, kde bylo nezbytné napadené stromy vymýtít, a to ve směru šíření a i radiálně. Na základě vyhodnocení nebyl na podzim roku 2020 nalezen infikovaný strom v okolí 250 m od ošetřené mýtiny. Při opakovaném vyhodnocování na podzim roku 2021 nebyl nalezen infikovaný strom ve vzdálenosti 800 m. Lesní správa polesí Klet' pro hodnocení použila metodu počtu nalezených požerů kůrovce.

#### Příklad 5: Současné použití kmenů *Beauveria pseudobassiana*, CCM 9191 a *Beauveria bassiana* CCM 9229

Experiment byl proveden v červenci 2019 v lokalitě Haberský Vrch (48.9321083N, 14.3164247E, 860 m), Parcelní číslo 530/7, obec Vrábče, Slavče. Postřik byl proveden na mýtině po vykácení napadené zóny. Předpokládaný směr šíření lýkožrouta smrkového byl odhadnut z vnitřku do stěny lesa. Experiment byl proveden v místě a z důvodu vysokého rizika rozšíření kůrovce, které vedlo k tomu, že bylo předběžně rozhodnuto o rozšíření mýcení lesa ještě v roce 2019. V lokalitě bylo aplikováno 20 litrů aplikačního postřiku dle příkladu 3 s použitím u obou kmenů *Beauveria pseudobassiana*, CCM 9191 a *Beauveria bassiana* CCM 9229 v koncentraci  $10 \times 10^9$  spor/ha, a to 250 m od hraniční oblasti mezi vykáčenou mýtinou, tedy mezi napadeným a zdravým lesním porostem. Na základě vyhodnocení výskytu kůrovce bylo na podzim roku 2019 správcem lesa (lesy ČR a.s., polesí Klet') rozhodnuto nepokračovat v mýcení, protože nedošlo k dalšímu napadení lesa ve směru šíření. Výskyt kůrovce byla hodnocen na základě Vyhlášky č. 176/2018 Sb., normy ČSN 48 1000 a vnitřních norem Lesů ČR a.s.

#### Příklad 6: Vytvoření ochranného pásu s použitím kmenů *Beauveria pseudobassiana*, CCM 9191 a *Beauveria bassiana* CCM 9229 v nezasažené zóně lesa sousedící s napadenou částí lesa

Experiment byl proveden v koncem dubna 2021 v lokalitě Horní Dubenky (49.2696150N, 15.3362003E), Parcelní číslo 405/1 a 384/1, obec Horní Dubenky, Horní Dubenky a je znázorněn na obr. 1, vlevo s pracovním označením Coufal 2. Předpokládané šíření z těsně přiléhajícího pozemku na východní straně, kde došlo k silnému napadení a následně těžbě. Byly vytvořeny oddělené pásy o šíři přibližně 3 až 4 metry ve vzdálenosti přibližně 10 až 30 m v části lesa dosud nenapadené kůrovcem. V lokalitě bylo aplikováno 20 litrů aplikačního postřiku dle příkladu 3 s použitím u obou kmenů *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a *Beauveria bassiana* CCM

9229 v koncentraci  $7 \times 10^9$  spor/ha. Na obr. 1 je znázorněno použití houby *Beauveria bassiana* CCM 9229 označené černým pruhem a použití kmene *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 bílým pruhem. Hodnocení bylo provedeno v dubnu 2022 majitelem pozemku a k rozšíření kůrovce ve směru předpokládaného šíření nedošlo. Výskyt kůrovce byla hodnocen na základě  
 5 Vyhlášky č. 176/2018 Sb., normy ČSN 48 1000 a vnitřních norem Lesů ČR a.s.

Příklad 7: Vytvoření ochranného pásu s použitím kmenů *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a *Beauveria bassiana* CCM 9229 v nezasazené zóně lesa sousedící s napadenou částí lesa

10 Experiment byl proveden začátkem května 2021 v lokalitě Horní Dubenky (49.2692606N, 15.3291628E), Parcelní číslo 397, obec Horní Dubenky, Horní Dubenky a je znázorněn na obr. 1, vpravo s pracovním označením Coufal 3. Vzdálenost k místu napadení je přibližně 250 až 350 m. Byly vytvořeny oddělené pásy o šíři přibližně 3 až 4 metry ve vzdálenosti přibližně 10 až 30 m  
 15 v části lesa dosud nenapadené kůrovcem. V lokalitě bylo aplikováno 20 litrů aplikačního postřiku dle příkladu 3 s použitím u obou kmenů *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a *Beauveria bassiana* CCM 9229 v koncentraci  $6 \times 10^9$  spor/ha. Na obr. 1 je znázorněno použití houby *Beauveria bassiana* CCM 9229 černým pruhem a použití kmene *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 bílým pruhem. Hodnocení bylo provedeno v dubnu 2022 majitelem pozemku a k rozšíření kůrovce ve směru předpokládaného šíření nedošlo. Při hodnocení byla použita metoda  
 20 podle požerů kůrovce.

V jiném příkladu provedení jsou pásy uspořádány ve tvaru písmene U nebo ve tvaru uzavřeného čtyřúhelníku, vždy ale záleží na daném terénu lesního porostu, resp. na konkrétní oblasti napadení lesu kůrovcem.  
 25

#### Průmyslová využitelnost

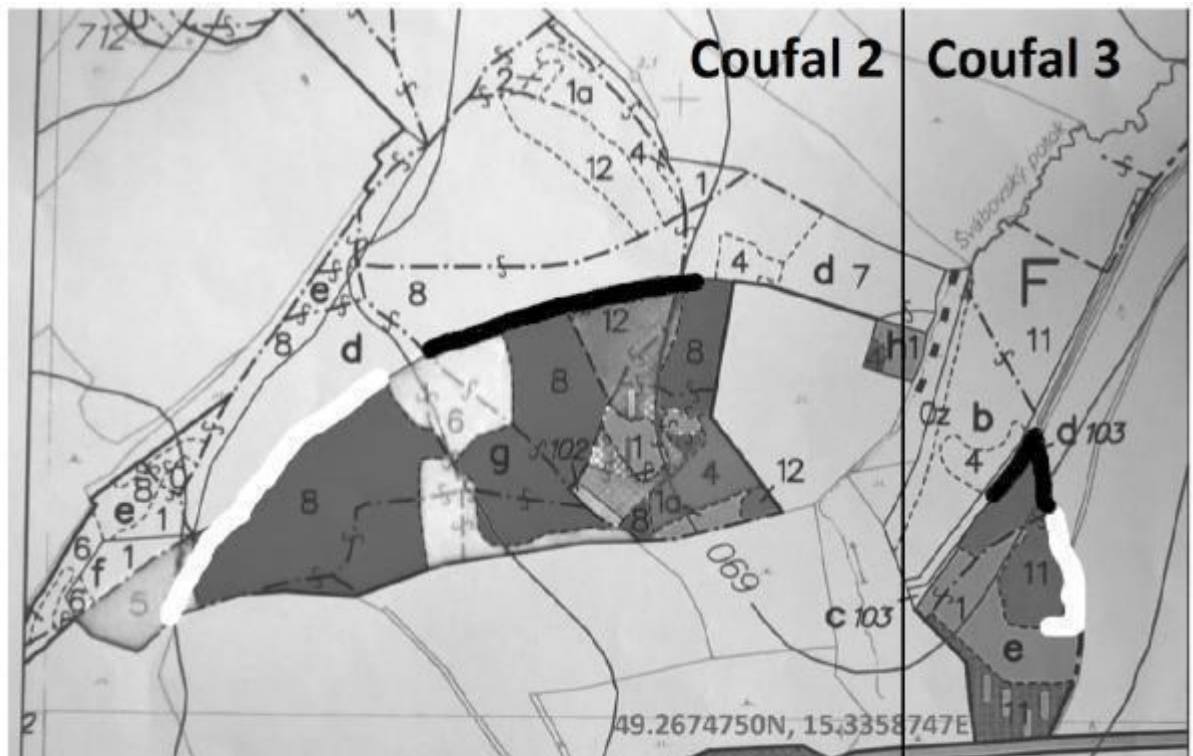
30 Způsob zamezení šíření kůrovce lesním porostem lze použít zejména ve smíšených lesích mírného pásu, které se potýkají s přítomností škůdců jako jsou kůrovci, kdykoliv v průběhu roku.



## PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob zamezení šíření kůrovce lesním porostem, **vyznačující se tím**, že se na lesní porost aplikuje postřik obsahující spory entomopatogenní houby kmene *Beauveria pseudobassiana* CCM 9191 a/nebo kmen *Beauveria bassiana* CCM 9229, které se izolují přímo z lýkožrouta smrkového přirozeně se vyskytujícího v ošetřovaném lesním porostu, postřik má koncentraci alespoň  $10^6$  spor/ml, přičemž postřik se aplikuje do hraniční oblasti mezi napadeným a zdravým lesním porostem ve vzdálenosti 0 až 500 m od napadeného lesního porostu ve směru šíření kůrovce lesním porostem v koncentraci  $4 \times 10^9$  až  $10 \times 10^9$  spor/ha.
- 10 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že postřik se aplikuje radiálně k ohnisku výskytu kůrovce, kde se vytváří alespoň jedno mezikruží, v jehož středu se nachází napadený lesní porost.
3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že mezikruží má šířku 10 až 300 m.
- 15 4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že postřik se aplikuje frontálně, kde se aplikace se provádí v alespoň jednom pásu svírajícím úhel  $75^\circ$  až  $105^\circ$  s hlavním směrem šíření kůrovce v napadeném lesním porostu.
5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že pás má šířku 10 až 30 m.
6. Způsob podle nároku 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že pásy jsou alespoň tři a jsou uspořádány kolem napadeného lesního porostu ve tvaru písmene U nebo ve tvaru uzavřeného čtyřúhelníku.
- 20 7. Způsob podle některého z nároku 1 až 6, **vyznačující se tím**, že entomopatogenní houba je ve formě spor živé kultury.
8. Způsob podle některého z nároku 1 až 6, **vyznačující se tím**, že entomopatogenní houba je ve formě fyzikálního nebo chemicky upraveného homogenního inokula.
- 25 9. Způsob podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že postřik dále obsahuje 0,01 až 2 % hmotn. detergentu, 0,01 % až 1 % hmotn. stabilizátoru a 0,01 % až 4 % hmotn. substrátu pro výživu spor entomopatogenních hub.

1 výkres



Obr. 1