

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 32 213

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*A01N 65/22* (2009.01)  
*A01N 25/28* (2006.01)  
*A01P 3/00* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-33233**  
(22) Přihlášeno: **21.12.2016**  
(47) Zapsáno: **29.10.2018**

- (73) Majitel:  
Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž, CZ  
Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 6 -  
Suchdol, CZ
- (72) Původce:  
Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D., Kroměříž, CZ  
Ing. Marie Maňasová, Ph.D., Kašperské Hory, CZ  
Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D., Praha 9 - Černý Most,  
CZ
- (74) Zástupce:  
PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,  
Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

- (54) Název užitého vzoru:  
**Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na  
základě esenciálního oleje z Thymus  
vulgaris a jeho použití**

CZ 32213 U1

Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* a jeho použití

### Oblast techniky

Řešení se týká fungicidního prostředku na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* a jeho použití. Fungicidní prostředek je ve formě mikročástic esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, které umožňují jeho využití v ochraně rostlin, respektive obilnin, proti houbovým chorobám, kdy obal mikročástic chrání esenciální olej proti odpaření a umožňuje tak prodloužení jeho účinnosti. Dále je optimalizována koncentrace esenciálního oleje v mikročásticích i v postřikové jíše tak, aby nedocházelo k poškození rostlin vlivem fytotoxicity.

### Dosavadní stav techniky

Účinky esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* jsou popsány zejména proti houbovým a bakteriálním patogenům v humánní medicíně, rovněž jsou používány vodné či etanolové extrakty z této rostliny v potravinářském průmyslu a to jako ochrana potravin proti poškození skládkovými chorobami.

Účinek oleje z *Thymus vulgaris* na houbové patogeny obilovin rostlin byl již v minulosti popsán (Matušinsky, P., Zouhar, M., Pavela, R., Nový, P. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of Cereal. Industrial Crops and Products, 67, 2015, 208-215), dosud ovšem byly esenciální oleje používány ve formulacích, které neumožňovaly déletrvající účinek po aplikaci vzhledem k jejich těkavosti. Dále podléhaly rychlému rozložení vlivem klimatických podmínek, zejména slunečního záření.

V procesu ochrany obilnin proti houbovým chorobám je uplatňována celá řada preventivních, ale zejména pak kurativních metod ochrany rostlin v čele s aplikací fungicidních látek a to jak kontaktních tak systémových. Z hlediska měnící se legislativy dochází k vytváření podmínek pro aplikaci alternativních prostředků ochrany rostlin a to zejména v integrovaných

systemech produkce obilovin. Používání fungicidů sebou pochopitelně nese i reziduální zátěž potravinového řetězce a zdrojů pitné vody. Významný je mimo jiné kumulativní efekt reziduí pesticidů, kdy jednotlivé pesticidy v potravině nepřesahují stanovený limit, ale kumulace všech obsažených reziduí představuje zdravotní riziko. Vědecké studie poukazují na rizika spojená s vyšším výskytem nádorových onemocnění, alergií, narušení hormonální rovnováhy a reprodukčních poruch v populaci. Dalším významným problémem spojeným s používáním syntetických pesticidů je vznik rezistence patogenů k těmto přípravkům.

#### Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky odstraňuje fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje stabilní formu esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* v podobě mikrokapiček esenciálního oleje, které jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan v poměru 3:10, přičemž pro ochranu rostlin slouží přímo tato suspenze a to pro obilniny v dávce 200 až 400 l fungicidního prostředku na 1 ha, kdy ve 100 ml fungicidního prostředku je obsaženo 0,5 až 1,5 ml esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, 8,5 až 9,5 ml řepkového oleje na ředění esenciálního oleje, 13,4 ml biopolymeru tvořícího obal mikrokapiček a 76,6 ml trypolyfosfátu sodného.

Podstata technického řešení dále spočívá ve výrobě fungicidního prostředku, kdy do nádoby bylo odměřeno 15 ml 10% hmotn. esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného v řepkovém oleji, k němuž bylo přidáno 300 µl přípravku polyethylenglykol sorbitanu monooleátu a tato směs byla emulgována pomocí homogenizátoru při 18 000 až 22 000 rpm po dobu 3 minut, dále bylo přidáno 20 ml biopolymeru želatiny a chitosanu a směs byla emulgována při 20 000 rpm po dobu 3 minut, pak byla do jiné nádoby obsahující 114,7 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného o hodnotě pH

5,0 pomalu vlita připravená emulze a to při 18 000 až 22 000 rpm a následně promíchána ještě další 3 minuty.

Fungicidní prostředek podle technického řešení je charakterizován tím, že slouží k ochraně rostlin proti *Pyrenophora teres*, *Blumeria graminis* a *Fusarium culmorum* pro potřeby ekologických a integrovaných systémů pěstování obilnin.

Fungicidní prostředek podle technického řešení byl vyroben tak, kdy do nádoby bylo odměřeno 15 ml 10% hmotn. esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného v řepkovém oleji, k němuž bylo přidáno 300 µl přípravku polyethylenglykol sorbitanu monooleátu a tato směs byla emulgována pomocí homogenizátoru při 18 000 až 22 000 rpm po dobu 3 minut, dále bylo přidáno 20 ml biopolymeru želatiny a chitosanu a směs byla emulgována při 20 000 rpm po dobu 3 minut, pak byla do jiné nádoby obsahující 114,7 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného o hodnotě pH 5,0 pomalu vlita připravená emulze a to při 18 000 až 22 000 rpm a následně promíchána ještě další 3 minuty.

Aplikace fungicidního prostředku podle technického řešení umožňuje omezit negativní vliv napadení rostlin houbovými patogeny a to s ohledem na dobrý zdravotní stav ošetřených rostlin a fytotoxicitu. Fungicidní prostředek byl optimalizován i z hlediska retence v čase, respektive doby, po kterou je účinnost prokazatelná a rovněž z pohledu fytotoxicity nové formulace. Esenciální olej je formulován ve třech fázích. V první fázi je připravena emulze 10% esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného pomocí řepkového oleje pomocí mísení při 20 000 otáčkách za minutu pomocí homogenizátoru po dobu 3 minut. Ve druhé fázi jsou pak vzniklé mikrokapičky o velikosti 20 až 40 µl obaleny biopolymerem sestaveného z želatiny a chitosanu. Želatinu 8 g/200 ml je nutné nejprve rozpustit v destilované vodě pomocí magnetické míchačky vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za minutu pomocí teflonového magnetického míchadla, dále je do želatiny přimíchán sorbitol v množství 0,15 g/g želatiny a rovněž pak glycerol v množství 0,15 ml/g želatiny.

Takto připravenou směs je nutné míchat až do kompletního rozpuštění všech komponent a to pomocí magnetické míchačky vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za minutu pomocí teflonového magnetického míchadla.

Chitosan 2 g/60 ml je nutné nejprve rozpustit v 0,15 M kyselině octové a pomocí magnetické míchačky vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za minutu pomocí teflonového magnetického míchadla.

V dalším kroku je nutné připravit biopolymer a to smísením rozpuštěné želatiny a chitosanu v poměru 3:10 pomocí magnetické míchačky vybavené termostatem při 45 °C a 150 otáčkách za minutu pomocí teflonového magnetického míchadla.

Takto připravený fungicidní prostředek podle technického řešení je pak použitelný pro ochranu rostlin proti výše uvedenému patogenu.

Vzhledem k výše uvedeným aspektům v dosavadním popisu techniky a integraci produkce obilovin je nezbytně nutné vytvářet nové prostředky ochrany rostlin pro integrované a ekologické způsoby produkce zemědělských komodit. Průmyslová využitelnost je tedy společensky žádaná a je tedy dobrý předpoklad pro extrapolaci těchto prostředků do praxe. Tento vynález je určen zejména pro organizace činné ve výrobě a uvádění na trh nových podpůrných látek v oboru ochrana a pěstování rostlin. Nový fungicidní prostředek podle technického řešení umožní aplikaci esenciálního oleje tak, aby byla prodloužena jeho účinnost a nedocházelo k jeho znehodnocení slunečním svitem a v otevřeném prostředí na povrch rostlin s dostatečnou reziduální účinností.

Na přiloženém výkresu je na Grafu 1 zobrazeno poškození listů obilovin houbou *Pyrenophora teres* v jednotlivých variantách ošetření.

Fungicidní prostředek podle technického řešení byl původci s úspěchem ověřen v praxi při testech přihlašovatelů, kterými jsou Česká zemědělská univerzita v Praze, CZ, a Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž, CZ.

Následující příklady provedení fungicidní prostředek podle technického řešení pouze dokládají, ale nijak neomezují.

## Příklady provedení

### Příklad 1

Fungicidní prostředek podle technického řešení byl připraven následujícím způsobem:

Do 100ml kádinky bylo nalito 15 ml 10% hmotn. esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* ředěného v řepkovém oleji.

Připipetovalo se 300  $\mu$ l přípravku polyethylenglykol sorbitan monooleát (TWEEN 80) (Sigma Aldrich P1754).

Směs byla emulgována pomocí homogenizátoru DI 25 basic (IKA) při 20 000 rpm po dobu 3 minut

Dále byl připipetováno 20 ml biopolymeru z chitosanu a želatiny v jejich vzájemném poměru 3:10.

Směs byla emulgována v homogenizátoru při 20 000 rpm po dobu 3 minut.

Do vysoké 250ml kádinky bylo připraveno 114,7 ml 0,5% hmotn. roztoku trypolyfosfátu sodného (TPP) (Sigma Aldrich T5633) o hodnotě pH 5,0.

Do roztoku TPP byl pomalu vlit obsah 100 ml kádinky.

Při lití roztoku TPP nutno emulgovat při 20 000 rpm a následně ještě další 3 minuty emulgovat stejným způsobem.

Účinnost nového fungicidního prostředku podle technického řešení byla ověřena v experimentu ve skleníkových podmínkách společně s dalšími vybranými fungicidními prostředky označenými A, B, G, D, přičemž prostředek A je předmětem tohoto technického řešení. Vždy 168 rostlin (28 kultivačních nádob po 6-ti rostlinách) jarního ječmene (*Hordeum vulgare*) odrůda Prestige (náchylná k *Pyrenophora teres*) v každé variantě ošetření byla ve fázi dvou listů ošetřena jednotlivými formulacemi a to postřikem na list fungicidním prostředkem v koncentraci 10 % hmotn. koacervátu a cílové koncentraci 1 % hmotn. Před aplikací byly rostliny uměle inokulovány směsí konidií a fragmentů mycelia *Pyrenophora teres* - 12 virulentních izolátů získaných v roce 2015 z ječmenů na území České republiky. Tím bylo zabezpečeno, že napadení rostlin bude dostatečné pro vyhodnocení účinnosti jednotlivých

variant ošetření. Součástí experimentu byla i varianta kontrolní bez ošetření a také varianta se standardním syntetickým fungicidem jako standardem.

Dosažené výsledky jsou znázorněny v grafu 1, kde je uvedeno procento poškození listů houbou *Pyrenophora teres* v jednotlivých variantách ošetření. Nejlepší účinnosti dosáhl standard. U variant s ošetřením jednotlivými fungicidními prostředky bylo dosaženo významného potlačení rozvoje napadení listů houbou *Pyrenophora teres*.

### Příklad 2

Účinnost nového fungicidního prostředku podle technického řešení byla ověřena v dalším experimentu v polních podmínkách experimentu společně s dalšími vybranými fungicidními prostředky označenými A, B, G, D, přičemž prostředek A je předmětem tohoto technického řešení. V polním experimentu byla vyseta odrůda jarního ječmene Malz náchylná k *Blumeria graminis*. Aplikace fungicidních prostředků byla provedena postřikem na list ve fázi objevení se praporcového listu. Všechny čtyři prostředky byly aplikovány postřikovačem na list. Do experimentálního schématu byla zařazena varianta kontrolní (voda) a také varianta se standardním fungicidem (Hutton 0,8 l.ha<sup>-1</sup>, Prothioconazole 100 g/l, Spiroxamine 250 g/l, Tebuconazole 100 g/l). Všechny varianty byly založeny ve 4 opakováních s parcelami o rozměru 10 m<sup>2</sup> náhodně rozmístěnými. Hodnocení bylo provedeno ve fázi mléčné zralosti. Bylo hodnoceno vždy 40 listů v každé variantě v listových pater F-2 a F-3.

Dosažené výsledky jsou znázorněny v tabulce 1. Aplikací fungicidního prostředku podle technického řešení A bylo dosaženo významné redukce poškození listů patogenem *Blumeria graminis*, odrůda jarního ječmene Malz.

Tabulka 1

Varianta	List F-2	List F-3	průměr	účinnost
Kontrola	3,50	30,09	16,79	-
Hutton	0,00	4,11	2,05	87,76
A	0,12	23,01	11,56	31,14

<i>B</i>	0,53	26,78	13,65	18,69
<i>G</i>	0,37	27,70	14,03	16,43
<i>D</i>	0,22	26,13	13,17	21,55
průměr	0,79	22,97	11,88	-

### Příklad 3

Účinnost nového fungicidního prostředku podle technického řešení byla ověřena v dalším experimentu v polních podmínkách experimentu společně s dalšími vybranými fungicidními prostředky označenými A, G, D, přičemž prostředek A je předmětem tohoto technického řešení. V polním experimentu byla vyseta pšenice ozimá odrůda Bohemia. Před provedením aplikace fungicidních prostředků v růstové fázi kvetení byla provedena i umělá inokulace rostlin makrokonidii virulentního kmene *F. culmorum*. Aplikace fungicidních prostředků byla provedena postřikem do klasů. Do experimentálního schématu byla zařazena varianta kontrolní (voda) s inokulací a varianta kontrolní bez inokulace. Dále varianta se standardním fungicidem (Prosaro 0,75 l.ha<sup>-1</sup>, Prothioconazole 125 g/l, Tebuconazole 125 g/l). Všechny varianty byly založeny ve 4 opakováních s parcelkami náhodně rozmístěnými. Hodnocení bylo provedeno ve fázi mléčně voskové zralosti. Bylo hodnoceno vždy 80 klasů v každé variantě. Po sklizni bylo zrno odesláno ke stanovení obsahu mykotoxinu deoxynivalenol (DON) pomocí metody ELISA.

Dosažené výsledky jsou znázorněny v tabulce 2. Aplikací fungicidního prostředku podle technického řešení A bylo dosaženo významné snížení obsahu mykotoxinu.

Tabulka 2

Varianta	% <i>napadení</i> <i>klasů</i>	účinnost	DON µg.kg <sup>-1</sup>	účinnost
<b>Kontrola inokulace ano</b>	7,00	-	4861,2	-
<b>Prosaro</b>	0,00	100	508,5	89,53
<b>A</b>	3,00	57,14	1588,0	67,33

<b>G</b>	6,00	14,28	2458,0	49,43
<b>D</b>	6,00	14,28	2705,5	44,34
<b>Kontrola inokulace ne</b>	0,0	100*	52,5	98,92*
<b>průměr</b>	-	-	2028,95	-

\* hvězdičkou označená hodnota neudává účinnost aplikace, pouze vyjadřuje efekt neprovedení inokulace

### Průmyslová využitelnost

Nový stabilní fungicidní prostředek na ochranu rostlin proti houbovým patogenům na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* je charakterizován tím, že mikrokapsičky esenciálního oleje jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan, dále se řešení týká i výroby těchto mikrokapsulí. Pro ochranu rostlin lze použít tuto suspenzi a to pro obilniny v koncentraci 10 % hmotn. koacervátu a v následném ředění 1 % hmotn. esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* do postřikové jíchy a to v dávce 300 l/ha. Fungicidní prostředek je účinný k ochraně rostlin proti houbovým patogenům *Pyrenophora teres*, *Blumeria graminis* a *Fusarium culmorum* pro potřeby ekologických a integrovaných systémů pěstování obilnin.

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, **vyznačující se tím**, že obsahuje stabilní formu esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* v podobě mikrokapiček esenciálního oleje, které jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan v poměru 3:10, přičemž pro ochranu rostlin slouží přímo tato suspenze a to pro obilniny v dávce 200 až 400 l fungicidního prostředku na 1 ha, kdy ve 100 ml fungicidního prostředku je obsaženo 0,5 až 1,5 ml esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, 8,5 až 9,5 ml řepkového oleje na ředění esenciálního oleje, 13,4 ml biopolymeru tvořícího obal mikrokapiček a 76,6 ml trypolyfosfátu sodného.

Graf 1

