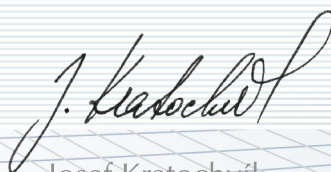




ČESKÁ REPUBLIKA
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ



Josef Kratochvíl
předseda
Úřadu průmyslového vlastnictví

Úřad průmyslového vlastnictví

udělil podle § 34 odst. 3 zákona č. 527/1990 Sb., v platném znění,

PATENT

číslo

309426

na vynález uvedený v příloženém popisu.

V Praze dne: 22.12.2022

Za správnost:

Barbora Kronková
oddělení rejstříků

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-561**
(22) Přihlášeno: **13.12.2021**
(40) Zveřejněno: **28.12.2022**
(Věstník č. 52/2022)
(47) Uděleno: **18.11.2022**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **28.12.2022**
(Věstník č. 52/2022)

A01P 17/00 (2006.01)
A01N 31/06 (2006.01)
A01N 43/16 (2006.01)
A01N 31/02 (2006.01)
A01N 31/08 (2006.01)
A01M 1/02 (2006.01)
A01M 5/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
SCHIEBE, Christian, et al. Semiochemical diversity diverts bark beetle attacks from Norway spruce edges; DOI: 10.1111/j.1439-0418.2011.01624.x. Journal of Applied Entomology. Wiley-Blackwell, Berlin, December 2011, Vol. 135, No. 10, p. 726-737, ISSN 1439-0418 (on-line), str. 728, 733-735;
RAFFA, K. F.; ANDERSSON, Martin N.; SCHLYTER, Fredrik. Advances in insect physiology; "Host selection by bark beetles: playing the odds in a high-stakes game". Oxford. Academic Press, 2016, p. 1-74, ISBN 978-0-12-802723-3, str. 20-21, tabulka 1; SCHIEBE, Christian, et al. Styrene,(+)-trans-(1R, 4S, 5S)-4-thujanol and oxygenated monoterpenes related to host stress elicit strong electrophysiological responses in the bark beetle *Ips typographus*. Journal of chemical ecology; <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01070-8>. Springer, 2019-05-04, p. 474-489, ISSN 1573-1561 (web), str. 480, 483 tabulka 2, 484, 487.
US 6217891 A.

(73) Majitel patentu:
Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 6,
Suchbát, CZ

(72) Původce:
Ing. Anna Jirošová, Ph.D., Praha 5, Zličín, CZ
Ing. Rastislav Jakuš, Ph.D., Zvolen, SK
Ing. Roman Modlinger, Ph.D., Řevnice, CZ
prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D., Únětice, CZ
prof. Fredrik Schlyter, Lund, SE

(74) Zástupce:
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Okružní
2824, 370 01 České Budějovice, České Budějovice
3

(54) Název vynálezu:
**Přípravek pro repelenci lýkožrouta
smrkového**

(57) Anotace:
Přípravek pro repelenci lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) obsahující směs anti-atraktantů ze skupiny: *trans*-conophthorin, 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-hexanol, 1,8-cineol a *trans*-4-thujanol, a to v množství odpovídajícím koeficientu odparu *trans*-conophthorinu od 0,3 do 0,6 mg/den, 1-okten-3-olu od 15 do 25 mg/den, 3-oktanolu od 15 do 25 mg/den, 1-hexanolu od 15 do 25 mg/den, 1,8-cineolu od 25 do 50 mg/den a *trans*-4-thujanol od 1 do 30 mg/den. Ve výhodném provedení obsahuje přípravek *trans*-4-thujanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 10 do 30 mg/den. Přípravek neobsahuje verbenon a má formu směsi anti-atraktantů nebo sady jednotlivých anti-atraktantů určených ke společnému použití.

Přípravek pro repelenci lýkožrouta smrkového

Oblast techniky

5

Vynález se týká oblasti ochrany jehličnatých stromů čeledi borovicovité (*Pinaceae*), zejména smrku ztepilého (*Picea abies*) a konkrétně se týká přípravku pro repelenci lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*).

10

Dosavadní stav techniky

Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*; *Coleoptera*) je v současnosti ve střední Evropě lesnický nejvýznamnější hospodářský škůdce smrkových porostů současnosti. Pro účely této přihlášky bude-li dále v textu uváděn „lýkožrout“, znamená to lýkožrout smrkový (*Ips typographus*). Nejohroženější jsou především smrkové porosty tvořené jím preferovanou dřevinou smrkem ztepilým (*Picea abies*) pěstovaným mimo oblasti přirozeného rozšíření. Pro účely této přihlášky bude-li dále v textu uváděn „smrk“, znamená to smrk ztepilý (*Picea abies*). Ve většině případů lýkožrout napadá především oslabené stromy, jako např. polomy a vývraty, které mají nižší schopnost odolat náletu lýkožrouta. V případě abiotických vlivů, jako jsou opakující se období sucha nebo větrné kalamity, dochází k výraznému exponenciálnímu šíření tohoto škůdce. Tento škůdce poté napadá i zdravé stromy či i jiné druhy jehličnatých stromů. To vede k odumírání nejen jednotlivých stromů, ale také k devastaci velmi rozsáhlých území smrkových porostů. Lýkožrout se vyskytuje spíše na vzrostlých stromech, protože potřebuje silnější vrstvu lýka pro vývoj larev. Napadá smrky starších věkových tříd, tzn. 60 let a výše. Mladší porosty mívají a objevuje se zde, až když dojde k silnému přemnožení. Lýkožrout komunikuje se zástupci svého druhu pomocí produkce agregačního feromonu. Tím láká samce i samice, aby při společném náletu byli schopni překonat obranu hostitelského stromu. Lýkožrout dle čichových vjemů rozeznává rovněž vhodný, nebo nevhodný habitat k rozmnožování. Některé chemické látky produkované například listnatými stromy, nebo jinými zdroji z jejich životní niky působí proti lýkožroutům repelentně.

Předepsaným způsobem, jak zabránit přemnožení populace lýkožroutů je soustavné vyhledávání, vyznačení, evidence, kácení stromů a včasné zpracování včetně asanace napadeného dříví. Podpůrnými prostředky používanými k managementu a monitoringu populace lýkožrouta je soustředění a hubení lýkožrouta v ohniscích žíru a na dalších ohrožených místech. K tomu se používá kladení lapáků. Lapák je pokácený zdravý smrk, který je atraktivní pro nálet lýkožrouta. Dále se používají otrávené lapáky, kdy jsou stromy či polena ošetřena insekticidem, či feromonové lapače, do kterých je umístěn agregační feromon lýkožrouta.

Asanace napadeného dříví ve snaze zabránit další generaci lýkožroutů opustit napadený strom, se provádí mechanickými technikami, a to především odstraněním takového dříví z lesa, štěpkováním, nebo například odkorněním. V kalamitních situacích se rovněž aplikuje chemická asanace postřikáním napadených kmenů insekticidy. Vzhledem k závažným ekonomickým a ekologickým důsledkům přemnožení lýkožroutů se dynamicky vyvíjejí nové metody ochrany jehličnatých stromů.

Ekologicky přijatelnější alternativou k používání syntetických insekticidů v managementu lýkožroutů může být aplikace tzv. semiochemikálií. Tyto látky lýkožrouty buď přitahují jako např. feromon, nebo je odpuzují, jako jsou specifické repelenty či anti-atraktanty přirozeně se vyskytující v ekologické nise lýkožroutů. U škodlivých druhů kůrovců na americkém kontinentě byly vyvíjeny metody ochrany lesa založené na kombinaci jak přitažlivosti feromonu, tak odpudivosti těchto repelentně působících anti-atraktantů.

Anti-atraktanty mají za úkol odpuzovat kůrovce od zdravých, nenapadených stromů, na kterých jsou tyto anti-atraktanty aplikovány. Aplikován je alespoň jeden anti-atraktant v blízkosti stromu

nebo na něm. Anti-atraktantem se rozumí taková látka, která svým pachem odpuzuje lýkožrouta od zdravých nenapadených stromů. Takové řešení je popsáno např. v dokumentu US 6217891 B1. Dokument popisuje řadu těkavých látek s anti-atraktivními účinky proti kůrovci, zejména druhů z amerického kontinentu *Dendroctonus ponderosae*, *Dendroctonus rufipennis*, *Dendroctonus pseudotsugae*, *Ips pini*, a *Dryocoetes confusus*. V dokumentu je uvedena repelentní kompozice obsahující alespoň jednu složku ze skupiny: toluen, pentanol, 2-hexanon, 3-hexanon, heptanal, benzaldehyd, 2-hydroxycyklohexanon, benzyl alkohol, (*E*)-ocimen, salicylaldehyd, conophthorin, guaiacol, nonanal, methylsalicylát, dekanal, thymolmethylether, (*E*)-nerolidol nebo dendrolasin, alespoň jednu složku z: látek ze zelených listů vybraných z: hexanal, (*E*)-2-hexenal, 1-hexanol, (*E*)-2-hexen-1-ol, (*Z*)-2-hexen-1-ol, a (*Z*)-3-hexen-1-ol, a alespoň jednu složku z: verbenon and 3-methylcyklohex-2-en-1-on. Látky jsou používány samostatně nebo ve formě směsi. Jednou z komponent uvedené směsi je verbenon, což je látka produkovaná stromy v případě plného obsazení lýkožrouty, nebo příbuznými druhy kůrovci. Tato látka způsobuje, že další lýkožrouti nenapadnou tentýž strom.

Studium použití anti-atraktantů konkrétně na ovlivnění mortality smrků v důsledku napadení lýkožroutem bylo popsáno pro směs obsahující látky *trans*-conophthorin, látky z listů (1-hexanolu) a kůry listnatých stromů (1-okten-3-ol a 1-oktanol) a látku vyskytující se při plném obsazení stromu lýkožroutem, konkrétně verbenon (Schiebe C, et. al., *Semiochemical diversity diverts bark beetle attacks from Norway spruce edges*, *Journal of Applied Entomology*, 2011, 135: 726-737). Snížení napadení na plochách se pohybovalo v rozmezí 35 až 76 % ve srovnání s kontrolními plochami, ale byl pozorován tzv. "switch" efekt, kdy aplikace anti-atraktantů, především verbenonu, může nekontrolovaně vytlačit lýkožrouty na stromy mimo ošetřené plochy.

Jiný článek popisuje testování účinnosti repelentních přípravků na lýkožrouta, přičemž tyto repelentní přípravky byly tvořeny buď verbenonem samotným nebo jeho směsí s přísadkou nehostitelských alkoholů, látek z listů, či látek z kůry listnatých stromů. (Jakuš, R., et al., *Overview of development of an anti-attractant based technology for spruce protection against Ips typographus: From past failures to future success*, *Anzeiger für Schadlingskd.*, 2003, 76: 89-99). Tento článek se převážně zabýval pokusy s jednotlivými látkami, které probíhaly v terénu s cílem ochránit stromy čeledi borovicovitých (*Pinaceae*). Pro účely této přihlášky bude-li dále v textu uváděna „čeleď borovicovitá“, znamená to čeleď borovicovitá (*Pinaceae*).

Nevýhodou výše popsaných přípravků je, že všechny obsahují verbenon, což je látka, produkovaná při plném obsazení a vyčerpání stromu lýkožrouty. Verbenon se tvoří i při obsazení jehličnatých stromů jinými druhy kůrovci. Pokud je tedy tímto přípravkem ošetřen jeden strom, je to pro lýkožrouta signál, že ošetřený strom je již obsazen a vyčerpán a on má hledat zdravý strom v okolí.

Úkolem vynálezu je připravit takový přípravek na bázi anti-atraktantů k ochraně čeledi borovicovitých a konkrétně smrků proti napadení lýkožroutem, který by byl vhodný v lesnictví pro ochranu plošných zapojených lesních porostů. Přípravek by byl dále vhodný pro ochranu porostních stěn v porostech čeledi borovicovitých, které jsou obvyklými prvními cíli lýkožrouta v porostech, a tvoří tak ohniska jeho šíření. Dále je úkolem vynálezu připravit přípravek proti napadení lýkožroutem využitelný v arboristice či například při ochraně jednotlivých smrků ve veřejných parcích, nebo využitelný pro ochranu stromů z jiných čeledí borovicovitých. Přípravek by měl mít větší rádius působnosti v lesích než dosavadně používané přípravky, tzn. měl by působit na stromy v širším okolí aplikace přípravku, a měl by s menší pravděpodobností způsobovat vznik nových ohnisek za hranicí ochranného rádiu, přičemž by měl být zachován nebo zvýšen jeho efekt na odpuzení lýkožrouta. Zvětšení rádiu působnosti by také snížilo náklady na přípravu a výrobu přípravku.

Podstata vynálezu

Vytčený úkol je vyřešen pomocí přípravku pro repelenci lýkožrouta, který obsahuje alespoň jeden anti-atraktant ze skupiny: *trans*-conophthorin, 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-hexanol a 1,8-cineol. Podstata vynálezu spočívá v tom, že přípravek obsahuje právě všechny anti-atraktanty ze skupiny: *trans*-conophthorin, 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-hexanol, 1,8-cineol a že přípravek dále obsahuje *trans*-4-thujanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 1 do 30 mg/den. Přidání právě takového množství *trans*-4-thujanolu zabezpečuje zvýšený efekt inhibičního účinku přípravku proti lýkožroutovi.

Pojem „inhibiční účinek“ je definován jako procentuální snížení odchytů lýkožrouta, bude-li ve feromonovém lapači kombinace definované dávky feromonu lýkožrouta v kombinaci s testovanou směsí anti-atraktantů vůči odchytům na stejné definované množství feromonu umístěném v lapači samostatně.

Ve výhodném provedení obsahuje přípravek *trans*-conophthorin v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 0,3 do 0,6 mg/den, dále obsahuje alkoholovou složku zahrnující 1-okten-3-ol, 3-oktanol a 1-hexanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu alkoholové složky od 45 do 75 mg/den, dále obsahuje 1,8-cineol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 25 do 50 mg/den a *trans*-4-thujanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 10 do 30 mg/den. Přípravek o takovém množství odpovídajícím vybranému koeficientu odparu zabezpečuje synergický efekt všech látek a tedy zvyšuje ochranu zdravých stromů čeledi borovicovitých, a dále se zvyšuje rádius působnosti přípravku oproti použití kombinace vybraných anti-atraktantů, zejména díky přidavku látky *trans*-4-thujanolu a absenci verbenonu. Přípravek vydává repelentní signál v takovém rozsahu, že lýkožrout nenapadá ani stromy za hranicí ochranného pásma.

Pojem „koeficient odparu“ je definován jako hmotnost látky, která se odpaří za den za standardních podmínek, tj. teplota ovzduší 22 °C a rychlost větru 0,5 m/s.

Přesná definice jednotlivých anti-atraktantů je specifikována v následující tab. 1:

Tab. 1: Chemické látky použité ve směsi pro ochranu stromů, identifikované pomocí registračního čísla CAS, převzatého z „chemical abstract service registry number“ dále jen CAS. V tabulce jsou rovněž uvedeny CAS enantiomerů těchto látek, u kterých byla určena biologická aktivita pro lýkožrouta smrkového.

Látka	CAS látek použitých pro ochranu smrků	Název biologicky aktivních enantiomerů	CAS biologicky aktivních enantiomerů
<i>trans</i> -conophthorin	73046-13-6	(5S,7S)-[(E)-7-methyl-1,6-dioxaspiro[4.5]dekan]	68108-90-7 77715-03-8
1-okten-3-ol	3391-86-4	(-)-1-okten-3-ol	3684-48-7
3-oktanol	589-98-0	(+)-3-oktanol	22658-92-0
1-hexanol	111-27-3		
1,8-cineol (eukalyptol)	470-82-6		
<i>trans</i> -4-thujanol (sabinen hydrát)	546-79-2	(+)- <i>trans</i> -4-thujanol	7712-82-5

Ve výhodném provedení je v přípravku v alkoholové složce obsažen 1-okten-3-ol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 15 do 25 mg/den, 3-oktanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 15 do 25 mg/den a 1-hexanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 15 do 25 mg/den.

Ve výhodném provedení má přípravek formu směsi anti-atraktantů určené k formulaci do jednoho odparníku, zejména pro použití na stromy čeledi borovicovité starší 50 let. V jiném výhodném provedení má přípravek formu sady jednotlivých anti-atraktantů určených ke společnému použití, přičemž jednotlivé látky jsou uloženy v jednotlivých odparnících, které jsou následně umístěné na stromy čeledi borovicovité tak, aby na každém vybraném stromu čeledi borovicovité byli přítomny odparníky obsahující každou z výše popsaných látek.

V dalším výhodném provedení je v přípravku obsažen dále antioxidant v množství od 0,3 do 0,7 % hmotn. Použitým antioxidantem je 2,6-di-*terc*-butyl-4-methylfenol nebo 2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-benzendiol.

Přípravek je vhodný k repelenci lýkožrouta od stromů čeledi borovicovité. S výhodou lze přípravek využít pro repelenci lýkožrouta od smrku ztepilého.

Předmětem vynálezu je i způsob aplikace přípravku, při kterém se přípravek obsahující směs anti-atraktantů umístí do odparníku, nebo jednotlivé anti-atraktanty ze sady anti-atraktantů určených ke společnému použití se umístí do jednotlivých odparníků tvořících sadu odparníků. Odparník nebo sada odparníků se následně umístí na povrch kmenů individuálních stromů čeledi borovicovité.

Ve výhodném provedení způsobu aplikace přípravku je odparník nebo sada odparníků umístěna na povrch stromu čeledi borovicovité ve výšce od 1,5 do 5 m. Výška uložení je výhodná zejména vzhledem k osobě odpovědné za pověšení odparníků na strom, přičemž se jedná o výšku, kdy není potřeba použít žebříku pro pověřenou osobu.

V dalším výhodném provedení způsobu aplikace přípravku je směs anti-atraktantů umístěna na povrch stromu čeledi borovicovité, který je starší 50 let a je součástí zapojeného lesního porostu tvořeného z více než 50 % stromy čeledi borovicovité. Stromy, na kterých jsou umístěny odparníky nebo sada odparníků jsou od sebe vzdáleny maximálně 15 m.

Pojem „zapojený lesní porost“ je definován jako porost dřevin, v němž se jejich nadzemní části vzájemně dotýkají, prorůstají nebo překrývají, a obvod kmene jednotlivých dřevin měřený ve výšce 130 cm nad zemí nepřesahuje 80 cm; jestliže některá z dřevin v porostu přesahuje uvedené rozměry, posuzuje se vždy jako jednotlivá dřevina.

V dalším výhodném provedení aplikace přípravku je směs anti-atraktantů umístěna na povrch stromu čeledi borovicovité, který je starší 50 let a je součástí první nebo druhé řady porostní stěny směrem od mýtiny. Stromy, na jejichž površích jsou umístěny odparníky nebo sada odparníků, jsou od sebe vzdáleny maximálně 15 m. Taková vzdálenost poskytuje ochranu stromů čeledi borovicovité v případě nízkého, středního i vysokého stupně napadení porostu stromů lýkožroutem v dané oblasti.

Pojem „porost“ je definován jako plošně souvislá část lesa, odlišující se druhovou, věkovou či prostorovou skladbou, kategorií lesů nebo odlišným hospodařením. Minimální výměra porostů je nejméně 0,20 ha.

Pojem „porostní stěna“ je definován jako okraj zapojeného lesního porostu, který vznikl v důsledku působení škodlivých činitelů, nebo v důsledku odtěžení části porostu, čímž jsou stromy na tomto okraji vystaveny změněným podmínkám, které mohou vyvolat různé typy stresu.

V dalším výhodném provedení způsobu aplikace přípravku je směs anti-atraktantů umístěna do odparníku, nebo sady odparníků na povrch individuálních stromů čeledi borovicovité, na fragmenty porostů, na samostatně stojící stromy, či na výstavky k jejich ochraně před napadením lýkožroutem. Stromy netvoří zapojený porost a jsou v libovolném věkovém rozmezí. Takové uspořádání a rozmístění odparníků je vhodné v případě prevence před napadením lýkožroutem samostatně stojících stromů z čeledi borovicovitých nebo porostních fragmentů tvořených stromy této čeledi.

Pojem „fragmenty porostů“ je definován jako zbytek porostů, které byly v míře větší než 50 % zničeny škodlivými činiteli.

Pojem „výstavek“ je definován jako solitérní strom, záměrně ponechaný na mýtině. Obvykle jde o jedince generativního, semenného původu, mimořádné vitality, tvárnosti a kvality.

Výhody přípravku pro repelenci lýkožrouta podle tohoto vynálezu spočívají zejména v tom, že je na bázi anti-atraktantů, s přídavkem látky zvyšující účinnost *trans*-4-thujanol, a bez dosud přidávaného verbenonu. Přípravek má díky tomu větší radius působnosti v lesích než dosavadně testované přípravky, tzn. působí i na stromy v okolí aplikace přípravku, přičemž zachovává nebo zvyšuje jeho efekt na odpuzení lýkožrouta. Další výhodou přípravku pro repelenci lýkožrouta podle tohoto vynálezu spočívá v tom, že zvětšení radiusu působnosti také snižuje náklady na přípravu a výrobu přípravku. Další výhodou přípravku je, že je vhodný pro ochranu stromů proti napadení lýkožroutem v lesnictví, a to zejména pro ochranu zapojených lesních porostů i čerstvých porostních stěn v porostech smrku, které jsou obvyklými prvními cíli lýkožrouta v porostech, a tvoří tak ohniska jeho šíření, nebo pro ochranu výstavků na mýtinách. Dále je přípravek vhodný k použití v arboristice či například ve veřejných parcích, kde je potřeba ochránit před napadením lýkožroutem jednotlivé smrky, dále jednotlivé stromy z jiných čeledí borovicovitých, popřípadě fragmenty porostů, nebo skupin stromů této čeledi.

Objasnění výkresů

Uvedený vynález bude blíže objasněn na následujících vyobrazeních, kde:

obr. 1 zobrazuje graf průměrů \pm směrodatných odchylek relativních odchyť lýkožrouta, zobrazující synergický efekt látek, ze kterých je přípravek složen;

obr. 2 zobrazuje graf průměrů \pm směrodatných odchylek relativních odchyť lýkožrouta, zobrazující optimalizaci vhodné dávky přídavku *trans*-4-thujanolu ke směsi vybraných anti-atraktantů, vyjádřenou koeficientem odparu;

obr. 3 zobrazuje graf pro počet odchycených jedinců lýkožrouta v lapačích obsahujících přípravek podle vynálezu spolu s agregačním feromonem a kontrolních lapačích obsahujících samotný agregační feromon při ochraně fragmentů lesa;

obr. 4 zobrazuje graf počtu smrků napadených lýkožroutem v 10 třídách vzdálenosti od dvou řad stromů na čerstvých porostních stěnách, které byly ošetřeny přípravkem.

Příklady uskutečnění vynálezu

Obecný postup pro příklady 1 a 2, ve kterých byla studována účinnost testovaných látek s použitím feromonových lapačů

Studie byly provedeny ve Školním lesním podniku České zemědělské univerzity v Kostelci nad Černými lesy na jihovýchodě Prahy, v České republice. Experiment probíhal od 14. 06. 2021 do

28. 06. 2021, na pasece vzniklé po asanaci stromů napadených lýkožroutem v roce 2020. Paseka byla dlouhá 300 m a široká 100 m. Lesní porost obklopující paseku byl převážně složený z dospělých smrků v přibližném věku 70 let.

- 5 Bariérové feromonové lapače Ecotrap firmy Fytofarm, Slovensko, byly postaveny v řadě ve vzdálenosti 15 m jeden od druhého, kopírující porostní stěnu smrkového lesa ve vzdálenosti 30 m. Lapače byly namontovány na dřevěné tyče tak, aby byly zavěšeny ve výšce 1,5 m nad zemí. Do lapačů byly lákány lýkožrouti na směs agregačního feromonu lýkožrouta složenou z přípravku Pheagr IT Extra (SciTech s r.o., Česká republika) a dávky feromonu, která byla kombinována
- 10 v různých lapačích s různou kompozicí testovaných anti-atraktivních směsí, které dle své účinnosti snižovaly počty odchycených lýkožroutů. Testované varianty směsí dávkované z odparníků, jak je uvedeno v tab. 3 a tab. 6, byly pravidelně přemístovány z jednoho lapače do dalšího, aby se vyloučil efekt umístění lapačů na pasece na odchyt lýkožroutů. Rotační schéma přemístování
- 15 testovaných směsí látek bylo randomizováno dle schématu softwarově generovaného Latinského čtverce, příkladem je tab. 2. Označení A až G je pro jednotlivé kombinace odparníků, ze kterých se skládaly testované směsi. K přemístění testovaných směsí došlo, když v lapačích obsahujících směs anti-atraktivních a feromonu bylo nejméně 15 lýkožroutů. Výměny směsí v lapačích bylo stejné množství jako testovaných variant směsí (sedm pro příklad 1 a šest pro příklad 2) a dle rychlosti odchytu lýkožroutů, závislejících na počasí a jejich hustotě, se opakovaly po dvou až pěti dnech.
- 20 Před každou výměnou směsí v lapačích byli lýkožrouti odchyceni do jednotlivých lapačů, odebráni a uskladněni do lahvíček s etanolem. Po převozu do laboratoře byl spočten počet lýkožroutů odchycených na jednotlivé varianty testovaných směsí.

25 Tab. 1: Randomizace výměny testovaných směsí dle schématu softwarově generovaného Latinského čtverce.

Pozice pastí	I	II	III	IV	V	VI	VII
Výměna návnad							
1	F	G	C	B	E	D	A
2	B	A	F	C	G	E	D
3	D	B	E	F	A	C	G
4	C	D	A	E	B	G	F
5	E	F	G	A	D	B	C
6	G	C	B	D	F	A	E
7	A	E	D	G	C	F	B

Příklad 1: Testování synergického efektu látek v patentované směsi

- 30 Pro jednotlivé složky přípravku byly vyvinuty experimentální odparníky o určené nominální hodnotě, a jejich skutečný koeficient odparu byl zjištěn v laboratoři gravimetrickou metodou za standardních podmínek, tj. teplota 22 °C, rychlost větru 0,5 m/s, uvedeno v tab. 3.

- 35 V polním experimentu ve feromonových lapačích byla testována účinnost inhibičního účinku na odchyt lýkožroutů pro 7 různých variant návnad „směsí anti-atraktivních“, jak je uvedeno v tab. 4. Návnada all AAs se skládala z odparníků dle tab. 3 pro všechny vybrané anti-atraktivní a v lapači byla kombinována s feromonem lýkožrouta, složeného z přípravku Pheagr IT Extra (SciTech s r.o., Česká republika) a dávky feromonu (tab. 3.). V dalších lapačích byly testovány částečné návnady, kdy vždy z této plné směsi byla jedna z látek vyjmuta. Takové návnady byly čtyři, kdy byly
- 40 vyjmuty jednotlivé látky, nebo jejich skupiny (-Ci, -NHV-oly, -tC, -t4ol), a v lapačích byly rovněž kombinovány s feromonem lýkožrouta. Složení jednotlivých testovaných návnad je zobrazeno v tab. 4. Inhibiční účinek všech těchto návnad obsahujících různé kombinace anti-atraktivních byl porovnáván s odchty na stejnou dávku feromonu (Pher H) umístěnou v dalším lapači. V pokusu

byly dále testovány odchyty do prázdné pasti (Blank) jako kontrola, že lýkožrouti nepadali do pastí náhodně. Dle randomizační tab. 2 dle schématu Latinského čtverce bylo provedeno 7 přemístění variant návnad a tedy 7 opakování, kdy byli lýkožrouti vyjmuti z pastí. Použité dávkování anti-atraktantů bylo sníženo, pro získání přesnějších dat o inhibičním účinku směsi.

5

Pojem „all AAs“ je definován jako směs obsahující právě všechny anti-atraktanty ze skupiny: *trans*-conophthorin, 3-oktanol, 1-okten-3-ol, 1-hexanol, 1,8-cineol a *trans*-4-thujanol.

Pro jednotlivé anti-atraktanty ze směsi jsou používány následující zkratky:

- 10
- *trans*-conophthorin, zkratka: tC,
 - 3-oktanol, zkratka: 3ol,
 - 1-okten-3-ol, zkratka: oct,
 - 1-hexanol, zkratka: hex,
 - 1,8-cineol, zkratka: Ci,
 - 15 – *trans*-4-thujanol, zkratka: t4ol.
 - Nehostitelské alkoholy: NHV-oly.

Zkratky pro ostatní varianty návnad:

- 20
- Feromon lýkožrouta smrkového: Pher H.
 - Prázdny kontrolní lapač: Blank.

Tyto zkratky budou použity i v dalších příkladech provedení.

25 Tab. 2: Návrh přesných odparníků používaných při testování synergického efektu anti-atraktantů ve směsi, z níž je přípravek složen.

Semiochemikálie	Koeficient odparu [mg/den]		Počet použitých odparníků v polním pokusu	Design experimentálních odparníků
	Nominální hodnota	Laboratorní průměry ± SD		
<i>trans</i> -conophthorin (tC)	0,5	0,5 ±0,2	1	skleněná kapilára 100 µl Microcaps® utěsněná na jednom konci zubním voskem, naplněná kapalinou po 1 mm od otevřeného okraje, zavěšená vodorovně
NHV-oly: 1-hexanol (hex), 3-oktanol (3ol), 1-okten-3-ol (oct)	3	3,5 ±1,3	1	otevřená 730 PE lahvička (9730, Kartell, Itálie): 6 mm ID, 29 mm výška, naplněná 0,5 ml směsí alkoholů 1:1:1 v/v s antioxidanty <i>tert</i> -Butylhydrochinon TBHQ 0,5 % v/v, BHT – butylovaný hydroxytoluen 0,5 % v/v
1,8-cineol (Ci)	1	0,7 ±0,1	2	čirá skleněná lahvička autosampleru 2 ml šroubovací uzávěr s PTFE silikonovou přepážkou (Agilent USA) 2 mm otvor v přepážce
<i>trans</i> -4-thujanol (t4ol)	1	1,6 ±0,3	2	buničitá vata 2,5 x 5,5 x 0,25 cm zatavená v PE fólii 0,1 mm, naplněná 200 mg <i>trans</i> -4-thujanolu rozpuštěného ve pentanu, zatavená po odpaření pentanu

feromony lýkožrouta:				
2-methyl-3-buten-2-ol	100	42,2 ±20	1	uzavřená PE lahvička (731, Kartell, Itálie) s 2 mm otvorem ve víčku
cis-verbenol		1,5 ±0,8	1	uzavřená PE lahvička (731, Kartell, Itálie) 9 mm s otvorem ve víčku
Pheagr IT Extra		55 ±15	1	ipsdienol + (S)-cis-verbenol 4 + 42 g/kg v rozpouštědle 2-methyl-3-buten-2-ol/ průnik přes PE membránu

Tab. 3: Složení testovaných variant v návnadách pro testování synergického efektu směsi anti-atraktantů z přípravku.

Semiochemikálie	Kombinace testovaných anti-atraktantů v návnadách						
	A	B	C	D	E	F	G
	all AAs	-Ci	-NHV-oly	-tC	-t4ol	Pher H	Blank
<i>trans</i> -conophthorin (tC)	X	X	X	-	X	-	-
Alkoholy (NHV-oly): 1-hexanol (hex), 3-oktanol (3ol), 1-okten-3-ol (oct)	X	X	-	X	X	-	-
1,8-cineol (Ci)	X	-	X	X	X	-	-
<i>trans</i> -4-thujanol (t4ol)	X	X	X	X	-	-	-
feromony lýkožrouta:							
2-methyl-3-buten-2-ol	X	X	X	X	X	X	-
cis-verbenol	X	X	X	X	X	X	-
Pher H	X	X	X	X	X	X	-

5

V celém experimentu v průběhu sedmi opakování bylo odchyceno celkem 8266 lýkožroutů, z toho 1 102 ±1281 (průměr ± směrodatná odchylka neboli SD) lýkožroutů na jedno opakování. Relativní odchýty byly počítány jako podíl počtu odchycených lýkožroutů na konkrétní variantu návnady ku součtu všech odchycených lýkožroutů do všech sedmi pastí během jednoho opakování/výměny návnad. Průměry ± směrodatná odchylka relativních odchýt jsou zobrazeny k porovnání na obr. 1.

10

Statistické metody:

Statisticky byly porovnávány inhibiční účinky jednotlivých variant návnad obsahujících anti-atraktant k feromonu. Testování rozdílů oproti feromonu je uvedeno jenom u plné směsi neboli all AAs, porovnání ostatních variant nebylo cílem experimentu. Rozdíl v průměrných odchýtech na testované varianty návnad byl stanoven pomocí jejich souhrnných směrodatných odchýlek neboli SD, kdy byla počítána nekorigovaná „velikost účinku“ a „Hedgesova korigovaná velikost účinku h“ nadále „Hedges h“ (Hedges 1981; Maher et al. 2013; Nakagawa a Cuthill 2007). Hodnota Hedges h, je považována za silnou, pokud je >0,8.

20

Výsledky:

Plná směs anti-atraktantů neboli „all AAs“ ukázala největší inhibiční účinek odchýtu lýkožroutů vůči odchýtům na feromon. Odchýty na „all AAs + feromon“ byly o 96 ±2 % nižší než na samotný feromon, s vysokou hodnotou Hedges h -8,7.

25

Směs, ze které byl vyjmut *trans*-4-thujanol měla inhibiční účinek nižší než plná směs, kdy odchýty na „-t4ol + feromon“ byly o 88 ±4 % nižší než odchýty na feromon. Podobné hodnoty ukázala

směs, ze které byly vyjmuty tři nehostitelské alkoholy, souborně nazývané – NHV-oly, přičemž odchyty na “-NHV-oly + feromon” byly nižší o 84 ± 8 % než odchyty na samotný feromon.

5 V porovnání inhibičního účinku těchto dvou nejméně účinných směsí ku all AAs, mělo největší efekt na snížení účinku odebrání – t4ol (Hedges h 2,5) a odebrání – NHV-oly (Hedges h 2,4). Intervaly spolehlivosti Hedgesovy h se u těchto směsí překrývaly, uvedeno v tab. 5.

10 Bylo zjištěno, že směs anti-atraktantů včetně přídavku *trans*-4-thujanolu má prokazatelný inhibiční účinek na odchyty lýkožroutů na jejich agregační feromon. Přídavek *trans*-4-thujanolu podstatně zvyšuje inhibiční účinek přípravku oproti přípravkům, které tento anti-atraktant neobsahovaly.

15 Tab. 4: Nekorigované a "korigované Hedgesovy velikosti účinku" pro srovnání inhibičních účinků přípravku obsahujícího směs anti-atraktantů s vyjmutými jednotlivých anti-atraktantů vůči přípravku obsahujícího směs anti-atraktantů dle předkládaného vynálezu.

Testované směsi	Průměrný relativní odchyt (%)	SD	Průměrný rozdíl	Sdružená SD	Nekorigované velikosti účinku	korigované Hedgesovy velikosti účinku h	95% interval spolehlivosti h		p pro CI nezahrnující 0
							LCI	UCI	
all AAs	2,3	1,6	-67,6	7,1	-9,5	-8,7	-12,4	-6,8	***
Směs neobsahující:									
-Ci	4,8	1,9	2,5	1,8	1,4	1,3	0,1	2,6	*
-NHV-oly	10,8	4,4	8,4	3,3	2,6	2,4	0,9	3,8	**
-tC	4,0	3,0	1,7	2,4	0,7	0,6	-0,5	1,8	"NS"
- t4ol	8,1	2,5	5,7	2,1	2,7	2,5	1,0	4,0	**
Kontrolní pasti									
Pher H	70,0	10,0	N/A	N/A	N/A	N/A			
Blank	0,0	0,0	N/A	N/A	N/A	N/A			

Příklad 2: Optimalizace dávky *trans*-4-thujanolu

20 Cílem bylo zhodnotit vliv různých dávek *trans*-4-thujanolu na inhibiční účinek směsi anti-atraktantů snižujících odchyty lýkožroutů na jejich feromon a stanovit optimální účinnou dávku této látky přidávaného k základní směsi.

25 Pojem „základní směs“ neboli „5AA“ je definován jako směs obsahující právě všechny anti-atraktanty ze skupiny: *trans*-conophthorin, 3-oktanol, 1-okten-3-ol, 1-hexanol, 1,8-cineol a neobsahuje *trans*-4-thujanol.

30 Pro jednotlivé složky přípravku byly vyvinuty experimentální odparníky o určené nominální hodnotě, a jejich skutečný koeficient odparu byl zjištěn v laboratoři gravimetrickou metodou za standardních podmínek, tj. teplota 22 °C, rychlost větru 0,5 m/s, jak je uvedeno v tab. 6.

35 V polním experimentu v šesti feromonových lapačích byla testována účinnost šesti různých variant návnad, uvedeno v tab. 7. Čtyři varianty obsahovaly základní směs anti-atraktantů „5AA“: *trans*-conophthorin (tC), NHV-oly: 1-hexanol (hex), 3-oktanol (3ol), 1-okten-3-ol (oct) and 1,8-cineol (Ci), vždy v kombinaci s feromonem, složeným z přípravku Pheagr IT Extra (SciTech s r.o., Česká republika) a dávky feromonu (tab. 6.). Do jedné z variant byl přidán odparník s *trans*-4-thujanolem (50t4ol) o množství odpovídajícímu koeficientu odparu 50 mg/den, do dalšího odparníku byl přidán 30t4ol o množství odpovídajícímu koeficientu odparu 30 mg/den a do třetí 10t4ol o množství odpovídajícímu koeficientu odparu 10 mg/den. Ve čtvrté variantě nebyl žádný t4ol,

obsahovala jenom základní směs anti-atraktantů v kombinaci s feromonem. Experiment byl doplněn o variantu, kdy byl testován samotný feromon a prázdný lapač (Blank). Složení jednotlivých testovaných kombinací směsi je uvedeno v tab. 7. Dle randomizační tab. 2 dle schématu Latinského čtverce bylo provedeno šest přemístění variant návnad, a tedy šest opakování, kdy byli lýkožrouti vyjmuti z pastí.

Tab. 5: Přesné odparníky s jednotlivými anti-atraktanty obsaženými v přípravku používaných při optimalizaci dávky *trans*-4-thujanolu.

Semiochemikálie	Koeficient odparu [mg/den]		Počet použitých odparníků v polním pokusu	Design experimentálních odparníků
	Nominální hodnota	Laboratorní průměry ± SD		
<i>trans</i> -conophorin (tC)	0,5	0,5 ±0,2	1	skleněná kapilára 100 µl Microcaps® utěsněná na jednom konci zubním voskem, naplněná kapalinou po 1 mm od otevřeného okraje, zavěšená vodorovně
NHV-oly: 1-hexanol (hex), 3-oktanol (3ol), 1-okten-3-ol (oct)	3	3,5 ±1,3	1	otevřená 730 PE lahvička 9730, Kartell, Itálie): 6 mm ID, 29 mm výška, naplněná 0,5 ml směsí alkoholů 1:1:1 v/v s antioxidanty <i>tert</i> -Butylhydrochinon TBHQ 0,5 % v/v, BHT – butylovaný hydroxytoluen 0,5 % v/v
1,8-cineol (Ci)	1	0,7 ±0,1	2	čirá skleněná lahvička autosampleru 2 ml šroubovací uzávěr s PTFE silikonovou přepážkou (Agilent USA) 2 mm otvor v přepážce
<i>trans</i> -4-thujanol 40	50	48,3 ±13,2	1	buničitá vata 5,5 x 11 x 0,2 cm zatavená v PE fólii 0,045 mm, naplněná 800 mg <i>trans</i> -4-thujanolu rozpuštěného ve 12 ml pentanu, zatavená po odpaření pentanu
<i>trans</i> -4-thujanol 5	30	16,1 ±5,1	2	celulózová houba čtvercová 7,5 x 3,5 x 0,25 cm zatavená v PE fólii, tloušťka 0,1 mm, naplněná 200 mg <i>trans</i> -4-thujanolu rozpuštěného ve 3 ml pentanu, uzavřená po odpaření pentanu

<i>trans</i> -4-thujanol 2	10	9,4 ±5,5	2	celulózová houba čtvercová 2,5x5,5x0,25 cm zatavená v PE fólii, tloušťka 0,1 mm, naplněná 200 mg <i>trans</i> - 4-thujanolu rozpuštěného v 1 ml pentanu, který se před uzavřením odpařil
feromony lýkožrouta:				
2-methyl-3-buten-2- ol	100	42,2 ±20	1	uzavřená PE lahvička (731, Kartell, Itálie) s 2 mm otvorem ve víčku
<i>cis</i> -verbenol		1,5 ±0,8	1	uzavřená PE lahvička (731, Kartell, Itálie) s 9 mm otvorem ve víčku
Pheagr IT Extra		55 ±15	1	ipsdienol + (S)- <i>cis</i> - verbenol 4 + 42 g/kg v rozpuštědle 2-methyl-3- buten-2-ol/ průnik přes PE membránu

Tab. 6: Složení testovaných variant v návnadách pro optimalizaci dávky *trans*-4-thujanolu v přípravku obsahující směs anti-atraktantů.

Semiochemikálie	Kombinace testovaných anti-atraktantů v návnadách					
	A	B	C	D	E	F
	50t4ol+5A A+Phe	30t4ol+5A A+Phe	10t4ol+5A A+Phe	5AA+Phe	Phe	Blank
<i>trans</i> -conophthorin (tC)	X	X	X	X	-	-
Alkoholy (NHV-oly): 1-hexanol (hex), 3- oktanol (3ol), 1 - okten-3-ol (oct)	X	X	X	X	-	-
1,8-cineol (Ci)	X	X	X	X	-	-
<i>trans</i> -4-thujanol 50	X	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -4-thujanol 30	-	X	-	-	-	-
<i>trans</i> -4-thujanol 10	-	-	X	-	-	-
feromony lýkožrouta:						
2-methyl-3-buten-2-ol	X	X	X	X	X	-
<i>cis</i> -verbenol	X	X	X	X	X	-
Pher H	X	X	X	X	X	-

5

10

Optimalizace dávky *trans*-4-thujanolu jsou uvedeny na obr. 2, kde jsou znázorněny relativní odchýty ± SD lýkožroutů na jednotlivé varianty návnad. 5AA: kombinace pěti odparníků s anti-atraktanty *trans*-conophthorin (tC), NHV-oly: 1-hexanol (hex), 3-oktanol (3ol), 1-okten-3-ol (oct) a 1,8-cineol (Ci) v kombinaci s feromonem lýkožrouta; 10t4ol: přídavek odparníku s *trans*-4-thujanolem 10 mg/den ke směsi 5AA v kombinaci s feromonem lýkožrouta; 30t4ol: přídavek odparníku s *trans*-4-thujanolem 30 mg/den ke směsi 5AA v kombinaci s feromonem lýkožrouta; 50t4ol: přídavek odparníku s *trans*-4-thujanolem 50 mg/den v kombinaci s feromonem lýkožrouta; Pher H: feromon lýkožrouta, Blank: prázdný lapač.

Tab. 7: Nekorigované hodnoty účinku přídatku *trans*-4-thujanolu pro optimalizaci množství přidané dávky *trans*-4-thujanolu ke směsi pěti ostatních anti-atraktantů z přípravku.

Varianta návnady	Průměrný relativní odchyt (%)	SD	Varianta vs. Pher H			Varianta s t4ol vs 5AA		
			Průměrný rozdíl	Sdružená SD	Velikost účinku	Průměrný rozdíl	Sdružená SD	Velikost účinku
50 t4ol	1,60	1,00	-77,90	9,46	-8,24	-11,00	6,30	-1,80
30 t4ol	1,60	1,20	-78,00	9,55	-8,17	-11,10	6,40	-1,70
10 t4ol	4,60	5,70	-75,00	11,80	-6,40	-8,10	8,60	-0,90
0 t4ol (AA=5)	12,60	11,50	-66,90	14,70	-4,60	0,00	5,70	0,00
Pher H	79,50	17,90			N/A			N/A
Blank	0,00	0,10			N/A			N/A

- 5 Po porovnání odchytů lýkožroutů na jednotlivé testované varianty návnad se ukázal výrazně silnější inhibiční účinek vůči feromonu u přípravků obsahujících směs anti-atraktantů s přídatkem určitého množství *trans*-4-thujanolu než anti-atraktantů bez jeho obsahu. Odchyty na anti-atraktanty s přídatkem *trans*-4-thujanolu s koeficientem odparu 50 mg/den 50t4ol se snížily o 98 ± 1 %, ve variantě s přídatkem 30 mg/den 30 t4ol o 97 ± 3 % a ve variantě s přídatkem 10 mg/den 10 t4ol o 92 ± 12 % odchycených lýkožroutů vůči lýkožroutům odchycených na feromon. Na samotné anti-atraktanty bez přídatku *trans*-4-thujanolu 5AA byly odchyty nižší jen o 80 ± 29 % než na feromon.

- 15 Výsledky byly statisticky vyhodnoceny po porovnání vypočtených nekorigovaných „velikostí účinků“ a to jak z kumulovaných směrodatných odchylek odchytů na směsi s anti-atraktanty vůči odchytům na feromon, tak na porovnání jenom směsí anti-atraktantů s přídatkem *trans*-4-thujanolu vůči směsi samotných anti-atraktantů, uvedeno v tab. 8.

- 20 Všechny varianty obsahující anti-atraktanty měly vysoké nekorigované „velikosti účinků“ v porovnání s feromonem, a mají tedy prokazatelný inhibiční účinek. Při porovnání účinnosti variant s přídatkem *trans*-4-thujanolu vůči směsi samotných anti-atraktantů byla vypočtena nejvyšší hodnota nekorigované „velikosti účinků“ -1,8 resp. -1,7 pro varianty s přídatkem *trans*-4-thujanolu 50 resp. 30 mg/den. Odchyty na tyto dvě varianty se od sebe významně nelišily. Nižší „velikosti účinků“ -0,9 vykazovala varianta s přídatkem 10 mg/den *trans*-4-thujanolu.

- 25 Po vyhodnocení těchto poznatků bylo shrnuto, že přidáním množství *trans*-4-thujanolu s koeficientem odparu 10 mg/den ke směsi dalších pěti anti-atraktantů již výrazně zlepšilo inhibiční účinek, přidáním 3 a 5 krát vyšších dávek *trans*-4-thujanolu nadále zvyšovalo inhibiční účinek, přičemž inhibiční účinek těchto dvou vyšších dávek nebyl statisticky odlišný, takže přidání více než 30 mg/den *trans*-4-thujanolu nezvýšilo inhibiční účinek výsledné směsi obsažené v přípravku.

- Na základě těchto zjištění byla stanovena optimální dávka *trans*-4-thujanolu přidaného do přípravku, a to v množství odpovídajícímu koeficientu odparu v rozmezí 10 mg/den až 30 mg/den.

- 35 Příklad 3: Testování ochrany fragmentů mladých borovicovitých stromů

- 40 Bylo vybráno dvanáct fragmentů lesních porostů s 25letým smrkem, které byly obklopeny dostatečným prostorem pro let lýkožrouta. Na každém stanovišti byly k porostní stěně každého fragmentu umístěny dva bariérové feromonové lapače Theysohn ve vzdálenosti od linie odkrytých stromů menší než 1 m, a ve vzdálenosti od sebe 15 až 20 m. Do jednoho feromonového lapače byla umístěna návnada pouze s feromonem lýkožrouta Pheroprax A[®], BASF AG (GE) do druhého lapače pak kombinace stejné dávky feromonu v kombinaci s vybranou směsí anti-atraktantů

obsaženou v přípravku, a to: *trans*-conophthorin, 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-hexanol, 1,8-cineol a *trans*-4-thujanol, které byly uloženy v jednotlivých odparnicích, dle tab. 9, pro hodnocení jejich ochranného účinku.

- 5 Pro jednotlivé složky přípravku byly vyvinuty experimentální odparníky o určené nominální hodnotě, a jejich skutečný koeficient odparu byl zjištěn v laboratoři gravimetrickou metodou za standardních podmínek, tj. teplota 22 °C, rychlost větru 0,5 m/s, uvedeno v tab. 9.

- 10 Obě návnady, agregační feromon a přípravek, byly umístěny do pastí 07. 06. 2021, návnady přípravku obsahujícího anti-atraktanty byly vyměněny 26. 07. 2021. Interval kontrol pastí byl realizován s ohledem na povětrnostní podmínky, přičemž v teplých obdobích byl interval kontrol kratší, ve vlhkém období relativně delší obr. 3, vždy však maximálně po 1 týdnu.

- 15 Pokus probíhal v Školním lesním podniku České zemědělské univerzity v Kostelci nad Černými lesy na jihovýchodě Prahy, v České republice, části Bohumile, lesní porost 442G2, v období 07. 06. až 20. 07. 2021. Jednalo se o rozsáhlou monokulturu smrku o rozloze 8 ha, která vznikla po zalesnění větrem poškozené plochy. Stáří stromu v porostu bylo 25 let, průměrná výška 15 m, průměr v prsní výšce byla přibližně 15 cm, přičemž ve vybraném úseku je i několik částí s mladšími stromy. Plocha porostu 442G2 nebyla celá zalesněna, ale byla rozdělena mozaikou lesních luk a těžebních cest.

Hodnocena byla dvě kritéria:

- 25 1. Počet napadených stromů umístěných v blízkosti lapačů s feromony versus v blízkosti lapačů s feromony v kombinaci s přípravkem.

2. Množství lýkožroutů chycených do lapačů pouze s feromonem versus do lapačů s feromonem inhibovaným přípravkem.

- 30 Tab. 8: Přesné odparníky s jednotlivými anti-atraktanty obsaženými v přípravku použité k ochraně fragmentů mladého porostu čeledi borovicovitých.

Semiochemikálie	Koeficient odparu [mg/den]		Design odparníků
	Nominální	Laboratorní průměry ± SD	
<i>trans</i> -conophthorin (tC)	0,5	0,5 ±0,2	skleněná kapilára 100 µl Microcaps® utěsněná na jednom konci zubním voskem, naplněná kapalinou po 1 mm od otevřeného okraje, zavěšená vodorovně
NHV-oly: 1-hexanol (hex), 3-oktanol (3ol), 1-okten-3-ol (oct)	70	66,1 ±1,5	buničitá vata 10 x 10 x 0,25 cm zatavená v PE fólii 0,1 mm, plněná 12 ml směsí alkoholů 1:1:1 v/v s antioxidanty <i>tert</i> -Butylhydrochinon TBHQ 0,5 % v/v, BHT – butylovaný hydroxytoluen 0,5 % v/v
1,8-cineol (Ci)	30	45,9 ±4,7	buničitá vata 5 x 2,5 x 0,25 cm zatavená v mikrotenové fólii 0,045 mm, naplněná 2 ml 1,8-cineolu s antioxidanty <i>tert</i> -Butylhydrochinon TBHQ 0,5 % v/v, BHT-butyllovaný hydroxytoluen 0,5 % v/v

<i>trans</i> -4-thujanol (t4ol)	10	2 x 5,1 ±1,6	buničitá vata 7,5 x 3,5 x 0,25 cm zatavená v PE fólii 0,1 mm, naplněná 200 mg <i>trans</i> -4-thujanolu rozpuštěného v 3 ml pentanu, zatavená po odpaření pentanu
feromony lýkožrouta:			
Pheroprax A [®] , BASF AG (GE)	50	55 ±1	ipsdienol (3,56 g/kg) + (S)- <i>cis</i> -verbenol (35,59 g/kg) v rozpouštědle 2-methyl-3-buten-2-ol v ampulích, proniká plastovou stěnou ampule

Celkem bylo provedeno devět kontrol: 11.6.; 17.6.; 21.6.; 24.6.; 28.6.; 1.7.; 8.7.; 15.7. a 20.7. Lýkožrouti chycení v jednotlivých lapačích v těchto datech byli vybráni z lapačů a uskladnění v 95% etanolu k pozdějšímu spočítání v laboroři.

5

Ve stejných datech byl rovněž hodnocen počet stromů napadených lýkožroutem v 15 m okruhu v okolí obou lapačů. Napadení bylo kontrolováno vyhledáním závrťových otvorů lýkožroutů na kmeni a kontrolou požerků v příslušné části lýka.

10 Pro statistické vyhodnocení byl použit zobecněný lineární smíšený model neboli GLMM, a pro každou lokalitu byl vytvořen náhodný regresní úsek. Porovnání vlivu návnady na počet odchycených lýkožroutů byl realizován s ohledem na specifickou každé lokality. Pro závislou proměnnou, která nabývala četnostní charakter, bylo použito negativně binomické rozdělení neboli NB z důvodu značné heterogenity rozptylu, kterou nedovoluje použití Poissonovo rozdělení (Zuur & Ieno 2015). Analýza byla provedena v prostředí softwaru R (R Core Team 2020). K vytvoření regresního modelu byl použit balíček glmmTMB (Brooks et al. 2017). Pro výpočet podmínkového a skupinového koeficientu determinace pro zobecněný lineární smíšený model byl použit postup podle Nakagawa & Schielzeth (2013).

20 Během celého pokusu bylo v lapačích Theysohn odchyceno 74 422 dospělců lýkožrouta, z toho 74 403 jedinců bylo chyceno do lapačů obsahujících samotný agregační feromon a pouze 19 lýkožroutů bylo zachyceno v lapačích obsahujících anti-atraktant, což je méně než 1 %. Nejvyšší odchyt ve feromonových lapačích (32 729 jedinců) byly zjištěny v období mezi 18.6. a 21.6., kdy proběhla druhá fáze jarního rojení lýkožrouta. Přehled odchytů podle jednotlivých termínů kontrol je na obr. 3. Počet jedinců lýkožrouta odchycených v lapačích obsahujících přípravky ze směsi anti-atraktantů byl signifikantně nižší než v lapačích obsahujících samotný agregační feromon (GLMM NB: N = 216, df = 4, p < 0,001, R² = 0,988).

30 V 5 m okruhu v okolí lapačů nastražených samotným agregačním feromonem bylo nalezeno celkem 18 stromů napadených lýkožroutem a v blízkosti lapačů s kombinací feromonu a přípravku nebyl nalezen žádný napadený strom. Napadené stromy byly nalezeny při kontrole 17.6., kdy se jednalo o 11 stromů, při kontrole 21.6. pak bylo nalezeno dalších 7 stromů.

35 Necelé 1 % z celkového počtu odchycených jedinců lýkožrouta bylo zachyceno v lapačích obsahujících přípravky podle vynálezu. Rozdíl v počtu odchycených jedinců mezi lapači s přípravkem podle vynálezu a lapači obsahujícími pouze agregační feromon byl statisticky významný. Stejně tak počet napadených stromů v okolí. Přípravek podle vynálezu dokázal spolehlivě ochránit stojící mladé smrky ve fragmentovaném porostu před napadením lýkožroutem.

40 Příklad 4: Testování ochrany borovicovitých stromů umístěním směsného odparníku s anti-atraktanty obsahujícího roztok všech aktivních látek, na kmeny stromů na porostní stěně

45 Testování proběhlo v předem vybrané oblasti v lesních porostech s převahou smrku podle popisu v úvodu. Na pokus byly vybrány jižně orientované porostní stěny, které zůstaly po těžbě realizované v předchozím roce 2020 ve vzrostlých lesních smrkových porostech (starší 80 let).

Porostní stěny se nacházely v oblasti s vysokou pravděpodobností napadení lýkožroutem. Bylo vybráno devět experimentálních bloků vzdálených od sebe od několika set metrů do několika kilometrů s celkem 190 stromy ošetřenými odparníkem s anti-atraktivanty. Souřadnice jednotlivých lokalit jsou uvedeny v tab. 10. Na jednom experimentálním bloku bylo deset stromů v první řadě a deset stromů ve druhé řadě na čerstvých porostních stěnách na okraji lesa. Na každý strom vybraný k ošetření byl instalován jeden odparník se směsí anti-atraktivantů na severní stranu kmene ve výšce 2 m od země.

K ochraně porostních stěn byly použity odparníky o velikosti 7,5 x 15 cm s plastovým nosičem pro nasáknutí sloučenin, kdy prostupnou membránou byla polyetylenová fólie. Odparníky byli plněny kapalnou směsí anti-atraktivantů s celkovým koeficientem odparu všech látek 90 mg/den. Koeficient odparu byl gravimetricky stanoven při podmínkách pokusu. Směs na plnění odparníků se skládala z 1,8-cineolu (Ci) v množství 1 516 mg, racemického *trans*-conophthorinu (tC) v množství 15,37 mg, NHV-olů (1-hexanol (hex) v množství 1012 mg, 1-okten-3-ol (oct) v množství 1012 mg a 3-oktanol (3ol) v množství 1516 mg) a *trans*-4-thujanolu (t4ol) v množství 51 mg vše v poměru hex:oct:3ol:Ci:tC:t4ol 0,2:0,2:0,3:0,003.

Z tohoto poměru odhadnutý koeficient odparu jednotlivých složek směsi je pro NHV-oly 63 mg/den (1-hexanol 18 mg/den, 1-okten-3-ol 18 mg/den; 3-oktanol 27 mg/den), 1,8-cineol 27 mg/den, *trans*-conophthorin 0,3 mg/den s *trans*-4-thujanolem 1 mg/den.

Tab. 9: GPS souřadnice pokusných lokalit.

	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
1.	49°58'10.44" N	14°49'42.95" E
2.	49°58'8.17" N	14°51'18.46" E
3.	49°57'34.62" N	14°49'37.90" E
4.	49°55'37.17" N	14°50'59.90" E
5.	49°54'56.07" N	14°52'38.25" E
6.	49°56'4.48" N	14°52'36.26" E
7.	49°56'14.61" N	14°52'10.08" E
8.	49°56'18.75" N	14°54'48.33" E
9.	49°55'28.35" N	14°53'4.15" E

Experiment byl zahájen před rojením lýkožrouta dne 07. 05. 2021 a byl ukončen 30. 07. 2021. Nálety lýkožrouta byly monitorovány v několika týdenních intervalech v okolí ve vzdálenosti 100 m od ošetřených stromů.

Výsledky na obr. 4 ukazují, že ošetření přípravkem bylo účinné při ochraně proti napadení lýkožroutem do vzdálenosti 40 m od instalovaných dávkovačů s obsahem přípravku složeného z anti-atraktivantů podle vynálezu. Na rozdíl od předchozích experimentů se nevyskytl žádný významný „switch“ efekt. Ošetřené stromy a stromy do 40 m od ošetřených stromů nebyly napadeny. Nejvíce napadených stromů bylo monitorováno ve vzdálenosti 60 až 70 m od stromů ošetřených přípravkem podle vynálezu.

Průmyslová využitelnost

Přípravek pro repelenci lýkožrouta podle tohoto vynálezu lze využít v lesních porostech a u izolovaných stromů, či fragmentů porostu obsahujících stromy čeledi borovicovité, jako ochranu zdravých stromů, zejména smrku před napadením lýkožroutem smrkovým.

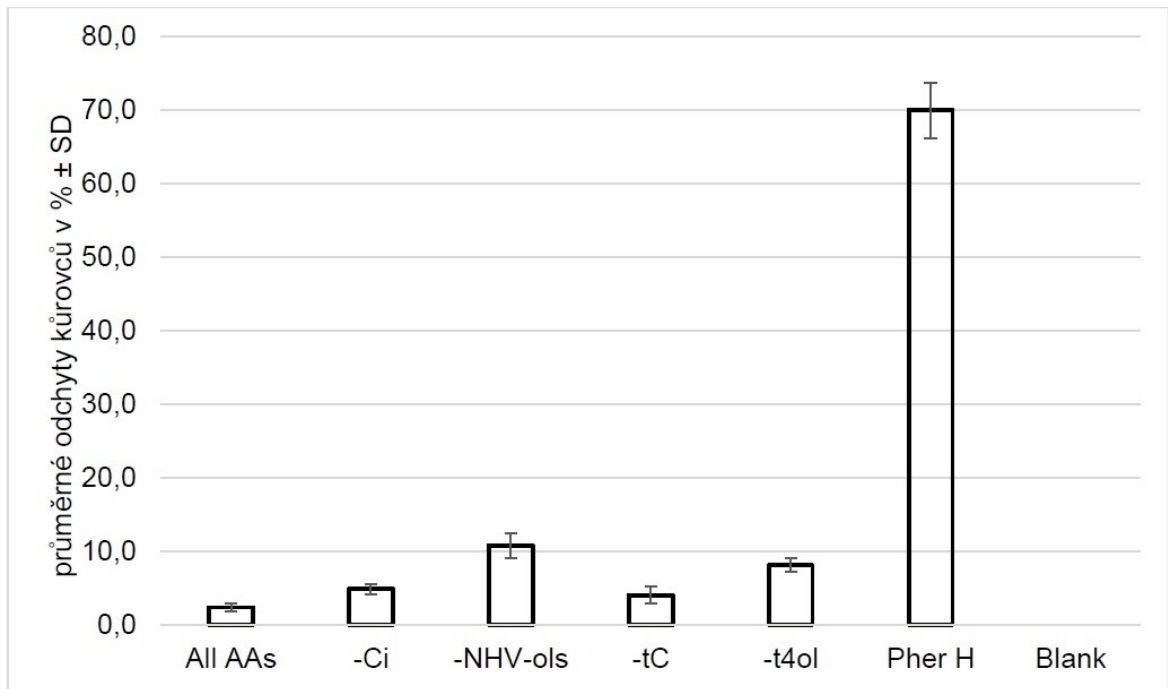
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Přípravek pro repelenci lýkožrouta smrkového *Ips typographus* obsahující alespoň jeden anti-atraktant ze skupiny: *trans*-conophthorin, 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-hexanol a 1,8-cineol, **vyznačující se tím**, že obsahuje právě všechny anti-atraktanty ze skupiny: *trans*-conophthorin, 3-oktanol, 1-okten-3-ol, 1-hexanol, 1,8-cineol a dále obsahuje *trans*-4-thujanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 1 do 30 mg/den.
- 10 2. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje: *trans*-conophthorin v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 0,3 do 0,6 mg/den, alkoholovou složku zahrnující 1-okten-3-ol, 3-oktanol a 1-hexanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu alkoholové složky od 45 do 75 mg/den, 1,8-cineol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 25 do 50 mg/den, a *trans*-4-thujanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 10 do 30 mg/den.
- 15 3. Přípravek podle nároku 1 až 2, **vyznačující se tím**, že alkoholová složka zahrnuje 1-okten-3-ol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 15 do 25 mg/den, 3-oktanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 15 do 25 mg/den a 1-hexanol v množství odpovídajícím koeficientu odparu od 15 do 25 mg/den.
- 20 4. Přípravek podle nároku 1 až 3, **vyznačující se tím**, že má formu směsi anti-atraktantů nebo sady jednotlivých anti-atraktantů určených ke společnému použití.
5. Přípravek podle některého z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že obsahuje dále antioxidant 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol nebo 2-(1,1-dimethylethyl)-1,4-benzendiol.
6. Přípravek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že antioxidant je ve obsažen v množství od 0,3 do 0,7 % hmotnosti.
- 25 7. Použití přípravku podle některého z nároků 1 až 6 k repelenci lýkožrouta smrkového *Ips typographus* u stromů čeledi borovicovité *Pinaceae*.
8. Použití podle nároku 7, k repelenci lýkožrouta smrkového *Ips typographus* u stromů smrku ztepilého *Picea abies*.
- 30 9. Způsob aplikace přípravku podle některého z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že směs anti-atraktantů se umístí do odparníku, nebo jednotlivé anti-atraktanty ze sady anti-atraktantů určených ke společnému použití se umístí do jednotlivých odparníků tvořících sadu odparníků, a následně se odparník nebo sada odparníků umístí na povrch stromu čeledi borovicovitých *Pinaceae*.
10. Způsob aplikace přípravku podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že odparník nebo sada odparníků se umístí na povrch stromu čeledi borovicovitých *Pinaceae* ve výšce od 1,5 m do 5 m od země.
- 35 11. Způsob aplikace přípravku podle nároků 9 až 10, **vyznačující se tím**, že odparník nebo sada odparníků je umístěna na povrch stromu staršího 50 let čeledi borovicovitých *Pinaceae*, který je součástí zapojeného lesního porostu obsahujícího více než 50 % stromů čeledi borovicovitých *Pinaceae*, přičemž stromy, na kterých jsou umístěny odparníky, jsou od sebe vzdáleny maximálně 15 m.
- 40 12. Způsob aplikace přípravku podle nároků 9 až 10, **vyznačující se tím**, že odparník nebo sada odparníků je umístěna na povrch stromu staršího 50 let čeledi borovicovitých *Pinaceae*, který je součástí první nebo druhé řady porostní stěny směrem od paseky, přičemž stromy, na kterých jsou umístěny odparníky, jsou od sebe vzdáleny maximálně 15 m.

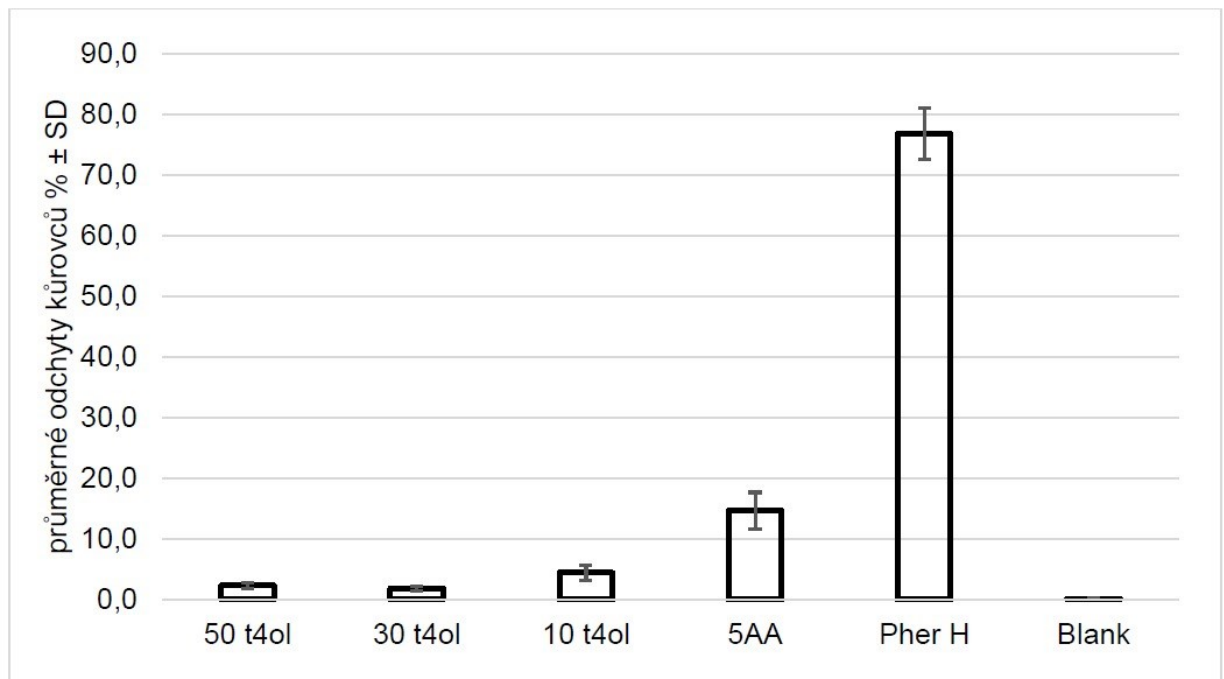
13. Způsob aplikace přípravku podle nároků 9 až 10, **vyznačující se tím**, že odparník nebo sada odparníků je umístěna na povrch vybraných izolovaných stromů, nebo fragmenty porostů nebo na skupinu samostatně stojících stromů, přičemž stromy, na kterých jsou umístěné odparníky, netvoří zapojený porost.

5

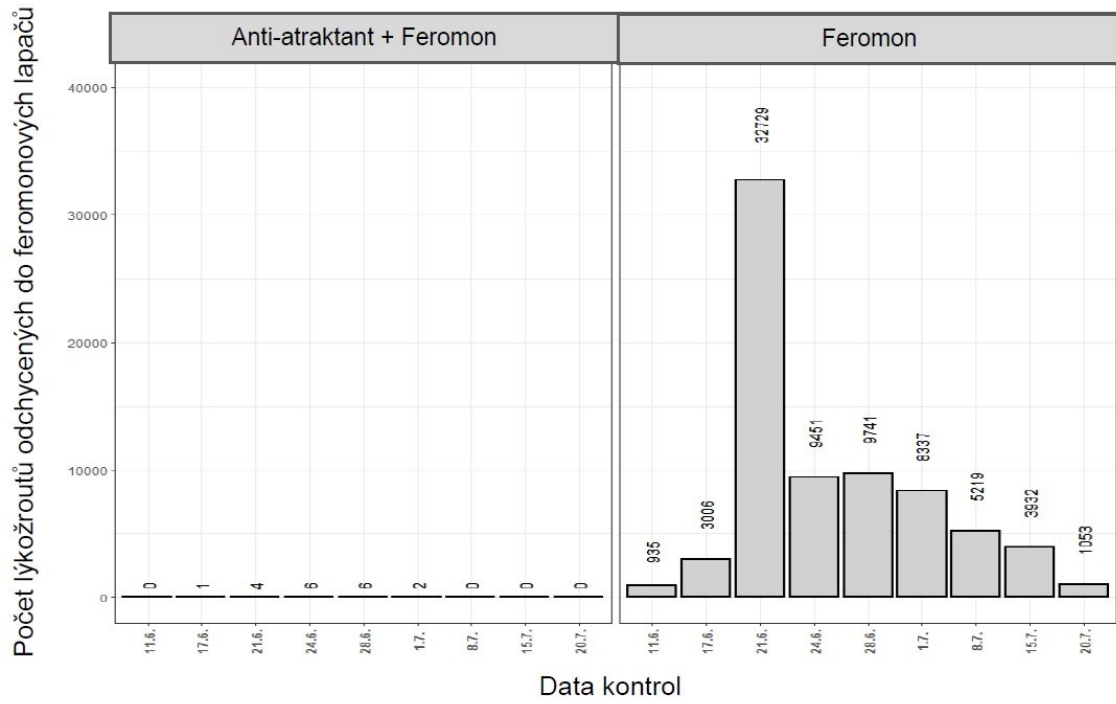
2 výkresy



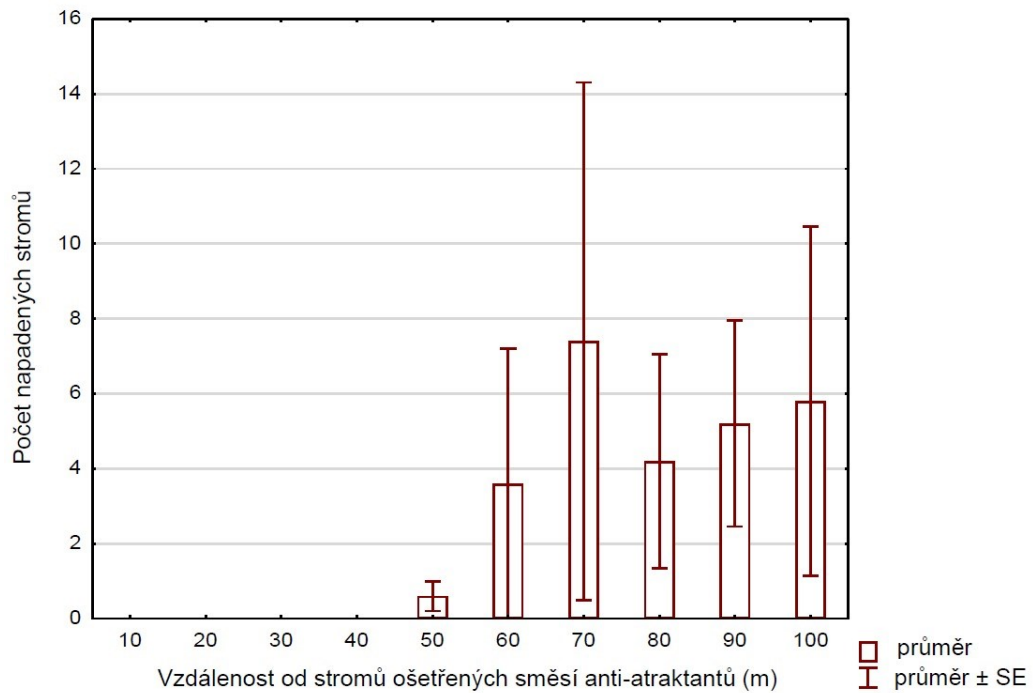
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4