Přehled používaných mikroorganismů biologické ochrany rostlin a zavádění nových izolátů do praxe

(Overview of Microorganisms Used for Biological Plant Protection and the Implementation of New Isolates into Practice)

Dominik Bleša, Zuzana Antalová, Pavel Matušinský, Marta Zavřelová
Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787/121, 76701 Kroměříž

Souhrn: Endofytické mikroorganismy mohou podporovat růst rostlin, konkurovat patogenům a stimulovat obranné mechanismy rostlin. Přesto existují překážky, jako jsou optimalizace produkce, stabilita inokula a regulační požadavky. Studie představuje souhrn působení mikroorganismů na rostliny a proti patogenům. Jsou představeny houby a bakterie používané jako prostředky na ochranu rostlin s registrací v České republice a jejich vlastnosti. Další část práce ilustruje proces testování a používání nových druhů mikroorganismů v zemědělství. Studie představuje houbu *Stilbella fimetaria*, druh tradičně považovaný za saprotrofní, který však vykazuje schopnost endofytické kolonizace rostlin, podobně jako rody *Trichoderma* a *Clonostachys. S. fimetaria* navíc produkuje bioaktivní sekundární metabolity, které ji činí zajímavou i pro farmaceutické aplikace. Endofytické houby představují perspektivní nástroj v ochraně rostlin díky své schopnosti podporovat růst, chránit před patogeny a zvyšovat odolnost vůči stresům, přičemž jejich aplikace vyžadují komplexní hodnocení jak taxonomické, tak funkční.
Klíčová slova: Endofytické houby; biologická ochrana rostlin; *Stilbella fimetaria*; mikroorganismy v zemědělství; mykoparazitismus; bakterie; bioprospekting

Abstract: Endophytic microorganisms can promote plant growth, compete with pathogens, and stimulate plant defence mechanisms. Nevertheless, challenges remain, such as optimizing production, ensuring inoculant stability, and meeting regulatory requirements. This study provides an overview of the effects of microorganisms on plants and against pathogens. It presents fungi and bacteria used as plant protection agents registered in the Czech Republic, along with their properties. Another section of the study illustrates the process of testing and applying new microorganisms in agriculture.
The study highlights the fungus *Stilbella fimetaria*, a species traditionally considered saprotrophic, which also shows the ability to colonize plants endophytically, similar to the genera *Trichoderma* and *Clonostachys*. Moreover, *S. fimetaria* produces bioactive secondary metabolites, making it of interest for pharmaceutical applications. Endophytic fungi represent a promising tool for plant protection due to their ability to promote growth, protect against pathogens, and enhance stress tolerance, although their application requires comprehensive evaluation from both taxonomic and functional perspectives.
Key Words: Endophytic fungi, biological plant protection, *Stilbella fimetaria*, microorganisms in agriculture, mycoparasitism, bacteria, bioprospecting

Úvod

Biologická ochrana rostlin představuje udržitelnou alternativu k chemickým pesticidům, zaměřenou na využití mikroorganismů, kteří přirozeně potlačují patogeny, indukují obranné mechanismy rostlin nebo podporujících jejich růst. Houby – zejména endofytické – mají v tomto směru mimořádný potenciál. Kolonizují rostlinná pletiva a zároveň nabízejí široké spektrum přínosů v ochraně proti biotickému i abiotickému stresu (Baron & Rigobelo, 2021). Nové poznatky ukazují, že endofyty představují spojence rostlin, kteří zvyšují vitalitu, odolnost i výnos plodin i v podmínkách klimatické změny (Rodriguez et al., 2009).

Endofytické houby jsou mikroorganismy žijící uvnitř rostlinných pletiv bez symptomatického poškození hostitele. Mohou být mutualisté (přinášejí hostiteli výhody) nebo oportunní saprotrofové – vyčkávají na úhyn hostitele v jeho pletivech, ale zároveň působí kompetičně proti patogenům. Novější definice navrhují vymezit termín endofyt pouze pro mutualistické formy, které podporují růst a obranyschopnost rostlin (Schulz & Boyle, 2005). Rozmanitost ekologických funkcí endofytů zahrnuje saprotrofii, mykoparazitismus, entomopatogenitu i mutualismus, díky tomu je lze použít pro široké spektrum aplikací v agrosystémech (Backman & Sikora, 2008).

Mechanismy působení endofytů a jejich přínosy

a) Antibióza a produkce sekundárních metabolitů

Endofyty produkují pestrou škálu bioaktivních látek (terpenoidy, alkaloidy, fenoly aj.), které inhibují růst patogenů rostlin a mohou mít i farmakologický význam. Tyto metabolity se uplatňují jak přímo, tak v kombinaci s dalšími mechanismy, které zvyšují jejich účinnost (Strobel & Daisy, 2003).

b) Indukce imunitní odpovědi hostitele

Aktivace obranných drah hostitele je zásadním mechanismem, jímž endofyty zvyšují odolnost vůči širokému spektru patogenů. Dochází k modulaci hormonálních drah (kyselina salicylová, jasmonová, etylen) a k expresi obranných proteinů (Pieterse et al., 2014).

c) Mykoparazitismus a konkurence

Zástupci rodů *Trichoderma* či *Clonostachys* jsou schopni napadat organismy patogenů přímo, rozkládat jejich buněčné stěny enzymaticky a konkurovat jim v přístupu ke zdrojům. To vede k dlouhodobému potlačení výskytu chorob v půdě (Harman et al., 2004).

d) Produkce fytohormonů a podpora růstu

Mnohé endofytické houby stimulují syntézu auxinů či gibberellinů, zlepšují růst kořenového systému a fotosyntetickou kapacitu. Podílejí se i na regulaci stresových hormonů, jako je kyselina abscisová, a tím posilují toleranci rostlin k suchu, zasolení či teplotním výkyvům (Khan et al., 2012).

e) Zvyšování tolerance k abiotickému stresu

Endofyty modulují stresové signální dráhy a aktivují antioxidační mechanismy, čímž rostlinám umožňují lépe čelit extrémním podmínkám. To je významné zejména v souvislosti s klimatickou změnou (Baron & Rigobelo, 2021).

f) Bioprospekting a nové izoláty

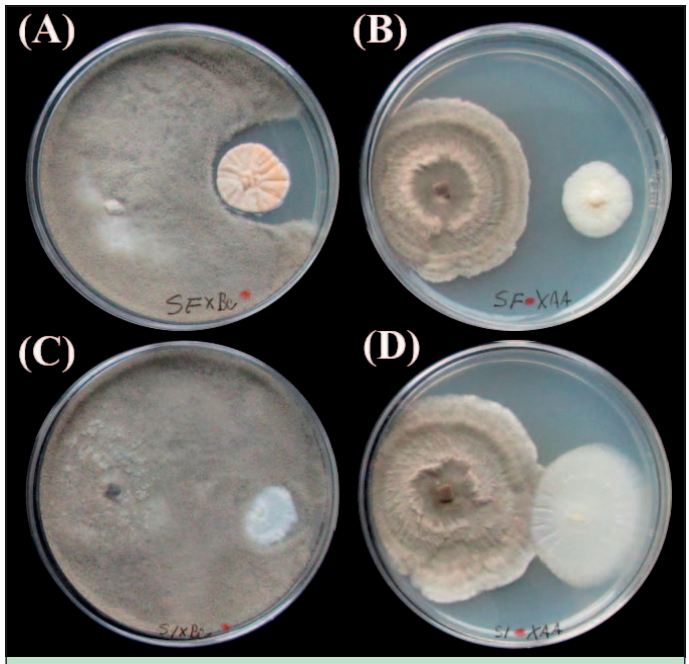
Endofyty izolované z extrémních stanovišť (např. halofytů, suchomilných trav či arktické vegetace) vykazují mimořádné schopnosti v podpoře stresové tolerance. Pokroky v metagenomice a dalších omických technologiích umožňují objevovat nové kmeny s unikátními vlastnostmi (Malfanova et al., 2013). Toto systematické vyhledávání mikroorganismů s potenciálním využitím v zemědělství, například pro biologickou ochranu rostlin nebo podporu jejich růstu je označováno jako bioprospekting.

g) Endofytické entomopatogeny

Druhy *Beauveria* či *Metarhizium* jsou známy jako patogeny hmyzu, ale jsou schopny endofytické kolonizace rostlin. Umožňují tak hostitelům zvyšovat jejich odolnost vůči hmyzím škůdcům (Vega, 2018). Tento duální účinek je slibný pro integrovanou ochranu rostlin.

Výzkumné a aplikační výzvy

Hlavní překážkou pro širší využití vlastností endofytických hub je přenos laboratorních výsledků do praxe. Většina dat pochází z in vitro či skleníkových experimentů, zatímco polní validace je zatím omezená (Obr.1; Obr. 2; Baron & Rigobelo, 2021). Dalšími problémy jsou masová produkce a formulace životaschopných inokulantů se stabilní účinností a dostatečnou trvanlivostí. Regulace uvádění na trh je přísná a časově náročná (Sessitsch et al., 2019). Významným faktorem je také interakce endofytů s původním mikrobiomem rostliny, která může účinnost posilovat i oslabovat (Compant et al., 2016).



Obr. 2: Testování kompetičních vlastností získaných izolátů proti vybraným patogenním organismům. Vytvoření inhibiční zóny předpokládá přímou modulaci růstu patogenu pomocí alelopatických metabolitů. Duální testy na Petriho miskách
(A) Stilbella fimetaria × Botrytis cinerea;
(B) Stilbella fimetaria × Alternaria alternata. Naproti tomu mutualistický endofyt Serendipita indica takové působení vůči patogenům nevykazuje, ale indukuje imunitní reakce hostitele;
(C) Serendipita indica × Botrytis cinerea;
(D) Serendipita indica × Alternaria alternata.

Obr. 1: Nádobové experimenty v řízených podmínkách jsou jedním z prvotních kroků testování účinnosti a vlivu získaných mikroorganismů na rostliny.

Do budoucna se předpokládá rostoucí role metagenomických přístupů a vysokoproduktivního screeningu při hledání nových kandidátů. Klíčovým směrem je také vývoj formulací kombinujících více endofytických kmenů s doplňujícími se účinky. Přesné cílení aplikací v rámci precizního zemědělství by mohlo zvýšit efektivitu a snížit náklady. Rovněž genetické studie a analýzy metabolitů otevírají prostor pro optimalizaci produkce bioaktivních látek (Baron & Rigobelo, 2021).

V zemích Evropské unie se množství využívaných mikroorganismů liší také z důvodu pěstování jiných plodin, jiného podílu zemědělských ploch s omezenými chemickými vstupy a v důsledku rozdílného klimatu i výskytu škůdců a chorob. Cílem práce je představení současných mikroorganismů (bakterií a hub) používaných jako prostředky pro ochranu rostlin v rámci České republiky, včetně dalších vlastností těchto mikroorganismů, které nejsou zahrnuty v registracích. nejsou zahrnuty v registracích. Mezi mikroorganismy, které lze

použít, můžeme zařadit dle nařízení EU 2019/1009 i další druhy, které slouží jako biostimulanty, v současné době to jsou pouze *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp., *Azospirillum* spp. a mykorhizní houby. V další části práce bude představena houba *S. fimetaria* jako příklad izolátu s potenciálem využití v biologické ochraně rostlin.

Výčet mikroorganismů používaných v ČR jako prostředky na ochranu rostlin.

Aureobasidium pullulans

Kvasinkovitá houba běžně osidlující povrch plodů a listů. V ochraně rostlin se používá hlavně proti skladovým patogenům ovoce (např. *Botrytis*, *Penicillium*) a proti infekci květů jabloní, přičemž působí kombinací kompetice o prostor/živiny a tvorbou antifungálních metabolitů. Z hlediska reziduí a toxicity nebyly identifikovány problémy, protože jde o oportunního saprofytického kolonizátora bez známých virulenčních faktorů vůči člověku. V praxi vyžaduje včasnou aplikaci (pre-infekční) a dobrou pokryvnost povrchu; funguje nejlépe jako součást integrované ochrany (kombinace s jinými metodami). V EU je látka posouzená a dlouhodobě používaná; EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) ji zařazuje mezi látky s minimálním rizikem.

Bacillus amyloliquefaciens

Bacillus amyloliquefaciens patří mezi nejpoužívanější mikroorganismy v biologické ochraně rostlin i v oblasti biostimulace. Jeho účinek je založen na více mechanismech zároveň: produkuje široké spektrum přírodních antibiotik (lipopeptidy jako ituriny, fengyciny a surfaktiny, nebo polyketidy), které přímo potlačují houby i bakterie; velmi rychle osidluje povrch rostlin a kořenovou zónu, kde vytváří biofilm a účinně konkuruje patogenům; a navíc dokáže aktivovat vlastní obranné reakce rostlin.

Jednotlivé kmeny se liší svými vlastnostmi i oblastí využití. Například kmen QST 713 je registrován v EU jako fungicid a prokázal účinnost proti listovým i plodovým chorobám u celé řady plodin. Kmeny FZB24/FZB42 jsou známé především jako „PGPR“ (plant growth-promoting rhizobacteria), které kolonizují kořeny a chrání je před půdními patogeny. MBI 600 se používá zejména proti padlí a dalším listovým chorobám, zatímco D747 (subsp. plantarum) je využíván například v ochraně révy a zeleniny.

Rozdíly mezi kmeny spočívají hlavně ve složení produkovaných metabolitů, v jejich preferenci pro kolonizaci (povrch listů vs. rhizosféra) a v rozsahu registrací pro jednotlivé plodiny a choroby. V praxi se *B. amyloliquefaciens* aplikuje především preventivně – jeho reziduální účinek je krátký, ale rychle dokáže potlačit patogeny a udržet rostliny zdravé. Nejlepší výsledky přináší v kombinacích (tank-mixech nebo rotacích) s jinými biologickými prostředky nebo s nízkorizikovými chemickými přípravky. Regulace a povolení těchto kmenů v EU vycházejí z hodnoticích zpráv EFSA a jsou dohledatelné v databázi EU Pesticides.

Bacillus pumilus

Bacillus pumilus se využívá hlavně jako protiplísňový epifyt, typicky na révě nebo ovoci. Působí několika způsoby najednou – konkuruje patogenům o prostor a živiny, produkuje antimikrobiální látky a zároveň stimuluje obranné reakce rostlin. Nejznámějším komerčním kmenem je QST 2808, který prošel v EU detailním hodnocením EFSA a byl po řadu let schválen, zejména pro použití na révě.

V roce 2023 ale došlo k tomu, že jeho schválení nebylo na úrovni EU obnoveno. Nešlo přitom o bezpečnostní zákaz – důvod byl čistě administrativní, protože držitel povolení nedodal potřebné podklady k obnovení. V praxi to znamená, že v některých národních seznamech lze ještě najít doběh povolení nebo dočasné derogace, ale pro nové registrace je rozhodující stav na úrovni EU.

Mechanismus účinku je podobný jako u jiných bakterií – tvorba biofilmu a produkce lipopeptidů – nicméně v polních podmínkách záleží hodně na správném načasování aplikace a rovnoměrném pokrytí rostlin, aby byla účinnost co nejvyšší.

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis je blízký příbuzný *B. amyloliquefaciens* a funguje velmi podobně – vytváří ochranný biofilm, produkuje lipopeptidy s přímým protiplísňovým účinkem a zároveň stimuluje obranu rostlin (ISR). V Evropské unii je kmen IAB/BS03 zařazen mezi nízkorizikové účinné látky se schválením na 15 let. Hodnocení EFSA neodhalilo žádná významná toxikologická rizika, jen ojedinělé případy rezistence k některým antibiotikům, které ale nemají klinický dopad.

V praxi se *B. subtilis* používá hlavně preventivně proti listovým a plodovým chorobám zeleniny, jahodníku nebo révy. Nejlépe funguje, když se aplikuje včas a v návaznosti na další biologické přípravky v programu ochrany.

Historicky se v literatuře i databázích objevuje také kmen QST 713, dříve vedený pod *B. subtilis* – dnes je ale v EU zařazen pod *B. amyloliquefaciens*, což souvisí s taxonomickými revizemi. Proto je při práci v praxi vždy nutné vycházet z aktuálních údajů v EU Pesticides Database a v národním registru ÚKZÚZ, kde je přehledně uvedeno, na které plodiny a choroby je konkrétní kmen povolen a v jakých dávkách.

Bacillus thuringiensis subsp. aizawai a kurstaki

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki a aizawai patří mezi klasické biologické insekticidy využívané proti housenkám motýlů (Lepidoptera). Jejich účinek spočívá v produkci krystalických proteinů (Cry toxinů), které se aktivují až v alkalickém střevě housenek. Po požití způsobí poškození střevního epitelu, přerušení příjmu potravy, a nakonec úhyn larvy.

B. thuringiensis subsp. kurstaki (Btk) je nejrozšířenější a dlouhodobě osvědčený poddruh. Produkuje směs Cry1-proteinů, které pokrývají široké spektrum škůdců – od obalečů přes zavíječe až po různé můry na ovocných stromech, révě, zelenině i okrasných rostlinách. V EU je etablovaný se stabilním regulačním rámcem; mezi komerčně využívané kmeny patří například EG2348 (referenční) nebo SA-11 (přípravky typu *Delfin*). Účinnost v praxi závisí hlavně na aplikaci proti mladým larvám, na dostatečném pokrytí listů a na ochraně přípravku před UV zářením. Obvykle se doporučuje opakovat postřik po 7–10 dnech.

B. thuringiensis subsp. aizawai (Bta) má poněkud odlišné složení Cry proteinů, což mu dává výhodu proti některým „problémovým“ druhům, jako jsou zavíječi a molice na zelenině či ovocných kulturách. V praxi se často používá v rotaci s Btk, aby se předešlo vzniku rezistence a zároveň se pokrylo širší spektrum škůdců. I tento poddruh prošel v EU nedávnou obnovou schválení a zůstává standardní součástí programů biologické ochrany.

Oba poddruhy mají velmi příznivý bezpečnostní profil a jejich hlavním omezením je nutnost precizního načasování (zásah proti mladým instarům) a dobrého smáčení, protože účinek nastává až po požití.

Pseudomonas chlororaphis

Pseudomonas chlororaphis patří mezi fluorescenční pseudomonády využívané v biologické ochraně i biostimulaci. Je známá

svou schopností potlačovat široké spektrum půdních i listových patogenů. Základem účinku je produkce antimikrobiálních metabolitů (fenaziny, pyrrolnitrin, hydrogenkyanid) a tvorba sideroforů, které odebírají železo konkurenčním mikroorganismům. K tomu se přidává schopnost stimulovat růst rostlin a posilovat jejich vlastní obranné mechanismy (indukovaná rezistence).

V EU je jako nízkoriziková účinná látka registrován kmen DSMZ 13134, který se využívá hlavně v zelinářství a u okrasných rostlin proti půdním patogenům, jako jsou *Pythium, Rhizoctonia* nebo *Fusarium*. Prakticky se aplikuje především do substrátu nebo půdy – například formou moření osiva či zálivky – protože zde dokáže rychle osídlit kořenové prostředí a uplatnit svou kompetitivní výhodu.

Oproti bacilům má *P. chlororaphis* širší teplotní optimum pro aktivitu, ale zároveň může být citlivější na vysokou vlhkost a konkurenční mikroflóru. Z hlediska bezpečnosti má velmi příznivý profil a v dosavadních hodnoceních EU nebyly identifikovány významné toxikologické obavy.

Beauveria bassiana

Entomopatogenní houba působící kontaktně na široké spektrum hmyzích škůdců (mšice, molice, třásněnky, brouci). Infikuje průnikem skrz kutikulu, následně prorůstá hemolymfou a produkuje toxiny vedoucí k úhynu hostitele. Kmen GHA je komerčně nejrozšířenější (přípravky typu Botanigard, Naturalis), schválený v EU pro použití na polních plodinách, zelenině i ve sklenících. Rozdíly mezi kmeny se týkají virulence vůči konkrétním škůdcům a schopnosti růstu při nižších/vyšších teplotách. V terénu je klíčové zajistit vysokou relativní vlhkost (nad 85 %) alespoň několik hodin po aplikaci, aby konidie mohly klíčit. Účinek není okamžitý (úhyn obvykle za 3–7 dnů), takže se používá spíše preventivně nebo v raných fázích napadení. Rotace s jinými mechanismy účinku pomáhá zpomalit rozvoj rezistence u hmyzích populací.

Clonostachys rosea

Mykoparazitická houba využívaná k ochraně proti půdním a některým listovým patogenům, zejména *Botrytis*, *Sclerotinia* a *Fusarium*. Kmen J1446 je v EU schválen pro použití na zelenině, bylinách a okrasných rostlinách, zejména ve skleníkových podmínkách. Mechanismus účinku zahrnuje přímý mykoparazitismus (prorůstání hyf patogenu), produkci antifungálních látek a rychlou kolonizaci povrchu rostlin i substrátu. Účinný je především při preventivní aplikaci, kdy obsadí povrch listů/květů ještě před přistáním spor patogenu. Dobře snáší kombinaci s některými chemickými fungicidy (integrované programy). Literární zdroje popisují i jeho potenciál jako endofytu a schopnost stimulovat růst rostlin, což může být perspektivní pro rozšíření použití mimo současné registrace.

Coniothyrium minitans

Tato houba je specializovaný mykoparazit zaměřený na sklerocia *Sclerotinia sclerotiorum* a příbuzných hub (*S. minor*, *S. trifoliorum*). Kmen CON/M/91-08 je schválený v EU a používá se hlavně v půdní aplikaci (zapravení, zálivka) před výskytem choroby. Účinnost spočívá v pomalém rozkladu sklerocií v půdě, čímž se snižuje infekční tlak v následujících sezónách. Nejde tedy o rychlý kurativní zásah, ale o dlouhodobé opatření v rámci osevních sledů. V praxi se často kombinuje s mechanickými a agrotechnickými postupy (hluboká orba, výběr odolnějších odrůd). Studie ukazují, že účinek může přetrvat několik let, pokud není půda znovu silně infikována. Není znám toxický účinek na necílové organismy ani negativní dopady na užitečnou mikroflóru.

Pythium oligandrum

Pythium oligandrum je unikátní oomyceta, která se od příbuzných fytopatogenních druhů liší mykoparazitickým a ochranným životním stylem. Kmen M1, registrovaný v EU, představuje hlavní komerční bioagens tohoto druhu. Jeho klíčovým mechanismem účinku je mykoparazitismus: hyfy *P. oligandrum* aktivně napadají patogeny (např. *Fusarium, Pythium ultimum, Phytophthora, Rhizoctonia*), prorůstají jejich myceliem a využívají je jako zdroj živin. Tento proces je doprovázen produkcí hydrolytických enzymů (glukanázy, celulázy, proteázy), které rozkládají buněčné stěny hostitelských hub.

Významným přínosem kmenu M1 je také indukce systémové rezistence rostlin (ISR). Interakce s kořenovým systémem spouští aktivaci obranných drah hostitele, včetně zvýšené syntézy fenolických látek a fytoalexinů, což poskytuje dlouhodobější ochranu proti širokému spektru patogenů. Navíc se uvádí pozitivní vliv na růst rostlin a zvýšení vitality, zejména u zeleniny a obilnin.

Aplikace *P. oligandrum* M1 se provádí zpravidla formou moření osiva, zálivky či zapravením do půdy. Kmen je považován za ekologicky bezpečný, bez rizik pro necílové organismy, a jeho využití ilustruje, že i netradiční mikroorganismy mohou sehrát zásadní roli v biologické ochraně rostlin.

Trichoderma spp.

Houby rodu *Trichoderma* patří mezi nejdéle a nejvíce využívané biologické činitele v ochraně rostlin. Vyznačují se schopností rychle kolonizovat kořenový systém i povrch rostlin, kde vytvářejí ochrannou bariéru proti patogenům. Jejich účinek je vícevrstvý: kombinují mykoparazitismus (napadají a rozkládají hyfy jiných hub pomocí enzymů, jako jsou chitinázy a glukanázy), produkci antifungálních metabolitů, kompetici o živiny a prostor a také schopnost spouštět v rostlinách vlastní obranné mechanismy (ISR).

Vedle přímé ochrany mají trichodermy výrazný biostimulační efekt – podporují tvorbu jemných kořenů, zlepšují příjem živin a dokážou rostlinám pomoci lépe zvládat abiotické stresy, například sucho či zasolení. Všechny komerčně využívané kmeny se aplikují preventivně (moření osiva, zálivka substrátu, aplikace do půdy nebo na rány), protože houba potřebuje čas k tomu, aby se v prostředí etablovala. Bezpečnostní profil je obecně příznivý a EU tyto druhy řadí k nízkorizikovým bioagens.

Trichoderma afroharzianum (dříve *T. harzianum*) je modelovým druhem biologické ochrany a patří mezi nejrozšířenější a nejlépe prozkoumané druhy, přičemž kmen T-22 je jeho nejznámější zástupce. Tento druh vyniká schopností efektivně kolonizovat kořeny rostlin a chránit je proti řadě půdních patogenů, jako jsou *Fusarium, Pythium, Rhizoctonia* nebo *Sclerotinia*. Kromě přímé ochrany rostlin *Trichoderma afroharzianum* výrazně stimuluje jejich růst – podporuje tvorbu jemného kořenového vlášení, zlepšuje příjem fosforu a dalších živin, produkuje auxiny a zvyšuje odolnost vůči stresům. V zemědělské praxi se používá především preventivně, aplikován je do substrátu nebo na osivo.

Trichoderma asperellum představuje také druh s velmi širokým spektrem použití a množstvím různých kmenů. V Evropské unii je například kmen T34 registrován pro zeleninu, okrasné i polní plodiny. Jeho mechanismy účinku jsou podobné jako u *T. afroharzianum* – zahrnují mykoparazitismus, produkci antibiotik a indukovanou systémovou rezistenci (ISR), přičemž dosahuje dobrých výsledků zejména proti půdním patogenům. Některé kmeny, například ICC 012 a T25, se používají v kombinacích, často spolu s *T. gamsii*, k ochraně révy a dalších trvalých kultur proti dřevním chorobám. Mezi hlavní výhody *T. asperellum* patří rychlá adaptace na různé půdní podmínky a stimulační efekt na růst rostlin. Rozdíly

mezi kmeny se projevují zejména v rychlosti růstu, teplotní toleranci a cílovém spektru patogenů.

Trichoderma atroviride je specializovaný druh zaměřený především na ochranu ran po řezu u révy a dalších trvalých kultur. V Evropské unii je schválen kmen SC1, který účinkuje tak, že rychle obsadí čerstvé rány a zabrání patogenům (*Eutypa, Phaeomoniella* či *Phaeoacremonium*) proniknout do pletiv rostlin. Silnou stránkou tohoto druhu je schopnost adaptace na nižší teploty, což odpovídá období řezu révy v časném jaru či pozdním podzimu. Další výhodou je dlouhodobý efekt díky endofytickému způsobu života a příznivý ekologický profil.

Princip zavádění nových mikrobiálních kmenů a druhů do praxe v EU

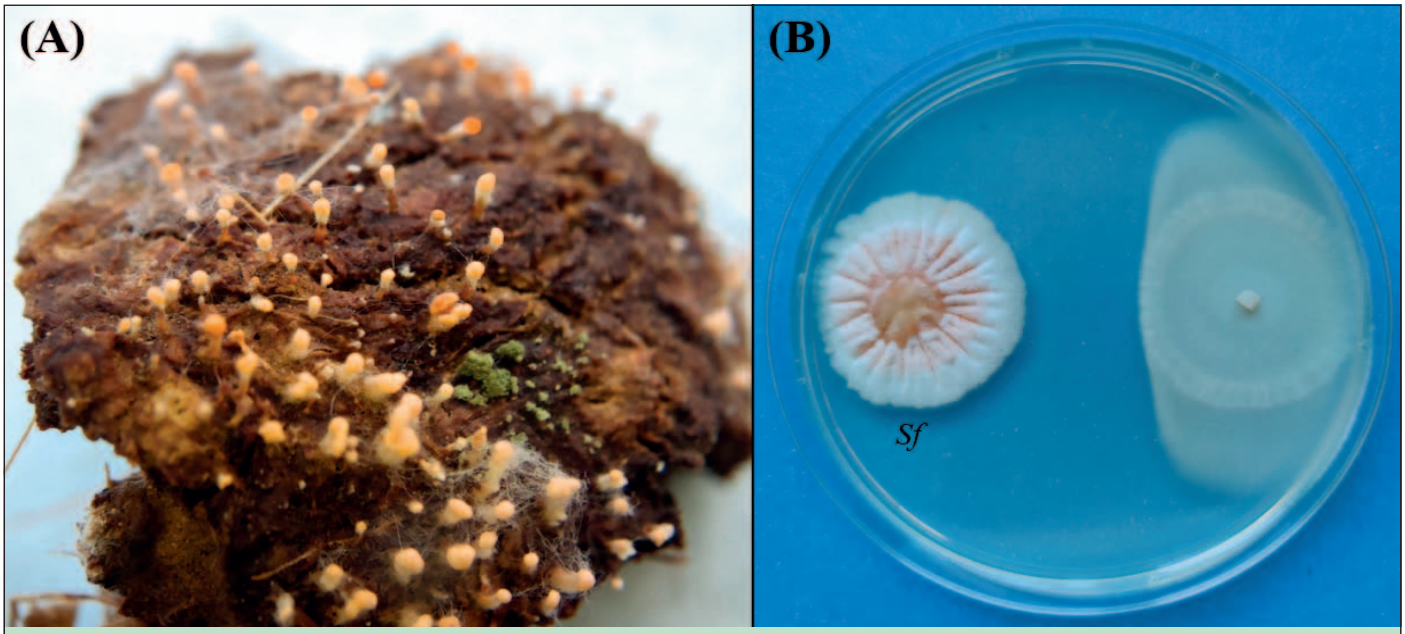
Proces uvádění nových mikroorganismů pro ochranu rostlin na trh v EU je poměrně komplexní a regulovaný na úrovni nařízení (ES) č. 1107/2009. Začíná izolací potenciálně užitečného mikroorganismu z přírodního prostředí (půda, rostlinné pletivo, kompost apod.) a jeho základní identifikací (morfologie, sekvenace DNA). Následují in vitro testy zaměřené na účinnost proti cílovým patogenům nebo škůdcům a hodnocení stability a adaptace na různé podmínky.

Využití nových zdrojů mikroorganismů – příklad *Stilbella fimetaria*

Výše popsané mechanismy a výzvy ukazují, že cesta od laboratorní izolace endofytické houby až k jejímu praktickému uplatnění vyžaduje kombinaci taxonomického, funkčního i aplikačního hodnocení. Následující část představuje popis jednoho z perspektivních izolátů, který byl v rámci naší kolekce získán na rostlinných zbytcích na poli.

Rod *Stilbella* patří do řádu Hypocreales (masenkotvaré) ve třídě Sordariomycetes. V současnosti do tohoto rodu spadá asi 60 druhů s nejznámějším zástupcem *S. fimetaria*, dříve označovaného jako *S. erythrocephala* nebo *Stilbum coprophilum*. *S. fimetaria* je méně známý druh houby s kosmopolitním výskytem, která je primárně studována pro své bioaktivní metabolity a ekologický význam. Jedná se o vláknitou houbu tvořící viditelná konidiomata na substrátu. Typickou morfologickou strukturou jsou sporodochia – kompaktní shluky konidioforů, které produkují konidie. Tyto struktury mohou mít různé barvy v závislosti na stádiu zrání a podmínkách prostředí, nejčastěji však jsou sytě oranžové (Obr. 3).

Ekologická role tohoto druhu je především saprotrofního charakteru – koprofilní druh rostoucí na trusu býložravců, ale i jako rozkladač dalších organických materiálů, jako je dřevo či listí.



Obr. 3: A) Houbou kolonizovaný trus herbivora s viditelnými sporodochii; (B) kompetiční test mezi izolátem Stilbella fimetaria (Sf) a houbou rodu Rhizoctonia.

Při úspěchu v laboratorní fázi se přechází na poloprovozní a polní pokusy, kde se ověřuje reálná účinnost, způsob aplikace, kompatibilita s jinými prostředky a dlouhodobá persistence v prostředí. Současně probíhá hodnocení rizik pro člověka, necílové organismy a životní prostředí (to zahrnuje i testy patogenity, toxicitu metabolitů a případné AMR geny).

Kmeny, které prokáží účinnost a bezpečnost, se přihlašují k registraci jako „účinná látka“ na úrovni EU. Po schválení je nutná ještě národní registrace přípravku. Některé kmeny mohou získat status nízkého rizika, který zjednodušuje schvalovací proces a umožňuje flexibilnější použití v ekologickém zemědělství. Výběr kmenů pro praxi pak zohledňuje nejen biologickou účinnost, ale i ekonomickou dostupnost, stabilitu formulace a kompatibilitu s pěstitelskými systémy.

Výskyt byl pozorován rovněž v zasolených a kyselých půdách (např. rezervace Soos u Františkových lázní), ale i v pobřežních vodách mořského ekosystému – jako endofytická houba řas. Tento vztah může být vzájemně prospěšný, kdy houba chrání rostlinu před patogeny a rostlina poskytuje houbě živiny. Nebyla však pozorován žádná specifita těchto symbióz, nejspíše se bude jednat o náhodný komenzální vztah. Schopnost *S. fimetaria* kolonizovat tak různorodé niky naznačuje vysokou ekologickou plastičnost a schopnost adaptace (Hujslová et al., 2010; García-Guinea et al., 2015; Kildgaard et al., 2017).

Neméně rozmanitá je i produkce sekundárních metabolitů a dalších bioaktivních sloučenin s potenciálem pro farmaceutické a biotechnologické aplikace. *S. fimetaria* produkuje různé typy hydrolytických enzymů, které mohou být využity v průmyslových

procesech, jako je degradace celulózy, hemicelulózy a ligninu. Tyto enzymy mají potenciál pro využití v bioenergetice, papírenství a dalších průmyslových odvětvích. Potenciální využití může mít i při bioremediaci znečištěných prostředí, díky schopnosti rozkladu organických sloučenin. Mezi nejvíce studované sekundární metabolity této houby můžeme zařadit askochloriny, meroterpenoidy a diterpenoidy, a také peptaibolová antibiotika, některá působící jako antiamoebiny (látky účinné proti prvokům; Lehr et al., 2006; Subko et al., 2021). Diskutuje se tedy jejich potenciální využití proti prvokům způsobujícím malárii nebo spavou nemoc (Nagaraj et al., 2001). Dále houba produkuje fenolické kyseliny, flavonoidy a alkaloidy, které mohou mít antimikrobiální, antioxidační a další farmakologické vlastnosti. V přirozených podmínkách tuto chemickou výbavu používá v rámci kompetice o substrát, optimalizace svého prostředí a jako ochranu před patogeny (Obr. 4; Röhrich et al., 2014). Díky produkci různých bioaktivních sloučenin je tak *S. fimetaria* předmětem zájmu pro farmaceutický výzkum, zejména v oblasti vývoje nových antibiotik, protinádorových a protizánětlivých léků.

Přestože nejsou známy zemědělské aplikace druhu *S. fimetaria*, tato houba má slibný potenciál jako zdroj bioaktivních látek, které by mohly být v zemědělství použity jako biopesticidy, což je testováno například v případě příbuzné houby *S. aciculosa* vůči patogenu *Rhizoctonia solani* (Lewis & Papavizas, 1993). Využití ve zpracování zemědělského odpadu je další z možných využití, které bylo pozorováno u dalšího zástupce rodu *Stilbella* – *S. thermophila* (Seifert et al., 1997).

Závěr

Endofytické houby se stávají jedním z nejperspektivnějších nástrojů biologické ochrany rostlin. Díky své schopnosti podporovat růst, chránit před patogeny a zvyšovat odolnost vůči stresům nabízejí cestu k omezení chemických vstupů a k udržitelnému zemědělství. Přestože přechod od laboratorního výzkumu k polním aplikacím vyžaduje ještě značné úsilí, kombinace intenzivního výzkumu, technologického vývoje a podpory legislativního rámce může z endofytů učinit pilíř budoucí ochrany rostlin.

Houba *Stilbella fimetaria* byla v rámci našeho terénního průzkumu izolována z posklizňových rostlinných zbytků na zemědělské půdě v Kroměříži, tedy z ekologické niky charakteristické pro saprotrofní mikroorganismy. Přestože je tradičně řazena mezi půdní a rozkladné houby, literární údaje i naše předběžná pozorování naznačují její schopnost kolonizovat rostliny také endofyticky. Tím se zařazuje mezi méně známé, avšak potenciálně významné kandidáty pro biologickou ochranu rostlin. V této souvislosti lze *S. fimetaria* srovnat s rody jako *Trichoderma* či *Clonostachys*, které se již rutinně využívají v praxi. Zajímavým rysem je i schopnost rychle kolonizovat organický substrát, což může přispívat k potlačení přežívání patogenů v rostlinných zbytcích. Potenciál pro aplikaci spočívá jak v ochraně proti půdním chorobám, tak v možnosti zvýšit odolnost rostlin vůči stresu prostřednictvím indukce obranných reakcí.

/Recenzováno/

Poděkování:
Výsledek vznikl za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1123 a projektu QL24010008.

Použitá literatura:

Backman, P. A., & Sikora, R. A. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control, 46*(1), 1–3. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.009

Baron, N. C., & Rigobelo, E. C. (2021). Endophytic fungi: A tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology, 12*(3), 139–154. https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1945699

Clay, K., & Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist, 160*(S4), S99–S127. https://doi.org/10.1086/342161

Compant, S., Saikkonen, K., Mitter, B., Campisano, A., & Mercado-Blanco, J. (2016). Editorial special issue: Soil, plants and endophytes. *Plant and Soil, 405*(1), 1–11. https://doi.org/10.1007/s11104-016-2929-3

García-Guinea, J., Furio, M., Sanchez-Moral, S., Jurado, V., Correcher, V., & Sáiz-Jiménez, C. (2015). Composition and spectra of copper-carotenoid sediments from a pyrite mine stream in Spain. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 135,* 203–210. https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.017

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology, 2*(1), 43–56. https://doi.org/10.1038/nrmicro797

Hujslová, M., Kubátová, A., Chudíčková, M., & Kolařík, M. (2009). Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Natural Reserve, Czech Republic. *Mycological Progress, 9*(1), 1–15. https://doi.org/10.1007/s11557-009-0611-7

Keller, S., & Zimmermann, G. (1989). Mycopathogens of soil insects. In N. Wilding, N. M. Collins, P. M. Hammond, & J. F. Webber (Eds.), *Insect-fungus interactions* (pp. 239–270). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751800-8.50016-1

Khan, S. A., Hamayun, M., Yoon, H., Kim, H. Y., Suh, S. J., Hwang, S. K., Kim, J. M., Lee, I. J., Choo, Y. S., Yoon, U. H., Kong, W. S., Lee, B. M., & Kim, J. G. (2008). Plant growth promotion and Penicillium citrinum. *BMC Microbiology, 8,* 231. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-231

Kildgaard, S., Subko, K., Phillips, E., Goidts, V., de la Cruz, M., Díaz, C., Gotfredsen, C. H., Andersen, B., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., & Larsen, T. O. (2017). A dereplication and bioguided discovery approach to reveal new compounds from a marine-derived fungus *Stilbella fimetaria*. *Marine Drugs, 15*(8), 253. https://doi.org/10.3390/md15080253

Lehr, N., Meffert, A., Antelo, L., Sterner, O., Anke, H., & Weber, R. (2006). Antiamoebins, myrocin B and the basis of antifungal antibiosis in the coprophilous fungus *Stilbella erythrocephala* (syn. *S. fimetaria*). *FEMS Microbiology Ecology, 55*(1), 105–112. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00007.x

Lewis, J. A., & Papavizas, G. C. (1993). *Stilbella aciculosa*: A potential biocontrol fungus against *Rhizoctonia solani*. *Biocontrol Science and Technology, 3*(1), 3–11. https://doi.org/10.1080/09583159309355253

Malfanova, N., Lugtenberg, B. J. J., & Berg, G. (2013). Bacterial endophytes: Who and where, and what are they doing there? In F. J. de Bruijn (Ed.), *Molecular microbial ecology of the rhizosphere* (pp. 393–403). Wiley-Blackwell. https://doi.org/10.1002/9781118297674.ch36

Nagaraj, G., Uma, M. V., Shivayogi, M. S., & Balaram, H. (2001). Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45*(1), 145–149. https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.145-149.2001

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology, 52,* 347–375. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340

Rodriguez, R. J., White, J. F., Jr., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytologist, 182*(2), 314–330. https://doi.org/10.1111/j.1469--8137.2009.02773.x

Röhrich, C. R., Jaklitsch, W. M., Voglmayr, H., Iversen, A., Vilcinskas, A., Nielsen, K. F., Thrane, U., von Döhren, H., Brückner, H., & Degenkolb, T. (2014). Front line defenders of the ecological niche! Screening the structural diversity of peptaibiotics from saprotrophic and fungicolous *Trichoderma/Hypocrea* species. *Fungal Diversity, 69*(1), 117–146. https://doi.org/10.1007/s13225-013-0276-z

Seifert, K. A., Louis-Seize, G., Samson, R. A., & Boekhout, T. (1997). *Remersonia*, a new genus for *Stilbella thermophila*, a thermophilic mould from compost. *Canadian Journal of Botany, 75*(7), 1158–1165. https://doi.org/10.1139/b97-828

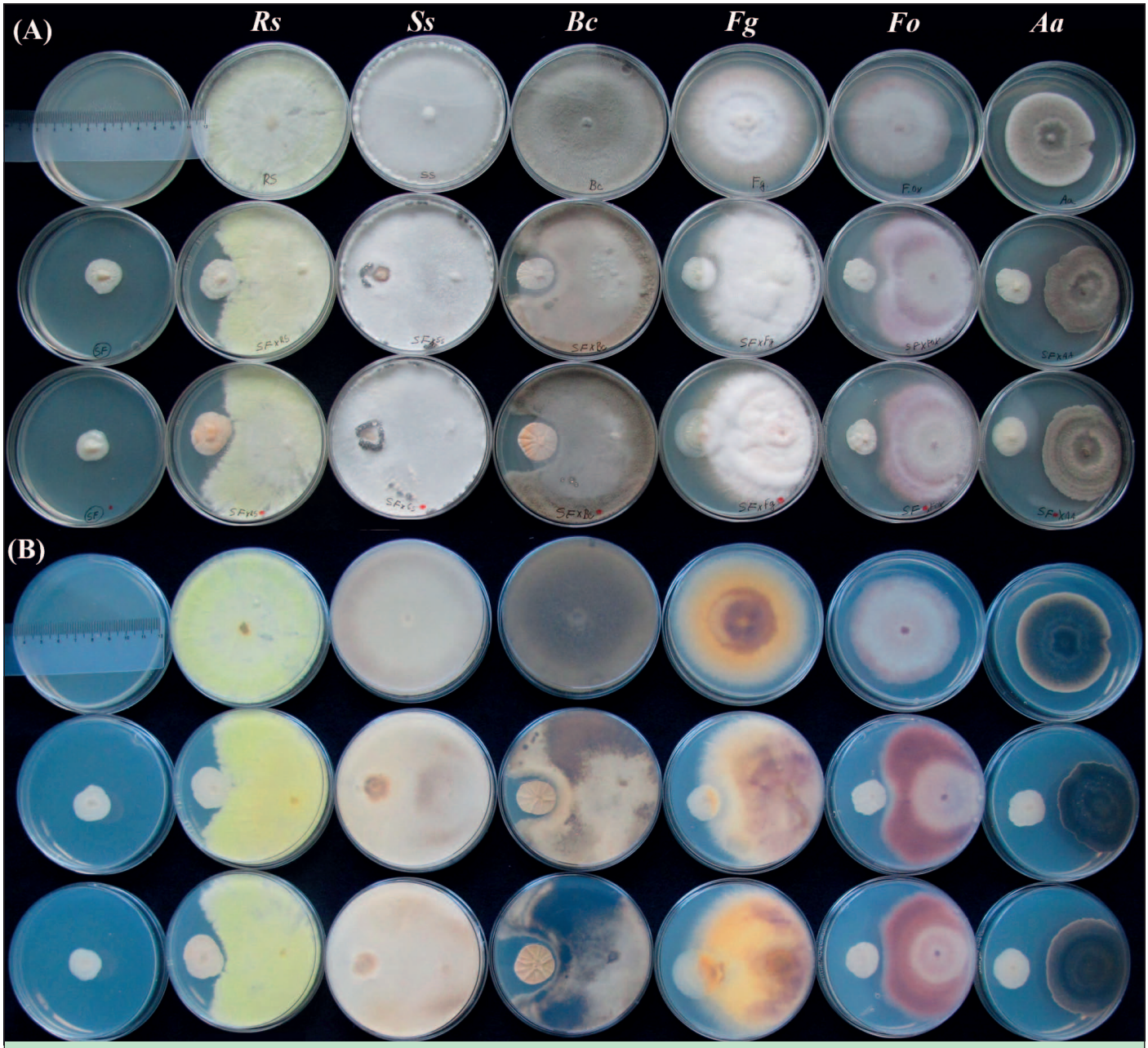
Sessitsch, A., Pfaffenbichler, N., & Mitter, B. (2019). Microbiome applications from lab to field: Facing complexity. *Trends in Plant Science, 24*(3), 194–198. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.12.004

Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research, 109*(6), 661–686. https://doi.org/10.1017/S095375620500273X

Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67*(4), 491–502. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003

Subko, K., Kildgaard, S., Vicente, F., Reyes, F., Genilloud, O., & Larsen, T. (2021). Bioactive ascochlorin analogues from the marine-derived fungus *Stilbella fimetaria*. *Marine Drugs, 19*(2), 46. https://doi.org/10.3390/md19020046

Vega, F. E. (2018). The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: A review. *Mycologia, 110*(1), 4–30. https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1418578



Obr. 4: Kompetiční testy izolátu Stilbella fimetaria s patogeny Rs – Rhizoctonia solani, Ss – Sclerotinia sclerotiorum, Bc – Botrytis cinerea, Fg – Fusarium graminearum, Fo – Fusarium oxysporum a Aa – Alternaria alternata. (A) Pohled na Petriho misky shora; (B) spodní strana misek.