

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2024

Bc. Bára Starošíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Reakce rostlinného hostitele na endofytické a patogenní
houby**

Diplomová práce

Bc. Bára Starošíková

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Bára STAROŠTÍKOVÁ
Osobní číslo: R220038
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Reakce rostlinného hostitele na endofytické a patogenní houby
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše k danému tématu.
2. Charakterizace organismů *Brachypodium distachyon*, *Microdochium bolleyi*, *Serendipita indica*, *Fusarium culmorum* a *Rhizoctonia cerealis*
3. Popis současných znalostí o imunitě rostlin a ovlivnění úrovně exprese genů zapojených do obranných procesů rostlin
4. Založení a vedení experimentů ve skleníku popř. fytotronu (kultivace hub, příprava hostitele)
5. Izolace RNA
6. Převod RNA do cDNA
7. Měření exprese genů pomocí real-time PCR
8. Vyhodnocení a zpracování dat.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Kouzai Yusuke, Mamiko Kimura, Yurie Yamanaka, Megumi Watanabe, Hidenori Matsui, Mikihiro Yamamoto, Yuki Ichinose, Kazuhiro Toyoda, Yoshihiko Onda, Keiichi Mochida and Yoshiteru Noutoshi Expression profiling of marker genes responsive to the defence-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. **BMC Plant Biology** (2016) 16:59

Girin Thomas, Laure C. David, Camille Chardin, Richard Sibout, Anne Krapp, Sylvie Ferrario-Méry and Françoise Daniel-Vedele. *Brachypodium*: a promising hub between model species and cereals. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 65, No. 19, pp. 5683-5696, (2014)

Peraldi Antoine, Giovanni Beccari, Andrew Steed and Paul Nicholson. *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. **BMC Plant Biology** (2011), 11:100

Zhong, S., Ali, S., Leng, Y., Wang, R., and Garvin, D. F. 2015. *Brachypodium distachyon*-*Cochliobolus sativus* pathosystem is a new model for studying plant-fungal interactions in cereal crops. **Phytopathology** 105:482-489.

Fitzgerald Timothy L., Jonathan J. Powell, Katharina Schneebeli, M. Mandy Hsia, Donald M. Gardiner, Jennifer N. Bragg, C. Lynne McIntyre, John M. Manners, Mick Ayliffe, Michelle Watt, John P. Vogel, Robert J. Henry and Kemal Kazan. *Brachypodium* as an emerging model for cereal pathogen interactions. **Annals of Botany** 115: 717-731, 2015

Scholthof Karen-Beth G., Sonia Ingoyen, Pilar Catalan, and Kranthi K. Mandadia. *Brachypodium*: A Monocot Grass Model Genus for Plant Biology. **The Plant Cell**, Vol. 30: 1673-1694, (2018), www.plantcell.org

Powell JJ, Carere J, Sablok G, Fitzgerald TL, Stiller J, Colgrave ML, Gardiner DM, Manners JM, Vogel JP, Henry RJ, Kazan K. Transcriptome analysis of *Brachypodium* during fungal pathogen infection reveals both shared and distinct defense responses with wheat. **Sci Rep**. 2017; 7(1):17212.

Kellogg EA. *Brachypodium distachyon* as a Genetic Model System. *Annu Rev Genet.* 2015; 49:1-20.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.**
Katedra botaniky

Datum zadání diplomové práce: **24. října 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2024**

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 3. listopadu 2022

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Bc. Bára Starošítková

Název práce: Reakce rostlinného hostitele na endofytické a patogenní houby

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: Expres genů, endofyt, patogen, *Brachypodium distachyon*, imunita rostlin

Počet stran: 71

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

SOUHRN

Významnou roli v obranných procesech rostlin hrají geny, jejichž úroveň exprese může být ovlivněna v důsledku napadení rostliny patogenem. Stanovení míry exprese těchto genů umožňuje posoudit jaký vliv mají na daného rostlinného hostitele nejen patogenní, ale také endofytické houby, jež mohou zásadním způsobem ovlivnit obranyschopnost některých rostlin navozením stavu indukované rezistence.

Teoretická část této práce je zaměřena na charakterizaci endofytických (*Serendipita indica*, *Microdochium bolleyi*) a patogenních hub (*Ceratobasidium cereale*, *Fusarium culmorum*) a modelového organismu *Brachypodium distachyon*. Dále se zabývá imunitou rostlin, včetně antifungálních proteinů a fytohormonů, jež se podílejí na zprostředkování obranné reakce rostlin na napadení patogenem a také indukovanou rezistencí. V neposlední řadě jsou zde popsány faktory podmiňující rozvoj mutualistického vztahu mezi endofytem a rostlinou, a především způsob a význam stanovení úrovně exprese genů zapojených do obranných procesů rostlin.

Cílem experimentální části této práce bylo zjistit, jakým způsobem reaguje modelová rostlina *B. distachyon* na napadení patogenními houbami a na přítomnost endofytických hub na základě stanovení míry exprese šesti genů (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*) pomocí kvantitativní Real-time PCR ve spojení s reverzní transkripcí (RT-qPCR). V případě patogenů *C. cereale* a *F. culmorum* byl prokázán statisticky významný vliv na expresi genů *BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*. Expres genů *BdCHIT* a *BdPOX2* byla rovněž ovlivněna endofytem *M. bolleyi*. Endofytická houba *S. indica* neměla na expresi žádného z testovaných genů statisticky významný vliv.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Bára Starošítková

Title: Plant host response to endophytic and pathogenic fungi

Type of thesis: Master's

Department: Department of Cell biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Supervisor: Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Keywords: Gene expression, endophyte, pathogen, *Brachypodium distachyon*, plant immunity

Number of pages: 71

Number of appendices: 0

Language: Czech

SUMMARY

In order to find out how plants defend themselves against various pathogens, the expression of plant defense genes induced upon a pathogen attack can be measured. Changes in the expression of these genes can reveal the specific mechanisms that play an important role in plant defense-related processes against pathogenic fungi and the effect of endophytic fungi on a given plant host. The importance of studying endophytic fungi lies in their ability to enhance the defensive capacity of many plant species by induced systemic resistance.

The aim of theoretical part was to characterize endophytic (*Serendipita indica*, *Microdochium bolleyi*) and pathogenic (*Ceratobasidium cereale*, *Fusarium culmorum*) fungi as well as a model organism *Brachypodium distachyon*. It further focuses on the description of plant immunity including the above-mentioned induced systemic resistance and antifungal proteins and phytohormones involved in plant host defense response to pathogen attack. Different factors affecting the formation of mutualistic relationship between endophyte and plant and especially the methods used to determine the expression levels of plant defense genes are also described.

The aim of experimental part was to measure expression levels of six plant defense genes (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*) by quantitative reverse transcription Real-time PCR to find out how the plant host (*B. distachyon*) responds to pathogen infection or endophytic colonization. The expression of *BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2* was affected (upregulated) by both pathogenic fungi *C. cereale* and *F. culmorum*. The endophytic fungus *M. bolleyi* affected only the expression of *BdCHIT* and *BdPOX2*. There weren't any changes in the expression of any of the tested genes in plants colonized by the endophytic fungus *S. indica*.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce
Mgr. Pavla Matušinskeho, Ph.D. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Pavlu Matušinskému, Ph.D. za jeho odborný dohled a vedení, ochotu, trpělivost, přátelský přístup a v neposlední řadě cenné rady, které mi v průběhu vypracovávání této práce poskytnul.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Charakterizace organismů.....	3
3.1.1	<i>Serendipita indica</i> (syn. <i>Piriformospora indica</i>)	3
3.1.2	<i>Microdochium bolleyi</i>	5
3.1.3	<i>Fusarium culmorum</i>	6
3.1.4	<i>Ceratobasidium cereale</i>	7
3.1.5	<i>Brachypodium distachyon</i>	8
3.1.5.1	Možnosti využití organismu <i>Brachypodium distachyon</i>	8
3.2	Imunita rostlin.....	9
3.2.1	Antifungální proteiny	11
3.2.2	Fytohormony	13
3.2.2.1	Signální dráha kyseliny salicylové.....	13
3.2.2.2	Signální dráha kyseliny jasmonové.....	14
3.2.2.3	Signální dráha ethylenu.....	16
3.2.3	Indukovaná rezistence	17
3.2.3.1	Typy induktorů.....	18
3.2.4	Biologická ochrana rostlin.....	20
3.3	Mechanismy podmiňující rozvoj vzájemně prospěšného vztahu mezi endofytem a rostlinou ..	21
3.4	Stanovení úrovně exprese genů zapojených do obranných reakcí rostlin pomocí RT-qPCR	23
3.4.1	Geny zapojené do obranných procesů u <i>B. distachyon</i>	24
3.4.1.1	Gen <i>BdPR-1</i>	25
3.4.1.2	Gen <i>BdPOX2</i>	25
3.4.1.3	Gen <i>BdLOX3</i>	25
3.4.1.4	Gen <i>BdCHIT</i> / geny pro chitinázy.....	26
3.4.1.5	Gen <i>BdWRKY41</i> / geny pro WRKY transkripční faktory (TF).....	26
3.4.1.6	Gen <i>BdEIN3</i>	27

4	MATERIÁL A METODY	28
4.1	Biologický materiál.....	28
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	28
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	28
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	29
4.4.1	Příprava inokula.....	29
4.4.2	Setí.....	29
4.4.3	Inokulace rostlin <i>B. distachyon</i> endofytickými a patogenními houbami.....	30
4.4.4	Odběr vzorků	31
4.4.5	Izolace RNA	31
4.4.6	Reverzní transkripce	32
4.4.7	Měření exprese genů pomocí metody RT-qPCR.....	33
5	VÝSLEDKY	36
5.1	Vizuální vyhodnocení intenzity poškození rostlin <i>Brachypodium distachyon</i>	36
5.2	Výsledky qPCR (měření exprese genů zapojených do obranné reakce rostlin).....	40
5.2.1	Exprese genu <i>BdPR-1</i>	41
5.2.2	Exprese genu <i>BdCHIT</i>	42
5.2.3	Exprese genu <i>BdPOX2</i>	44
5.2.4	Exprese genu <i>BdLOX3</i>	45
5.2.5	Exprese genu <i>BdWRKY41</i>	46
5.2.6	Exprese genu <i>BdEIN3</i>	48
6	DISKUZE.....	49
7	ZÁVĚR.....	54
8	LITERATURA.....	55

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Význam endofytické houby <i>Serendipita indica</i> a možnosti jejího využití.....	4
Obrázek 2: Zjednodušený souhrn procesů, které jsou spuštěny po rozpoznání patogenu rostlinnými PRR receptory	11
Obrázek 3: Signalizace kyseliny salicylové (SA) před (nalevo) a po (napravo) rozpoznání biotrofního patogenu	14
Obrázek 4: Signalizace kyseliny jasmonové (JA) před (nalevo) a po (napravo) rozpoznání nekrotrofního patogenu	16
Obrázek 5: Rostliny <i>Brachypodium distachyon</i> těsně před inokulací (stáří 5 týdnů, vlevo), způsob vrstvení substrátu a perlitu (vpravo).....	30
Obrázek 6: Postup inokulace	30
Obrázek 7: Soubor obrázků znázorňující stav (míru poškození) rostlin jednotlivých variant.....	37

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení Premixu I pro reverzní transkripci	32
Tabulka 2: Složení Premixu II pro reverzní transkripci.....	32
Tabulka 3: Seznam použitých vzorků cDNA získaných reverzní transkripcí RNA izolované z listů <i>Brachypodium distachyon</i>	33
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro qPCR.....	34
Tabulka 5: Seznam primerů použitých pro amplifikaci testovaných genů.....	35
Tabulka 6: Teplotní program qPCR reakce	35
Tabulka 7: Výsledky vizuálního zhodnocení intenzity poškození rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> . 38	
Tabulka 8: Výsledky statistického vyhodnocení intenzity poškození rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> pomocí metody ANOVA.....	38
Tabulka 9: Výsledky Tukey-HSD testu pro jednotlivé testované varianty.....	39
Tabulka 10: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu <i>BdPR-1</i> 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant... 41	
Tabulka 11: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu <i>BdCHIT</i> 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant	43
Tabulka 12: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu <i>BdPOX2</i> 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant	44
Tabulka 13: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu <i>BdLOX3</i> 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant	46
Tabulka 14: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu <i>BdWRK41</i> 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant	47
Tabulka 15: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu <i>BdEIN3</i> 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant	48

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Průměrné poškození rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdFc, BdCc) zjištěné na základě vizuálního zhodnocení příznaků.....	39
Graf 2: Relativní exprese genu <i>BdPR-1</i> u rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci.....	42
Graf 3: Relativní exprese genu <i>BdCHIT</i> u rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci.....	43
Graf 4: Relativní exprese genu <i>BdPOX2</i> u rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci.....	45
Graf 5: Relativní exprese genu <i>BdLOX3</i> u rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci.....	46
Graf 6: Relativní exprese genu <i>BdWRKY41</i> u rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci.....	47
Graf 7: Relativní exprese genu <i>BdEIN3</i> u rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci.....	48

1 ÚVOD

Imunitní systém rostlin je představován mechanismy a strukturními bariérami, které mají rostliny k dispozici po celou dobu svého života a obrannými mechanismy, které jsou spuštěny až po kontaktu s patogenem. Významnou roli ve zprostředkování imunitní reakce rostlin hrají rostlinné hormony, jež ovlivňují expresi řady genů. Takové geny se nazývají fytohormon-responzivní geny a představují vhodný nástroj ke studiu reakce rostlin na napadení patogenem, jelikož jejich pozměňená exprese může odrážet typ mechanismů, které rostlina za účelem obrany využívá. Stejně tak umožňují posoudit, jaký vliv mají na rostliny endofytické houby. Úroveň genové exprese může být stanovena například pomocí kvantitativní Real-time PCR.

Dlouhodobou snahou je zvýšení odolnosti zejména zemědělsky významných plodin vůči závažným houbovým patogenům jako je například *Fusarium culmorum* a *Ceratobasidium cereale*, a to prostřednictvím indukované rezistence. Navození indukované rezistence může být provedeno nejen pomocí chemických, ale i biologických induktorů, které jsou k životnímu prostředí mnohem šetrnější a mohly by přispět k sníženému používání fungicidů. Biologickými induktory mohou být některé prospěšné mikroorganismy, jako jsou endofytické houby, což je také jeden z důvodů, proč jsou tyto organismy čím dál častěji předmětem zkoumání řady studií. Konkrétním příkladem může být endofytická houba *Serendipita indica*, kterou lze v dnešní době považovat za jednu z nejvíce slibných a účinných potenciálních biologických induktorů. Tato houba je schopna kolonizovat řadu rostlinných druhů, přičemž podporuje jejich růst a vývoj a také bylo prokázáno, že indukuje obranné mechanismy vůči biotickému a abiotickému stresu. Podobný účinek vykazuje u některých rostlinných druhů i houba *Microdochium bolleyi*. Hlavní význam využití endofytů jako biologických induktorů spočívá v jejich schopnosti vyvolat stav zvýšené obranyschopnosti rostlin zvaný 'priming', který je základem indukované systémové rezistence. Díky tomu se poté zpravidla celé rostliny stávají rezistentní vůči několika patogenům.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této práce je vypracování literární rešerše se zaměřením na charakterizaci endofytických hub (*Serendipita indica*, *Microdochium bolleyi*) a patogenních hub (*Fusarium culmorum*, *Ceratobasidium cereale*), dále pak popis modelového organismu *Brachypodium distachyon* včetně jeho významu v rámci výzkumu obilovin a také popis současných znalostí o rostlinné imunitě. V neposlední řadě jsou zde popsány geny, jejichž exprese může být ovlivněna rostlinnými hormony v rámci reakce rostliny na napadení patogenem či kolonizaci endofyty.

Cílem praktické části je měření exprese genů zapojených do obranných reakcí rostlin pomocí metody kvantitativní Real-time PCR za účelem posouzení reakce rostliny (*B. distachyon*) na napadení patogeny (*C. cereale*, *F. culmorum*) nebo inokulaci endofyty (*S. indica*, *M. bolleyi*).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakterizace organismů

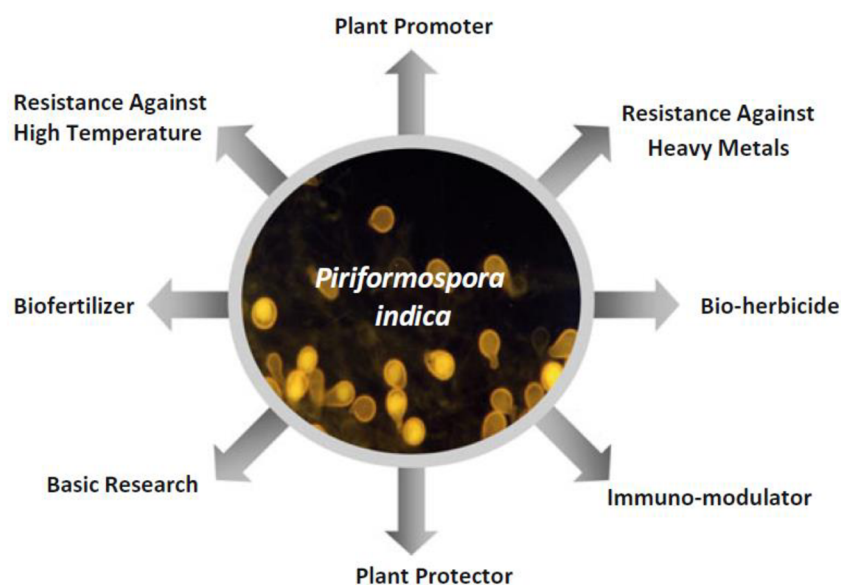
3.1.1 *Serendipita indica* (syn. *Piriformospora indica*)

Endofytická houba *Serendipita indica* byla poprvé objevena v kořenech xerofytů rostoucích v Thárské poušti v západní Indii v roce 1992 (Verma *et al.*, 1998; Varma *et al.*, 1999). Řadí se mezi kořenové endofyty z oddělení Basidiomycota, konkrétně do nově vytvořené čeledi Sebacinaceae a řádu Sebaciniales, kam byla zařazena na základě sekvence 18S rRNA (Weiss *et al.*, 2004). V mnoha aspektech se podobá arbuskulárním mykorrhizním houbám, nicméně hlavní rozdíl, který ji od těchto hub odlišuje, je možnost její kultivace v axenické kultuře (Unnikumar *et al.*, 2013; Gill *et al.*, 2016). Co se týče morfologie, hyfy této houby jsou bílé, téměř hyalinní s tenkou buněčnou stěnou, rozdělené nepravidelně rozmístěnými přepážkami (Unnikumar *et al.*, 2013). Průměr hyf se pohybuje od 0,7 do 3,5 μm a na jejich koncích se vytváří chlamydospory hruškovitého tvaru, a to buď jednotlivě nebo v klastrech (Unnikumar *et al.*, 2013). Velikost genomu *S. indica* je 24,97 Mb (Fesel *et Zuccaro*, 2016).

Hlavní význam této houby spočívá v její schopnosti navázat symbiotický vztah s řadou rostlinných hostitelů (zástupci bryofytů, pteridofytů, nahosemenných a krytosemenných rostlin) (Varma *et al.*, 1999; Borowicz, 2001; Shahollari *et al.*, 2005; Deshmukh *et al.*, 2006; Franken, 2012), během kterého jim může přinášet velké množství výhod (Singhal *et al.*, 2017). Velmi často jde tedy o soužití, jež je prospěšné pro oba zúčastněné organismy (Deshmukh *et al.*, 2006; Saleem *et al.*, 2022). Schopnost *S. indica* kolonizovat kořeny takové široké škály hostitelů (nejen cévnatých rostlin) naznačuje, že si tato houba vyvinula velmi efektivní strategie kolonizace (Unnikumar *et al.*, 2013). Proces kolonizace kořenů houbou *S. indica* zahrnuje několik kroků; začíná klíčením chlamydospor na povrchu kořenů následované penetrací do živých buněk rhizodermis a kortikálních buněk, poté jsou kořeny pokryty hyfami z vnějšku, nicméně houba se nikdy nedostává dovnitř cévních svazků (Deshmukh *et al.*, 2006; Jacobs *et al.*, 2011; Unnikumar *et al.*, 2013). Uvnitř kortikálních buněk vytváří tato houba specifické struktury, které připomínají arbuskuly mykorrhizních hub (Deshmukh *et al.*, 2006). Poslední fáze kolonizace je asociována s buněčnou smrtí (Unnikumar *et al.*, 2013). Bylo prokázáno, že v raných fázích kolonizace se *S. indica* chová jako biotrof a mezi 3. až 5. dnem po inokulaci přechází na saprotrofní způsob života (Deshmukh *et al.*, 2006). Pro tuto fázi životního cyklu je typická rozsáhlá kolonizace mrtvých buněk hostitele a postupný rozklad buněčné stěny kortikálních buněk (Šečić *et al.*, 2021). Nicméně i v této fázi je přítomnost této houby pro rostlinu výhodná (Šečić *et al.*, 2021).

S. indica napomáhá svému hostiteli přijímat či získávat některé živiny (např. zvyšuje asimilaci dusičnanů a rozpustných a nerozpustných forem fosforu) a také přispívá k jeho zvýšené odolnosti vůči abiotickému a biotickému stresu (např. teplotnímu, solnému stresu a také patogenům) (Unnikumar *et al.*, 2013). Příkladem mechanismu jakým *S. indica* zvyšuje příjem dusičnanů svého hostitele je zvýšení exprese genů pro nitrát reduktázu v hostiteli (Unnikumar *et al.*, 2013). Stejně tak bylo zjištěno, že

u některých rostlin způsobuje nárůst v hladině enzymu podílejícího se na degradaci škrobu (angl. glucan-water dikinase) v kořenech a výhoncích (Sherameti *et al.*, 2005, 2008). Zvýšená odolnost vůči suchu u rostlin, které byly kolonizovány houbou *S. indica* souvisí s nárůstem hladiny antioxidantních enzymů, což bylo pozorováno např. u ječmene (Baltruschat *et al.*, 2008). *S. indica* rovněž stimuluje růst rostlin, klíčení semen, časné kvetení prostřednictvím produkce sekundárních metabolitů (Unnikumar *et al.*, 2013; Singhal *et al.*, 2017) a obecně se podílí na nárůstu biomasy plodin, a tedy i jejich výnosu (Varma *et al.*, 1999, 2001; Yadav *et al.*, 2010). Pozitivní vliv endofytu *S. indica* na růst a vývoj, a tedy i výnos byl také pozorován u rostlin *B. distachyon* (Šečić *et al.*, 2021). Stimulace růstu některých rostlin může být dána schopností *S. indica* produkovat auxin anebo zvýšenou produkcí tohoto hormonu či cytokininu v daném hostiteli (Šečić *et al.*, 2021). Potenciálně by *S. indica* mohla být využita jako přírodní herbicid či hnojivo (Singhal *et al.*, 2017). Obecně lze říct, že díky snadné kultivaci *in vitro* a možnosti jejího využití, jak v genetickém, tak molekulárním výzkumu, má tato houba obrovský potenciál v různých odvětvích použití (obr. 1) (Unnikumar *et al.*, 2013).



Obrázek 1: Význam endofytické houby *Serendipita indica* a možnosti jejího využití (Singhal *et al.*, 2017)

3.1.2 *Microdochium bolleyi*

Microdochium bolleyi je druh houby z oddělení Ascomycota, pododdělení Pezizomycotina, třídy Sordariomycetes, řádu Xylariales a čeledi Microdochiaceae (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016). Co se týče způsobu života, *M. bolleyi* je považována za endofytickou houbu, konkrétně ze specifické skupiny endofytů zvané ‘dark-septate septate endohytes (DSE)’ (Rothen *et al.*, 2018). Společným znakem zástupců této skupiny jsou tmavě zbarvené hyfy s přepážkami, chlamydosporami a mikrosklerocii (Rothen *et al.*, 2018). Charakteristickým znakem *M. bolleyi* jsou konidie ve tvaru půlměsíce (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016) a *in vitro* lze pozorovat hyfy tmavě hnědé barvy, které mohou produkovat oranžový pigment (De Hoog *et Hermanides-Nijhof*, 1977). Velikost genomu *M. bolleyi* je 38,84 Mbp (David *et al.*, 2016a). Endofytické houby ze skupiny DSE kolonizují intra nebo intercelulárně parenchym kořenů (Jumpponen *et Trappe*, 1998) bez vyvolání příznaků infekce u daného rostlinného hostitele (Jumpponen, 2001). Výskyt *M. bolleyi* byl zaznamenán především v kořenech či bázích stébel různých druhů trav a obilovin (pšenice, ječmen) (Salt, 1976; Reinecke, 1978). Přestože se *M. bolleyi* uvnitř mnoha svých hostitelů chová jako endofyt, byly zaznamenány případy, kdy tato houba vykazuje slabou patogenitu (Kirk *et Deacon*, 1987ab). Obecně lze říct, že řada druhů endofytických hub se řadí do taxonů, jejichž zástupci jsou typicky patogenní či saprotrofní houby (Galindo-Solis *et Fernández*, 2022; Akram *et al.*, 2023). Z toho důvodu se pak mohou endofytické houby kolonizující některé rostliny stát patogenní, a to zejména pokud dojde ke změnám podmínek prostředí a hostitel je vystaven náhlému stresu (Galindo-Solis *et Fernández*, 2022; Akram *et al.*, 2023).

Hlavní význam houby *M. bolleyi* spočívá v její schopnosti poskytnout rostlinám odolnost vůči různým patogenům a stejně tak je může chránit před suchem a nepříznivými teplotami. Pozitivní vliv této endofytické houby byl pozorován například u pšenice či ječmene, a to především ve smyslu jejich ochrany před řadou patogenních hub jako je *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Kirk *et Deacon*, 1987a; Shadmani *et al.*, 2018) či *Fusarium culmorum* (Knudsen *et al.*, 1995; Duczek, 1997). Dále pak *M. bolleyi* podporuje i samotný růst a vývoj pšenice a ječmene (Shadmani *et al.*, 2018). Pozitivní přínos *M. bolleyi* může být rovněž spatřen u určitých druhů trav rostoucích na pobřežních písčinych dunách, kde jsou tyto rostliny vystaveny mnoha nepříznivým podmínkám (např. půdy s minimální vlhkostí a nedostatkem živin) (David *et al.*, 2016b). Přežití v těchto oblastech jim pravděpodobně umožňují právě endofytické houby jako je např. *M. bolleyi* (Martin *et Dombrowski*, 2015). Nejdůležitější význam této houby (podobně jako u *S. indica*) však pravděpodobně spočívá v jejím využitím v rámci biologické ochrany rostlin. Ukazuje se totiž, že endofytické houby mohou být využity u řady rostlin k vyvolání stavu zvaného indukované rezistence (Conrath *et al.*, 2006; Reglinski *et al.*, 2023).

3.1.3 *Fusarium culmorum*

Fusarium culmorum je všudypřítomný druh houby z oddělení Ascomycota, jež se dále řadí do pododdělení Pezizomycotina, třídy Sordariomycetes, řádu Hypocreales, čeledi Nectriaceae a rodu *Fusarium* (Schermer *et al.*, 2013). Zástupci rodu *Fusarium* jsou běžnou součástí mikroflóry všech polí (Ort, 2007). *F. culmorum* má schopnost saprotrofního způsobu života (Schermer *et al.*, 2013), nicméně jako tzv. fakultativní parazit způsobuje řadu chorob u obilovin souhrnně označovaných jako fuzariózy, a to především u pšenice a ječmene (Schermer *et al.*, 2013). V případě pšenice se jedná buď o klasové fuzariózy (angl. *Fusarium* head blight, FHB) či fuzarióvou hnilobu kořene (angl. *Fusarium* root rot, FRR) (Akinsanmi *et al.*, 2006; Aoki *et al.*, 2012; Schermer *et al.*, 2013). Tato houba je také známá jako tzv. posklizňový patogen (angl. post harvest pathogen), jelikož napadá zejména čerstvě sklizená zrna, která ještě nebyla usušena nebo správně uskladněna (Aldred *et al.*, 2004; Magan *et al.*, 2003, 2010; Lowe *et al.*, 2010; Eifler *et al.*, 2011). To v konečném důsledku vede ke kontaminaci zrn mykotoxiny a snížení výnosu a kvality zemědělsky významných plodin (Schermer *et al.*, 2013). Právě schopnost zástupců z rodu *Fusarium* produkovat mykotoxiny je jedním z hlavních důvodů, proč tyto patogeny způsobují tak velké ekonomické ztráty (Kant *et al.*, 2011). Produkce mykotoxinů, jako jsou trichothecen a estrogenní mykotoxiny nivalenol (NIV) či deoxynivalenol (DON) a zearalenon (Kant *et al.*, 2011), je však značně ovlivněna teplotou a vlhkostí (Tanaka *et al.*, 1988; Homdork *et al.*, 2000). Zejména pak produkce trichothecenů je podmíněna vysokou vlhkostí (Llorens *et al.*, 2004) a je řízena expresí genu *TRI5*, který kóduje klíčový enzym biosyntézy trichothecenů, a to trichodien syntázu (Kang *et al.*, 2002; Beccari *et al.*, 2011).

F. culmorum napadá jak nadzemní, tak podzemní části (Ort, 2007). Příznaky fuzarióvé hniloby kořene se mohou lišit v závislosti na tom, kdy je rostlina napadena. Pokud dojde k napadení v raném vývojovém stádiu dané rostliny, tzn. ihned po zasetí nebo těsně před nebo po vyklíčení, dojde ke smrti a lze pozorovat nahnědlé diskolorace na koleoptile a kořenech (Schermer *et al.*, 2013). Pokud dojde k infekci v pokročilejším stádiu vývoje, tak poté lze na prvních dvou nebo třech internodiích hlavního stébla pozorovat hnědé léze a také dochází k odumření odnoží (Schermer *et al.*, 2013). Za vysoké vlhkosti lze pozorovat načervenalé až růžové diskolorace na jednotlivých nodech, což je způsobeno přítomností sporulujícího mycelia (Schermer *et al.*, 2013).

Klasová fuzarióza se projevuje vybělenými klásky, přičemž tuto změnu lze pozorovat pouze u několika málo klásků nebo v rámci celého klasu, a to zejména u rostliny pšenice, která ještě zcela nedosáhla stádia zralosti (Schermer *et al.*, 2013). Zpočátku se infikované klásky jeví jako světle hnědé a později tmavnou, v důsledku napadení zůstanou prázdné nebo obsahují svařštělé do šeda či hněda zbarvené obilky (Schermer *et al.*, 2013). Navíc v oblasti báze klásků lze při vysoké vlhkosti pozorovat růžovo-oranžová sporodochia (Schermer *et al.*, 2013). Podobně jako ostatní patogeny způsobující klasové fuzariózy se *F. culmorum* na počátku infekce chová jako biotrof, avšak jakmile začne produkovat trichothecen a enzymy štěpící buněčnou stěnu (angl. cell wall-degrading enzymes, CWDEs), stává se z ní nekrotrof (Leonard *et al.*, 2003).

Identifikace této houby může být založena na detekci specifických morfologických znaků, konkrétně tvaru makrokonidií na sporodochiích, které tato houba tvoří na příslušném agarovém médiu (Scherm *et al.*, 2013). Další možností je využití molekulárního způsobu detekce, nejčastěji pomocí PCR (Scherm *et al.*, 2013). *F. culmorum* přežívá jako mycelium v nesklizených zbytcích na polích, případně v půdě ve formě chlamydospor 2–4 roky (Cook, 1980; Inglis *et al.*, 1986; Bateman *et al.*, 1998).

3.1.4 *Ceratobasidium cereale*

Ceratobasidium cereale (anam.: *Rhizoctonia cerealis*) je zástupce z oddělení Basidiomycota, v rámci kterého se řadí do specifické skupiny hub označovaných jako *Rhizoctonia*-like (*Rh*-like) společně s dalšími zástupci z čeledi Ceratobasidiaceae, Tullasnellaceae a řádu Sebaciniales (Hamada *et al.*, 2011; Bleša *et al.*, 2021). Zatímco název *Rhizoctonia cerealis* se používá pro anamorfní (nepohlavní) stádium, *Ceratobasidium cereale* je název užívaný pro teleomorfní (pohlavní) stádium této houby (Hamada *et al.*, 2011; Bleša *et al.*, 2021). Co se morfologie týče, hyfy *C. cereale* jsou užší a rostou pomaleji než hyfy příbuzného druhu *R. solani* a barva mycelia může být bílá až hnědá (Hamada *et al.*, 2011). Všechny buňky *C. cereale* mají dvě jádra, což je dalším znakem odlišující tuto houbu od *R. solani*, jejíž buňky mají jader několik (Hamada *et al.*, 2011). Příznaky, které lze na rostlinách pozorovat v důsledku infekce patogenem *C. cereale*, nejsou dostačující k odlišení tohoto organismu od dalších houbových patogenů rostlin, jako je např. *Oculimacula yallundae*, zástupci z rodu *Fusarium* či *Microdochium nivale* (Hamada *et al.*, 2011). Molekulární metody, především různé typy PCR poskytují mnohem přesnější a spolehlivější způsob detekce většiny fytopatogenů (Hamada *et al.*, 2011).

C. cereale se řadí mezi půdní patogeny rostlin, které velmi často způsobují rozsáhlé poškození zemědělských plodin, jelikož své hostitele omezují v příjmu vody a živin a následkem toho snižují i jejich výnos a kvalitu (Hamada *et al.*, 2011). Navíc infekce tímto patogenem způsobuje zvýšenou kolonizaci postižených rostlin (zejména obilok) dalšími houbami, ať už patogenními (*F. culmorum*) nebo nepatogenními (*M. bolleyi*) druhy (Lemańczyk *et al.*, 2013). *C. cereale* přežívá v půdě nebo na posklizňových infikovaných zbytcích v podobě sklerocií a mycelií, přičemž neprodukuje asexuální spory (Hamada *et al.*, 2011). Jedná se o patogenní houbu se širokým spektrem hostitelů (může napadat obiloviny, bavlník, lilek brambor, cukrovou řepu či některé luštěniny), u kterých způsobuje různé typy onemocnění (Kataria *et al.*, 1988; Tomaso-Peterson *et al.*, 2007). Houba *C. cereale* je obzvláště významným patogenem pšenice, a to v různých oblastech po celém světě, jelikož u ní způsobuje závažné onemocnění zvané lemovaná stébelná skvrnitost (angl. sharp eyespot disease) (Hamada *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Rostlinolékařský portál (eagri.cz)). Jak název napovídá, jedná se o chorobu báze stébel, ale stejně tak tato choroba postihuje i kořeny (Lemańczyk *et al.*, 2013).

C. cereale napadá rostliny pšenice v jakékoli vývojové fázi (Hamada *et al.*, 2011), a to zejména kořeny a báze stébel, přičemž výrazné poškození způsobuje lemovaná stébelná skvrnitost především u mladých rostlin (Innocenti *et al.*, 2003; Hamada *et al.*, 2011). U dospělých rostlin pšenice se charakteristické symptomy objevují na spodních částech listových pochev a stébel, a to v podobě oválných skvrn s tmavými okraji (odtud angl. název sharp eyespot disease) (Hamada *et al.*, 2011).

U infikovaných rostlin pšenice dochází mimo jiné i ke zničení transportních pletiv, což poté vede k blokaci transportu látek nutných pro výživu rostliny (Hamada *et al.*, 2011). Včasná a správná identifikace je nezbytná pro výběr správného fungicidu pro ošetření infikovaných rostlin (Hamada *et al.*, 2011).

3.1.5 *Brachypodium distachyon*

Brachypodium distachyon je druh trávy z rodu *Brachypodium*, z podčeledi Pooideae a čeledi Poaceae, která zahrnuje dalších 11 podčeledí (Kellogg, 2015). Tento druh trávy se svými vlastnostmi podobá především pšenici (*Triticum*), ječmenu (*Hordeum*) a rýži (*Oryza*), nicméně blízkým příbuzným druhem je pšenice (Kellogg, 2015). Je tedy více pravděpodobné, že tytéž znaky, které mají původ ve společném předku se budou současně vyskytovat u pšenice a *B. distachyon*, ale nikoliv u rýže (Kellogg, 2015). Předpokládá se, že *B. distachyon* se společně s pšenicí a ječmenem od společného předka oddělily asi před 40 miliony lety (International Brachypodium Initiative, 2010). Druh *B. distachyon* je původem ze Středomoří, ale postupně se celosvětově rozšířil do oblastí mírného pásma (Catalán *et al.*, 2012). Co se morfologie týče, *B. distachyon* je rostlina relativně malého vzrůstu (15–20 cm) (Li *et al.*, 2012), má 2 nebo 3 prašníky (Catalán *et al.*, 2012; Kellogg, 2015) a počet klásků se pohybuje v rozmezí 5 až 9.

B. distachyon je modelový organismus jednoděložných rostlin (zejména obilovin), který se vyznačuje výhodnými vlastnostmi jako je krátká generační doba (za 6–8 týdnů vytvoří semena; ‘6–8 weeks from seed to seed’) (Garvin *et al.*, 2008; Scholthof *et al.*, 2018), malý diploidní kompaktní genom (asi 300 Mbp), který již byl zcela osekvenován a oproti například pšenici obsahuje mnohem méně repetitivní DNA (International Brachypodium Initiative, 2010). Pro *B. distachyon* je také typická samosprašnost, to znamená, že již po dvou generacích samooplození lze získat homogenní (inbrédní) linie (Vogel *et al.*, 2009). Také je výhodné, že může být geneticky transformován pomocí bakterie *Agrobacterium* (Draper *et al.*, 2001; Thole *et al.*, 2010; Bragg *et al.*, 2012; Dalmais *et al.*, 2013; International Brachypodium Initiative, 2010).

3.1.5.1 Možnosti využití organismu *Brachypodium distachyon*

Domestikace obilovin vedla k drastickému snížení jejich genetické diverzity ve srovnání s příbuznými divokými druhy (Buckler *et al.*, 2001). Nicméně druh *B. distachyon* nebyl nikdy domestikován, a tudíž je u něj zachována maximální genetická variabilita, což je také důvodem, proč tento druh může sloužit jako modelová obilovina ve výzkumu v oblastech funkční genomiky (Girin *et al.*, 2014). Díky tomu lze snadno identifikovat funkci klíčových genů podmiňující agronomicky výhodné znaky, přičemž díky vysoké syntenii mezi chromozomy *B. distachyon* a pšenice či ječmene a na základě identifikace markerů v těsné vazbě s významnými geny, lze i u těchto příbuzných druhů následně nalézt tyto geny (Girin *et al.*, 2014). Velmi často je cílem nalézt geny, které podmiňují rezistenci vůči patogenům napadající obiloviny, vzhledem k charakteru genomu pšenice, který je vysoce komplexní a polyploidní, je však tento proces velice obtížný (Fitzgerald *et al.*, 2015).

Nicméně genetická rezistence je ideálním způsobem ochrany rostlin před patogeny. Tudíž je výhodné mít k dispozici modelový organismus jako je právě *B. distachyon*, jehož genom je mnohem menší, a navíc se ukazuje, že může být infikován řadou patogenů napadající obiloviny (Girin *et al.*, 2014). Lze tedy na něm studovat vliv a způsob interakce houbových patogenů se zemědělsky významnými obilovinami, přičemž to pak může samotnou identifikaci významných genů usnadnit (Fitzgerald *et al.*, 2015). Peraldi *et al.*, 2011 prokázali, že *B. distachyon* může být snadno infikován jak patogenem *F. culmorum*, tak *F. graminearum*, a to prostřednictvím metod, jež jsou využívány k inokulaci a tedy k vyvolání onemocnění klasová fuzarióza u pšenice. Dále může být *B. distachyon* napaden i některým druhem rzi, konkrétně druhem *Puccinia brachypodii*, přičemž tento patogen se nejvíce podobá patogenu *Puccinia striiformis*, který napadá pšenici (Fitzgerald *et al.*, 2015). Ukazuje se však, že *B. distachyon* vykazuje tzv. nehostitelskou rezistenci vůči některým druhům rzi (Ayliffe *et al.*, 2013), což je schopnost rostliny být rezistentní vůči všem formám daného patogenu, ať už jde o rasu, izolát anebo patovar (Fitzgerald *et al.*, 2015). V některých případech již bylo prokázáno, že schopnost nehostitelské rezistence je dědičná, a tudíž je *B. distachyon* ideálním kandidátem pro osvětlení molekulární podstaty tohoto mechanismu (Ayliffe *et al.*, 2013). Díky tomu lze identifikovat geny podmiňující rezistenci vůči těmto patogenům, přičemž ve srovnání s pšenicí, je celý proces vzhledem k charakteru genomu *B. distachyon* mnohem jednodušší. Stejně tak je *B. distachyon* vhodným organismem ke studiu reakce obilovin či jiných druhů trav na napadení patogeny či hmyzem (Sandoya *et Buanafina*, 2014). Při kontaktu rostliny s patogenem hraje důležitou roli buněčná stěna, která představuje první ochranou bariéru (Sandoya *et Buanafina*, 2014). Je tudíž důležité, aby modelový organismus mimo jiné sdílel podobnou stavbu buněčné stěny jako organismy, u kterých nelze danou vlastnost přímo studovat (Sandoya *et Buanafina*, 2014). To neplatí pro modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*, což je jeden z důvodů, proč není pro účely studia různých aspektů obilovin vhodná (Sandoya *et Buanafina*, 2014).

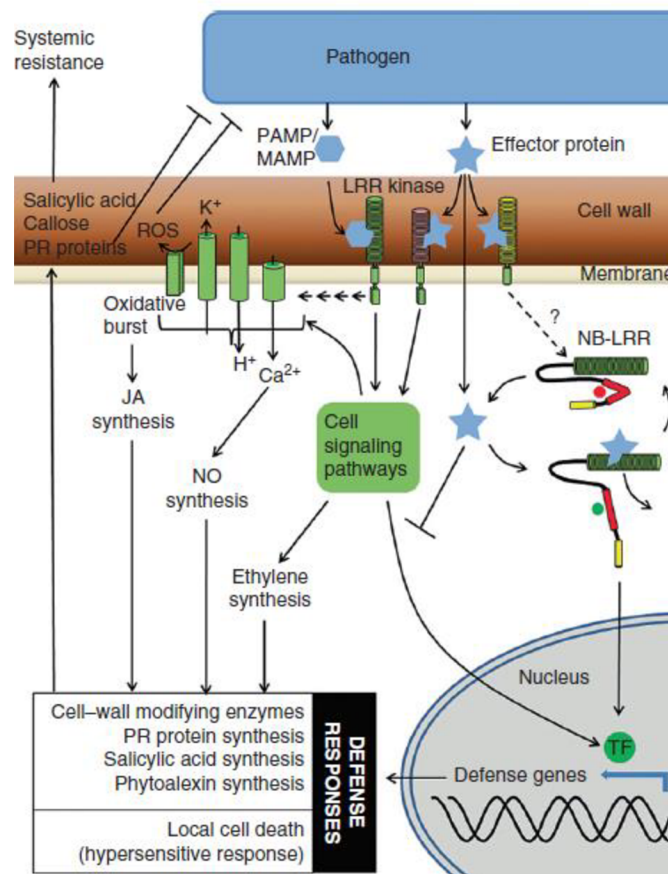
3.2 Imunita rostlin

Mezi vůbec první formu obrany rostlin patří strukturální bariéry jako je buněčná stěna, kutikula, kůra či trichomy (Freeman *et Beattie*, 2008; Kant *et al.*, 2011), případně různé modifikace buněčné stěny v podobě jejího zesílení ligninem nebo tvorby kalózových papil v místě průniku patogenu do rostliny (Freeman *et Beattie*, 2008; Sabol *et Pilátová*, 2020). Jedná se o tzv. pasivní obranné mechanismy (Freeman *et Beattie*, 2008), které představují první typ imunitní odpovědi rostlin (Sabol *et Pilátová*, 2020). Mezi tyto mechanismy se kromě fyzikálních bariér řadí i různé chemické látky s antimikrobiálním účinkem, a to zejména sekundární metabolity jako jsou terpeny, alkaloidy, fenoly (Freeman *et Beattie*, 2008). Druhým významným typem imunitní odpovědi rostlin jsou (aktivní) obranné mechanismy, které jsou spuštěny až poté, co dojde k rozpoznání patogenu (Freeman *et Beattie*, 2008). Procesy, které jsou aktivovány až po rozpoznání daného patogenu představují základ vrozené imunity neboli bazální rezistence rostlin (obr. 2) (Freeman *et Beattie*, 2008; Kant *et al.*, 2011) a podle Jones *et Dangl*, 2006 lze jejich průběh rozdělit do čtyř fází.

První fáze a zároveň první linie vrozeného imunitního systému rostlin zahrnuje rozpoznání tzv. konzervovaných molekulárních struktur MAMPs (z angl. Microbe-Associated Molecular Patterns) prostřednictvím PRR receptorů (z angl. pattern recognition receptors) (Choi *et* Klessig, 2016), které jsou lokalizované na vnějším povrchu cytoplazmatické membrány (Zipfel, 2014). PRR receptory mohou být buď receptorové kinázy nebo tzv. ‘receptor-like proteins’ (RLPs) (Zipfel, 2014). Receptorové kinázy se skládají z extracelulární části, která umožňuje rozpoznání a vazbu ligandu, dále pak z transmembránové části a intracelulární části vyznačující se kinázovou aktivitou (Zipfel, 2014). ‘Receptor-like’ proteiny mají podobnou stavbu, ale chybí jim intracelulární kinázová doména (Zipfel, 2014). MAMPs představují molekuly, jejichž chemická struktura je obecně konzervovaná uvnitř různých skupin organismů, ale chybí u samotného hostitele, a proto je rozpoznává jako cizí (Choi *et* Klessig, 2016). MAMPs struktury výhradně patogenního původu jsou někdy označovány také jako tzv. PAMPs (z angl. Pathogen-Associated Molecular Patterns) a příkladem mohou být bakteriální lipopolysacharidy, lipoproteiny, peptidoglykany, elogační faktor EF-Tu, flagellin nebo také β -glukan u oomycet a v případě hub chitin přítomný v buněčné stěně (Jones *et* Dangl, 2006; Kant *et al.*, 2011). Případně se mezi molekulární vzory MAMPs řadí i tzv. DAMPs (z angl. cell wall derived Damage-Associated Molecular Patterns), které představují molekuly endogenního původu, jež jsou uvolňovány uvnitř daného hostitele po napadení patogenem (Jones *et* Dangl 2006; Boller *et* Felix, 2009) či v důsledku vystavení rostliny environmentálnímu stresu (sucho, vysoká koncentrace soli) (Choi *et* Klessig, 2016). Konkrétně se jedná především o úlomky stavebních jednotek buněčné stěny rostlinné buňky, jako jsou složky celulózy, pektinů (např. oligogalakturonidy) a kutinu (Sabol *et* Pilátová, 2020) nebo také systemin či extracelulární ATP (eATP) (Choi *et* Klessig, 2016).

Samotné rozpoznání těchto struktur receptory PRR vede k aktivaci signální kaskády mitogeny aktivovaných protein kináz (=MAPK kaskády) a následkem toho dochází ke spuštění exprese například genů *WRKY* (Nakagami *et al.*, 2005; Kant *et al.*, 2011; Choi *et* Klessig, 2016). Produkty *WRKY* genů jsou DNA-vazebné proteiny, respektive transkripční faktory obsahující *WRKY* doménu (Kant *et al.*, 2011), které se podílejí na regulaci exprese řady genů, jejichž produkty hrají důležitou roli v antimikrobiální ochraně (např. geny kódující PR proteiny nebo enzymy syntetizující antimikrobiální látky-fytoalexiny) (Nakagami *et al.*, 2005; Kant *et al.*, 2011). Tato první úroveň/linie vrozeného imunitního systému se označuje jako PAMP spuštěná imunita (angl. PAMP-Triggered Immunity, PTI), obecněji jako MAMP spuštěná imunita (angl. MAMP-Triggered Immunity, MTI) (Baron *et* Rigobelo, 2022). Nicméně patogeny jsou někdy schopny překonat tuto první linii obrany, a to prostřednictvím vnesení tzv. efektorových proteinů dovnitř rostlinných buněk, jež následně inhibují receptory nebo signální proteiny hostitele (Kant *et al.*, 2011), to představuje druhou fázi imunitního systému. Na druhou stranu jsou rostliny schopny se vypořádat s těmito efektorovými proteiny patogenního původu prostřednictvím specifických receptorů označovaných jako NB-LRR (angl. nucleotide-binding LRR), jež umí rozpoznat a následně buď přímo nebo nepřímo potlačit účinek těchto efektorových molekul (Kant *et al.*, 2011). Tento mechanismus rezistence se nazývá efektorem spuštěná imunita (angl. Effector-

Triggered Immunity, ETI) (Jones *et Dangl*, 2006; Kant *et al.*, 2011). ETI tedy představuje třetí fázi, kdy se v podstatě jedná o zesílenou a zrychlenou „verzi“ PTI odpovědi, jejíž výsledkem je zvýšená rezistence rostlin vůči danému onemocnění (Jones *et Dangl*, 2006). Jako čtvrtou fází lze označit situaci, kdy patogenní organismy vlivem přírodního výběru odolávají účinkům ETI díky tomu, že se zbaví či pozmění gen kódující efektorový protein nebo získají jiné efektorové molekuly, které nejsou rostlinnými receptory rozpoznány a mechanismy ETI jsou tudíž potlačeny (Jones *et Dangl*, 2006; Mejía-Teniente *et al.*, 2022). V této situaci se však rostlina může bránit prostřednictvím spuštění tzv. hypersenzitivní reakce, která zahrnuje programovanou smrt buněk v místě infekce (Freeman *et Beattie*, 2008). Tímto způsobem je rostlina schopna zamezit patogenu přístup k vodě a živinám, a tak se ochránit před následným poškozením (Freeman *et Beattie*, 2008).



Obrázek 2: Zjednodušený souhrn procesů, které jsou spuštěny po rozpoznání patogenu rostlinnými PRR receptory (Kant *et al.*, 2011)

3.2.1 Antifungální proteiny

Antifungální proteiny jsou rozsáhlou skupinou strukturně odlišných stresových proteinů, které představují jeden ze způsobů, jakým se rostliny, ale i další organismy brání před patogenními houbami (Selitrennikoff, 2001; Heřmanová *et al.*, 2006). Základní mechanismus účinku antifungálních proteinů

spočívá v omezení až úplném potlačení růstu houbových patogenů (Selitrennikoff, 2001). Existují stovky různých antifungálních proteinů a peptidů (Selitrennikoff, 2001), nicméně v rámci této práce budou popsány pouze základní skupiny nejvýznamnějších antifungálních proteinů u rostlin, a to proteinů PR (Theis *et Stahl*, 2004; Heřmanová *et al.*, 2006). Anglický název ‘pathogenesis-related proteins’ odráží skutečnost, že PR proteiny byly poprvé detekovány v listech tabáku, přičemž byla pozorována zvýšená reakce těchto proteinů na virus mozaiky tabáku (van Loon *et Van Kammen*, 1970). Proteiny PR byly rozděleny na základě analýzy aminokyselinové sekvence a serologických vlastností nejprve do pěti hlavních tříd/rodin: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5 (van Loon, 1985; Theis *et Stahl*, 2004). Proteiny s podobnými vlastnostmi, ale vyskytující se v jiných organismech se nazývají jako tzv. proteiny podobné rostlinným PR proteinům (angl. ‘PR-1/5-like’) (Theis *et Stahl*, 2004). Každá z pěti tříd PR proteinů je dále rozdělena do dvou podtříd proteinů, a to na bazické a kyselé (Selitrennikoff, 2001). Zatímco bazické PR proteiny se v rostlinné buňce vyskytují ve vakuole, kyselé PR proteiny se vyskytují v extracelulárním prostoru (Selitrennikoff, 2001). Podle van Loon *et al.*, 2006 je správné za proteiny PR označovat pouze ty proteiny, které tzv. souvisí s obrannými mechanismy indukovanými napadením rostliny patogenem (angl. inducible defense-related proteins). To znamená, že se jedná o proteiny, které jsou téměř nedetekovatelné ve zdravých pletivech a bylo dokázáno, že k jejich indukci dochází po infekci rostliny jedním či více patogeny (van Loon *et al.*, 2006).

Proteiny skupiny PR-1 se podobají skupině proteinů bohatých na cystein (Selitrennikoff, 2001). Tyto proteiny jsou velmi často využívány jako markery rostlinného hormonu kyseliny salicylové (exprese *PR-1* genu je indukována SA), respektive jako markery stavu systémově indukované rezistence (SAR) (Heřmanová *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2012). Mechanismus antifungální aktivity této skupiny proteinů není znám, nicméně jeden z možných účinků je interakce s membránovými kanály cílových buněk, čímž dochází k blokadě uvolňování vápenatých iontů a následně k lyzi buněk (Selitrennikoff, 2001; Heřmanová *et al.*, 2006). Podle novější studie (Gamir *et al.*, 2017) mají PR-1 proteiny schopnost vázat steroly, čímž se následně stávají tyto látky nedostupné pro patogeny, které bez sterolů nejsou schopny přežít. Vazba na steroly je tedy jeden z dalších možných způsobů, jakým PR-1 proteiny potlačují šíření některých patogenních hub v rostlinném hostiteli. Proteiny PR-2 (β -glukanázy) se vyznačují, jak již název napovídá, β -1,3-endoglukanázovou aktivitou (Selitrennikoff, 2001). Jejich mechanismus účinku tedy spočívá v hydrolýze β -glukanu, který je součástí buněčné stěny hub, přičemž se předpokládá, že k tomu dochází především v oblasti vzrostného vrcholu hyf (Selitrennikoff, 2001). Následkem degradace β -glukanu je oslabení buněčné stěny, což poté vede k buněčné lyzi, a tedy k buněčné smrti. Významné jsou i proteiny skupiny PR-3 (chitinázy), které mají endochitinázovou aktivitu, a tudíž se podílejí na degradaci chitinu v buněčné stěně (Selitrennikoff, 2001; Heřmanová *et al.*, 2006). V konečném důsledku to opět vede k oslabení buněčné stěny buněk hub (Selitrennikoff, 2001). Proteiny skupiny PR-4 jsou poté tzv. chitin-vazebné proteiny, přičemž ne všichni zástupci tuto aktivitu vykazují. Poslední zmíněnou skupinou jsou proteiny skupiny PR-5 nebo také nazývané jako proteiny podobné thaumatinu (Selitrennikoff, 2001). Tyto proteiny jsou vysoce odolné

vůči degradaci proteolytickými enzymy (Selitrennikoff, 2001). Možným mechanismem antifungálního účinku je změna permeability buněčné stěny hub tvorbou pórů (Roberts *et al.*, 1990; Edreva *et al.*, 2004), β -1,3-endoglukanázová aktivita a narušení tvorby buněčné stěny (Yun *et al.*, 1997, 1998).

Postupně byly k popsaným třídám PR proteinů přidány další třídy a v současnosti je rozlišováno až 17 různých tříd/rodin PR proteinů (van Loon, *et al.*, 2006). Kromě výše zmíněných zástupců se k PR proteinům řadí i proteiny s peroxidázovou aktivitou, inhibitory proteáz, defensin, thionin, proteiny podobající se ribonukleázám, oxalát oxidáza a jiné (van Loon *et al.*, 2006).

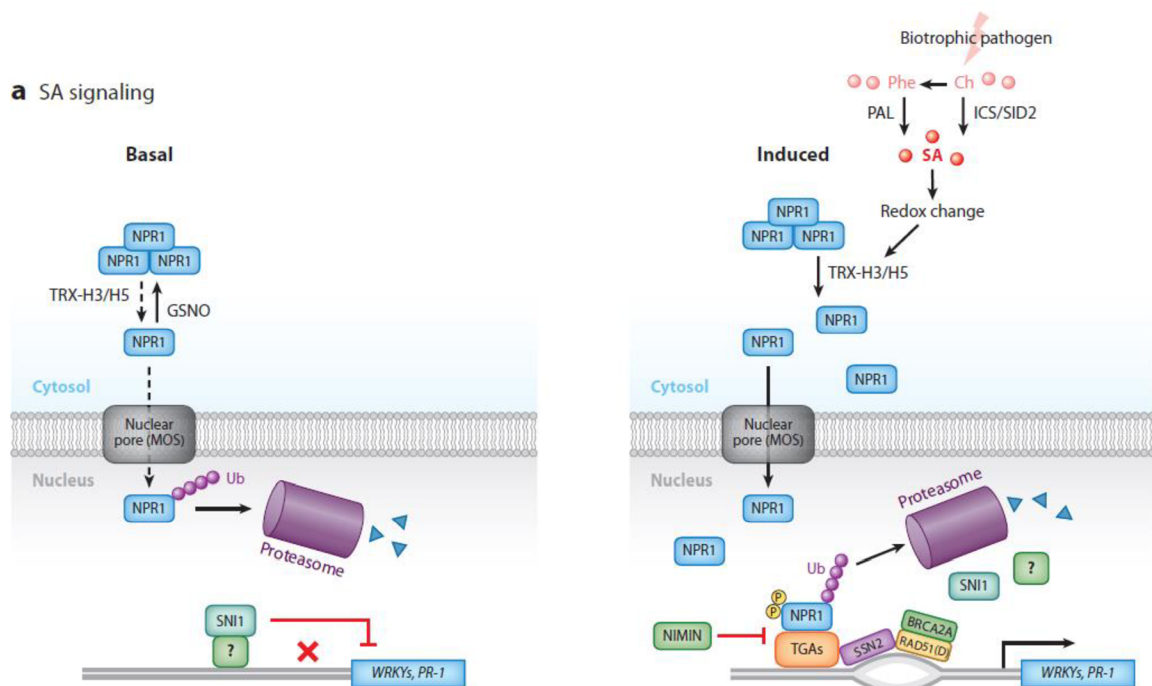
3.2.2 Fytohormony

V interakci mezi patogenem a hostitelem hrají velmi významnou roli fytohormony, a to zejména kyselina salicylová (SA) a kyselina jasmonová (JA). Ke zvýšené syntéze kyseliny salicylové v infikovaném pletivu dochází zejména po napadení rostliny biotrofními patogeny (Kant *et al.*, 2011), jež získávají živiny přímo z pletiva hostitele (Pieterse *et al.*, 2012). Na druhou stranu etylén či kyselina jasmonová hrají důležitou roli v obraně rostlin vůči nekrotrofním patogenům (Pieterse *et al.*, 2012). Nekrotrofní patogeny nejprve zničí buňky hostitele, často prostřednictvím účinku různých fyto toxinů či enzymů degradujících složky buněčné stěny a teprve poté z nich získávají živiny (Pieterse *et al.*, 2012).

3.2.2.1 Signální dráha kyseliny salicylové

Kyselina salicylová hraje ústřední roli v rostlinné imunitě, neboť se účastní řady obranných reakcí jako je produkce antimikrobiálních látek, spouští expresi obranných genů a také se podílí na rozvoji hypersenzitivní reakce (Vlot *et al.*, 2009). Uplatňuje se, jak již bylo zmíněno, zejména v ochraně rostlin vůči biotrofním patogenům (Glazebrook, 2005). Jedná se o fenolickou látku, která může být syntetizována z primárního metabolitu (chorismátu) dvěma rozdílnými enzymatickými dráhami, a to buď prostřednictvím enzymu fenylalanin amoniak lyázy (PAL) nebo isochorismát syntázy (ICS/SID2) (Pieterse *et al.*, 2012). Syntéza kyseliny salicylové je spuštěna v průběhu PTI a ETI jakmile dojde k rozpoznání PAMPs/MAMPs struktur nebo efektorových molekul daného patogenu (Mishina *et al.*, 2007). Downstream signalizace SA je z velké části kontrolována regulačním proteinem NPR1 (z angl. NON-EXPRESSOR OF *PR GENES*1), který po aktivaci SA slouží jako transkripční koaktivátor genů zapojených do obranné reakce rostlin (angl. defense-related genes), jako jsou například již zmíněné geny kódující PR proteiny (Dong, 2004; Moore *et al.*, 2011). Důležitým regulačním krokem v průběhu SA signalizace je translokace NPR1 do jádra (Pieterse *et al.*, 2012). V nepřítomnosti SA (v buňkách patogeny nepostížených rostlin) se NPR1 protein nachází převážně v cytoplazmě, a to v podobě oligomerní struktury, která je stabilizována intermolekulárními disulfidickými můstky (Tada *et al.*, 2008). Malá část molekul NPR1 proteinu se vyskytuje jako monomer, nicméně monomerní NPR1 proteiny jsou konstitutivně translokovány do jádra, kde podstupují ubiquitinaci a následně degradaci v proteazomu (Spoel *et al.*, 2009). Díky tomu je zabráněno předčasné aktivaci NPR1 cílových genů (Spoel *et al.*, 2009). V přítomnosti SA (v buňkách napadených rostlin, angl. SA-stimulated cells) je

velké množství monomerního NPR1 proteinu translokováno do jádra skrz jaderné póry (např. MOS), kde následně dochází k jeho interakci s transkripčními faktory (TF) TGA rodiny bZIP (z angl. basic leucine zipper), jež se vážou do oblasti promotorů SA-responzivních genů jako je například gen *PR-1* (Després *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2002). V rámci tohoto procesu dochází zároveň k fosforylaci NPR1 proteinu a následně k ubikvitinaci E3-ubikvitin ligázou se zvýšenou afinitou pro fosforylovaný NPR1 protein, takto modifikovaný NPR1 protein je nakonec degradován v proteazomu (Spoel *et al.*, 2009). Odstranění fosforylovaného NPR1 z promotoru cílového genu je nutné pro úplnou indukci cílových SA-responzivních genů a také pro následné navázání nových NPR1 monomerů, které znovu zahájí transkripční cyklus (Spoel *et al.*, 2009). Proteiny NIMIN 1, 2, 3 (NIM1-interacting1) a SNI1 působí jako negativní regulátory SA-indukovaných genů (Weigel *et al.*, 2005; Pieterse *et al.*, 2012). Jakmile je signální dráha kyseliny salicylové aktivována v místě infekce, dochází k její aktivaci i na vzdálenějších místech rostliny, díky tomu jsou poté před poškozením chráněny dosud zdravé, nepostížené části rostliny (Pieterse *et al.*, 2012). Tímto způsobem dojde u rostliny k indukci dlouhotrvající rezistence se širokým spektrem účinku a tento stav se nazývá systémově získaná rezistence (SAR) (Vlot *et al.*, 2009). Signalizace kyseliny salicylové před a po napadení rostliny patogenem je znázorněna na obrázku 3.



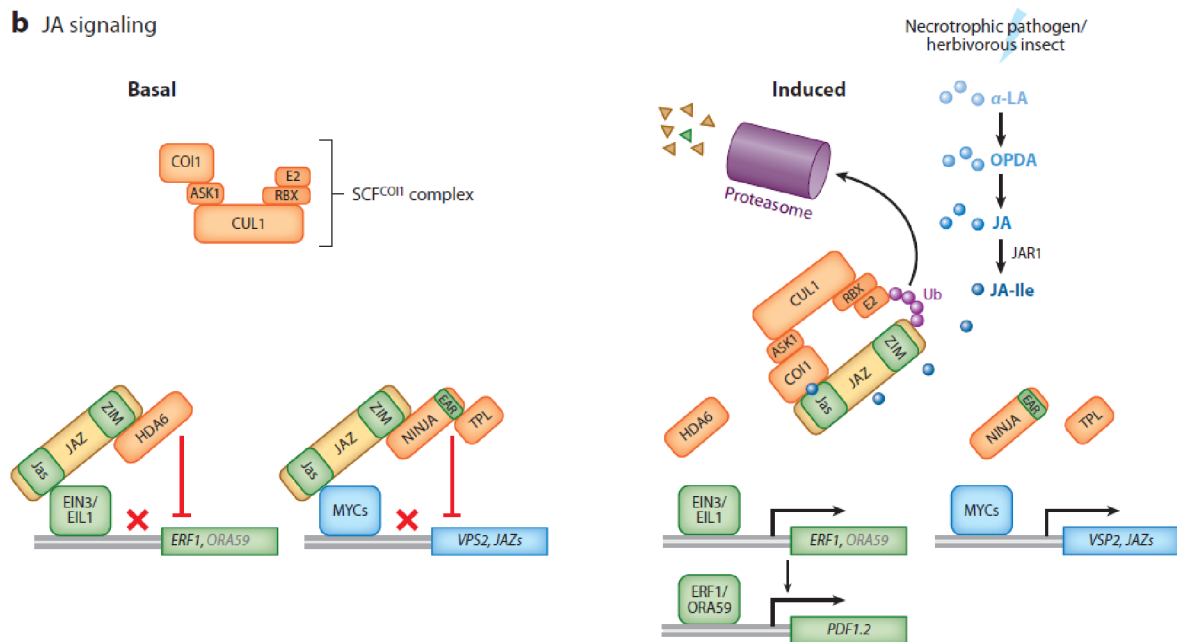
Obrázek 3: Signalizace kyseliny salicylové (SA) před (nalevo) a po (napravo) rozpoznání biotrofního patogenu; v buňkách napadených rostlin dochází k syntéze SA, transportu monomerního NPR1 do jádra přes jaderné póry, interakci NPR1 s transkripčními faktory TGA, indukci exprese SA-responzivních genů, degradaci fosforylovaného NPR1 v proteazomu, lze pozorovat i místo působení inhibitorů (NIMIN a SNI1) (Pieterse *et al.*, 2012)

3.2.2.2 Signální dráha kyseliny jasmonové

Kyselina jasmonová a další strukturálně příbuzné metabolity patří mezi lipidové sloučeniny, které jsou syntetizovány přes oxylipinovou biosyntetickou dráhu (Wasternack *et al.*, 2017). Biosyntéza

kyseliny jasmonové začíná po napadení rostliny daným patogenem nebo hmyzem a jako prekurzor slouží kyselina α -linolenová (α -LA), která je uvolňována z lipidů chloroplastových membrán pomocí enzymu fosfolipázy (Wasternack *et* Song, 2017). Mezi významné enzymy biosyntézy patří lipoxygenáza (LOX), allen oxid syntáza (AOS) a allen oxid cykláza (AOC) (Wasternack *et* Song, 2017). Kyselina jasmonová může být dále metabolizována na methyl jasmonát (MeJA) a to pomocí enzymu JA karboxyl methyltransferázy (JMT) (Seo *et al.*, 2001). Dále může vytvářet konjugáty s aminokyselinami, například s izoleucinem prostřednictvím enzymu JA konjugát syntázy (Staswick *et* Tiryaki, 2004) za vzniku biologicky aktivního enantiomeru sloučeniny jasmonoyl-izoleucin (JA-Ile) (Fonseca *et al.*, 2009). Klíčovým regulátorem signální dráhy kyseliny jasmonové je protein COI1 (z angl. CORONATINE INSENSITIVE1) patřící mezi tzv. F-box proteiny (Pieterse *et al.*, 2012). Společně s proteiny obsahující JAZ doménu (z angl. JASMONATE ZIM), jež fungují jako represory transkripce, COI1 funguje jako receptor pro JA-Ile v komplexu SCF^{COI1}E3-ubikvitin-ligáza-SKP1-Cullin-F-box (Yang *et al.*, 2009; Sheard *et al.*, 2010). Navázání JA-Ile na COI1 vede k ubikvitinaci a následné degradaci JAZ proteinů v proteazomu (Pauwels *et* Goossens, 2011). V buňkách nepostížených rostlin JAZ proteiny fungují jako represory JA signální dráhy, a to tak, že se vážou na transkripční faktory MYC 2, 3, 4 z rodiny bHLH-zip (z angl. basic helix-loop-helix leucine zipper proteins) (Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2011). Adaptorový protein NINJA (NOVEL INTERACTOR OF JAZ) interaguje se ZIM doménou většiny JAZ proteinů a společně s korepresorem TPL (TOPLESS) zabráňuje předčasné aktivaci JA dráhy (Pauwels *et al.*, 2010). V buňkách stimulovaných JA (v napadených rostlinách) dochází k fyzickému přerušení kontraktu mezi JAZ proteiny a transkripčními aktivátory (TF MYC), což vede k reaktivaci signální dráhy JA a spuštění exprese řady JA-responzivních genů (Memelink, 2009). U *A. thaliana* byly rozpoznány dva možné průběhy neboli ‘větve’ (z angl. branches) signální dráhy kyseliny jasmonové, a to tzv. MYC větev a ERF větev (Pieterse *et al.*, 2012). MYC větev je řízena již zmíněnými MYC transkripčními faktory, které spouští expresi JA-responzivního genu *VSP2* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN2*), jež slouží jako marker JA (Pieterse *et al.*, 2012). MYC větev signální dráhy JA je obvykle spuštěna jako odpověď na zranění rostliny a uplatňuje se zejména v obraně proti hmyzu a herbivorům (Lorenzo *et al.*, 2004; Kazan *et* Manners, 2009). ERF větev signální dráhy JA je poté regulována transkripčními faktory ERF1 nebo ORA59 z rodiny AP2/ERF (z angl. APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR) (Lorenzo *et al.*, 2003; McGrath *et al.*, 2005; Dombrecht *et al.*, 2007; Pré *et al.*, 2008), které se podílejí na regulaci exprese genu *PDF1.2* (z angl. *PLANT DEFENSIN1.2*) (Pieterse *et al.*, 2012). Aktivace ERF větve je závislá jak na kyselině jasmonové, tak na ethylenu (Pieterse *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že transkripční faktory EIN3 (z angl. ETHYLENE INSENSITIVE3) a EIL1 (EIN3-LIKE1) interagují přímo s JAZ proteiny, přičemž rekrutují histon deacetylázu 6 (HDA6), která působí jako korepresor a inhibuje tedy aktivitu těchto transkripčních faktorů v buňkách patogeny nepostížených rostlin (Zhu *et al.*, 2011). Na druhou stranu v buňkách napadených rostlin (angl. JA-, ET-stimulated cells) dochází k degradaci JAZ proteinů, která je závislá na COI, čímž dochází k zvýšení transkripční aktivity EIN3/EIL1. Úloha ERF větve spočívá v ochraně

rostliny před nekrotrofními patogeny (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002, Lorenzo *et al.*, 2003). Signalizace kyseliny jasmonové je znázorněna na obrázku 4.



Obrázek 4: Signalizace kyseliny jasmonové (JA) před (nalevo) a po (napravo) rozpoznání nekrotrofního patogenu; v buňkách napadených rostlin (ERF větev) dochází k COI1 závislé degradaci JAZ proteinů, což vede ke zvýšení aktivity transkripčních faktorů EIN3/EIL1 a následně ke spuštění exprese příslušných genů (*ERF1*, *PDF1.2*), v případě MYC větve je přerušena interakce mezi JAZ proteinu a transkripčními faktory MYC, což vede k expresi JA-indukovaných genů (např. *VSP2*) (Pieterse *et al.*, 2012)

3.2.2.3 Signální dráha ethylenu

Ethylen (ET) je plynňý hormon, který kromě toho, že hraje významnou roli v rámci řady vývojových a fyziologických procesů rostlin, je důležitým modulátorem rostlinné imunity a je obecně produkován v situacích, kdy je rostlina napadena různými typy patogenů (především však při napadení nekrotrofními patogeny a hmyzem) (Pieterse *et al.*, 2012). Syntéza ethylenu vychází z L- methioninu, který je v reakci katalyzované enzymem SAM syntetázou konvertován na S-adenosyl-L-methionin (SAM) a ten je následně přeměněn na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) enzymem ACC syntázou, v posledním kroku dochází k přeměně ACC na ethylen enzymem ACC oxidázou (Booker *et DeLong*, 2015). V případě signalizace ethylenu byl pozorován tzv. ‘cross-talk’ se signálními dráhami JA i SA (Glazebrook, 2005; Sato *et al.*, 2010), přičemž ethylen může působit jako pozitivní i negativní regulátor (Pieterse *et al.*, 2012). Například u *A. thaliana*, ethylen zesiluje expresi SA-responzivního genu *PR-1* (Lawton *et al.*, 1994; de Vos *et al.*, 2006). Naopak ET-responzivní transkripční faktory EIN3 a EIL1 jsou zapojeny do represe exprese PAMP-responzivních genů včetně již zmíněného genu *ICS/SID2* nezbytného pro biosyntézu SA, tudíž v tomto případě ethylen způsobuje sníženou produkci SA (Chen *et al.*, 2009). Dále ethylen významně ovlivňuje konečný účinek JA (Pieterse *et al.*,

2012). Pokud je ethylen produkován v kombinaci s kyselinou jasmonovou jako v případě napadení rostliny nekrotrofními patogeny, ET působí synergicky na spuštění ERF větve signální dráhy JA, a naopak jako antagonistu MYC větve. To v konečném důsledku vede k upřednostnění signálních drah závislých na JA a ET, jež hrají důležitou roli v obraně rostlin právě specificky před nekrotrofními patogeny (Pré *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2003, 2004). Také bylo zjištěno, že ET moduluje roli proteinu NPR1 v ‘cross-talku’ signalizace JA a SA (Pieterse *et al.*, 2012).

3.2.3 Indukovaná rezistence

V obecném pojetím lze indukovanou rezistenci definovat jako stav zvýšené odolnosti rostlin vyvolané po předchozím působení určitého induktoru (Choudhary *et al.*, 2007; Conrath *et al.*, 2015; Reglinski *et al.*, 2023). Zvýšená odolnost může být pozorována buď pouze v pletivech, které byly v přímém kontaktu s induktorem (=lokální ochrana) nebo jsou rezistentní i části rostlin, jež do styku s daným induktorem vůbec nepřišly (=systémová ochrana) (Fontana *et al.*, 2021). V obou zmíněných případech se však jedná o indukovanou rezistenci (Fontana *et al.*, 2021). Podle typu signálních drah, jež se podílí na spuštění obranných mechanismů rostlin a hrají klíčovou roli při rozvoji rezistence, lze rozlišit dva základní typy indukované rezistence, a to systémově získanou rezistenci (angl. Systemic acquired resistance, SAR) a indukovanou systémovou rezistenci (angl. Induced systemic resistance, ISR) (Choudhary *et al.*, 2007; Conrath *et al.*, 2015; Fontana *et al.*, 2021). Oba uvedené typy vedou k posílení obranných strategií vůči několika patogenům v rámci celé rostliny (Conrath *et al.*, 2015). SAR je však zpravidla indukována nekrotrofními patogeny a vyžaduje přítomnost kyseliny salicylové, jež následně podmiňuje expresi velkého množství genů zapojených do obranných reakcí např. geny *PR* a *PAL* (van Loon *et al.*, 1998; Conrath *et al.*, 2006; Conrath *et al.*, 2015). Na druhou stranu ISR je indukována vlivem prospěšných mikroorganismů žijících v rhizosféře (van Loon *et al.*, 1998; Conrath *et al.*, 2006; Conrath *et al.*, 2015). V rámci rozvoje ISR hrají důležitou roli signální dráhy ethylenu a kyseliny jasmonové (Pieterse *et al.*, 1996, 2014; Conrath *et al.*, 2015). Reglinski *et al.*, 2023 však upozorňují na skutečnost, že v mnohých směrech se SAR a ISR překrývají, vzhledem k tomu (jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2.2), že byl pozorován ‘cross-talk’ v případě signálních drah SA a JA. Důležité je, že podstatou SAR, tak ISR je převedení rostlin do stavu zvaného priming neboli stavu zvýšené obranyschopnosti (Conrath *et al.*, 2006, 2015; Reglinski *et al.*, 2023). Priming tedy představuje fenomén, který umožňuje buňkám reagovat na stimuly o nízké intenzitě mnohem rychleji a intenzivněji než buňky, které stavem priming neprošly (Conrath, 2011). Výsledkem je zvýšená citlivost rostlin na následné (opakované) setkání s daným patogenem či jiným stresorem, což se projevuje tím, že obranné mechanismy se vyznačují mnohem větší intenzitou a jsou aktivovány mnohem rychleji než při prvotním kontaktu s určitým induktorem (Conrath *et al.*, 2015; Reglinski *et al.*, 2023). Díky tomu jsou tedy rostliny schopny se mnohem efektivněji bránit (Conrath *et al.*, 2015; Reglinski *et al.*, 2023).

3.2.3.1 Typy induktorů

Biologické induktory

K vyvolání indukované rezistence může dojít buď biologickými nebo chemickými induktory (Choudhary *et al.*, 2007; Reglinski *et al.*, 2023). Za biologické induktory lze považovat samotné patogeny (viry, bakterie, houby) vyvolávající u dané rostliny infekci nebo také jiné (nepatogenní) mikroorganismy jako jsou například tzv. rhizobakterie podporující růst rostlin (angl. plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) (Choudhary *et al.*, 2007; Meena *et al.*, 2020) a potenciálně i endofytické houby (Fontana *et al.*, 2021; Baron *et Rigobelo*, 2022). Přesněji řečeno se jedná o složky těl těchto organismů jako je flagellin, glukán, chitin, lipopolysacharidy, souhrnně označované, jak již bylo zmíněno, tzv. molekulární vzory asociované s mikroorganismy (MAMPs). MAMPs jsou následně rozpoznány specifickými rostlinnými receptory (Reglinski *et al.*, 2023) a výsledkem je aktivace tzv. MAMPs spuštěné imunity (MTI) (Baron *et Rigobelo*, 2022). Biologicky vyvolaná indukovaná rezistence byla potvrzena již v roce 1961 (Ross, 1961), poté co byly některé listy rostliny tabáku inokulovány virem mozaiky tabáku a následně bylo zjištěno, že k vzniku rezistence došlo i v neinokulovaných listech.

Vzájemně prospěšné vztahy mezi rostlinami a mikroorganismy mohou často přispívat k posílení obranných mechanismů dané rostliny a chránit ji před širokým spektrem patogenů (Pozo *et al.*, 2004; Conrath *et al.*, 2006). Jak již bylo zmíněno, na zvýšené odolnosti rostlin vůči různým patogenům se také mohou podílet endofytické houby jako například *S. indica*. Kořenové endofyty mohou zvyšovat odolnost svých hostitelů buď prostřednictvím přímého antagonismu (kompetice mezi patogenem a endofytem o živiny, případně prostor), potlačením růstu a šíření patogenu látkami produkovanými endofyty (= antibióza) a nebo nepřímo spuštěním ISR (Constantin *et al.*, 2019). ISR vyvolaná endofyty je zpravidla závislá na přítomnosti fytohormonů JA a ET, ale bylo zjištěno, že některé endofyty mohou vyvolat SAR, jež je závislá na přítomnosti SA (Pieterse *et al.*, 2014; Constantin *et al.*, 2019). *S. indica* je schopna indukovat systémovou rezistenci například u ječmene vůči padlí (Deshmukh *et al.*, 2006; Deshmukh *et Kogel*, 2007) či patogenu *Verticillium dahliae* u *A. thaliana* (Sun *et al.*, 2014). Dále bylo pozorováno, že prostřednictvím ISR *S. indica* zvyšuje odolnost rostlin rajčat (*Solanum lycopersicum*) vůči patogenu *Alternaria solani* (Panda *et al.*, 2019). Konkrétně způsobuje změnu exprese JA- a ET-responzivních genů a podílí se tedy na rychlé aktivaci signální dráhy kyseliny jasmonové a ethylenu včetně základních obranných mechanismů, kterých se tyto dráhy účastní (Panda *et al.*, 2019). Důležité je, že změny hladin transkriptů obranných genů (např. *WRK1*, *ERF*, *JAZ1*, *MPKs*) byly pozorovány pouze u rostlin, které byly v době inokulace daným patogenem již kolonizovány endofytem *S. indica* (tzv. 'pre-colonized plants') (Panda *et al.*, 2019). Samotná kolonizace rostlin rajčat endofytem *S. indica* totiž nevedla ke změně exprese většiny studovaných genů, nicméně se předpokládá, že způsobuje priming, a tedy rychlou a účinnou aktivaci obranných mechanismů rostlin rajčat při následném napadení patogenem *A. solani* (Panda *et al.*, 2019). Zdá se, že kolonizace daného hostitele endofytickou houbou *S. indica* způsobuje potenciaci signální transdukce vedoucí k systematické expresi

obraných genů vůči listovým patogenům (Panda *et al.*, 2019). Ukazuje se také, že *S. indica* aktivuje v daném rostlinném hostiteli různé typy obranných mechanismů a poskytuje tedy účinnou, dlouhotrvající ochranu před více patogeny zároveň (Li *et al.*, 2022). Harrach *et al.*, 2013 prokázali, že *S. indica* chrání kořeny ječmene před ztrátou antioxidační kapacity způsobené patogeny z rodu *Fusarium* a to tak, že zabraňuje poklesu poměru redukováného a oxidovaného askorbátu a obsahu glutathionu. Navíc vlivem kolonizace došlo k navýšení aktivity antioxidačních enzymů o 35 %, což tedy naznačuje, že *S. indica* je schopna stimulovat antioxidační enzymy rostlin a následkem toho odstranit reaktivní formy kyslíku v buňkách, což poté vede ke spuštění obranných reakcí a tudíž posílení rezistence rostlin vůči patogenům (Harrach *et al.*, 2013). Li *et al.*, 2022 zjišťovali u pšenice vliv *S. indica* na systémovou rezistenci a bazální rezistenci vůči patogenům *F. graminearum* a *R. cerealis* způsobující lemovanou stébelnou skvrnitost a fuzáriovou hnilobu kořene. Bylo zjištěno, že *in vivo* nikoli však *in vitro* může *S. indica* potlačit příznaky onemocnění vyvolané oběma patogeny (Li *et al.*, 2022). Co se týče exprese genů, tak ve srovnání s patogeny byly změny v hladině transkriptů vybraných genů způsobené kolonizací *S. indica* méně výrazné. Na základě výsledků Li *et al.*, 2022 se ukazuje, že *P. indica* se podílí na spuštění rostlinného imunitního systému aktivací MAPK dráhy, která hraje důležitou roli při zprostředkování imunitní odpovědi u řady rostlin, nicméně další výzkum je nutný pro zjištění přesného typu MAPK u pšenice, jenž je daným endofytem ovlivněna. Li *et al.*, 2022 tedy uvádí, že *S. indica* může indukovat rezistenci u pšenice vůči patogenům *R. cerealis* a *F. graminearum*, a to prostřednictvím spuštění exprese genů souvisejících s rezistencí jako jsou geny *MAPK*, *WRKY*, ovlivněním signálních drah fytohormonů a aktivací antioxidačních enzymů. Navíc kolonizace rostlin endofytem *S. indica* má vliv na hormonálně řízené metabolické dráhy, což může vést ke zlepšení výnosu, a naopak k zabránění poklesu intracelulárního obsahu vody a zhoršení membránové stability způsobené výše zmíněnými patogeny (Li *et al.*, 2022).

Chemické induktory

V době, kdy byla potvrzena biologicky vyvolaná indukovaná rezistence bylo současně zjištěno, že tento stav zvýšené obranyschopnosti rostlin lze navodit i ošetřením rostlin různými syntetickými či přírodními látkami (Ward *et al.*, 1991; Kessmann *et al.*, 1994; Reglinski *et al.*, 2023). Jako chemické induktory mohou působit například β -amino-máselná kyselina (BABA), již zmíněná kyselina salicylová, benzothiadiazol (BTH) či probenazol, přičemž některé z nich se za účelem navození stavu priming využívají v praxi nebo se jejich použití zvažuje (Conrath *et al.*, 2015). Takovou látkou je například BABA, která zajišťuje ochranu před původci závažných onemocnění u řady hospodářsky významných druhů rostlin jak na poli, tak ve skleníku (Cohen, 2002). Vzhledem k tomu, že BABA působí synergicky s některými fungicidy, je čím dál častěji diskutováno o jejím využití v ochraně rostlin, a to i přesto, že může v některých případech potlačovat růst rostlin (Cohen *et al.*, 2002; Conrath *et al.*, 2015). Co se týče kyseliny salicylové (SA), tak stejně jako její derivát (methylester = INA), byla první syntetickou látkou, u které bylo zjištěno, že může navodit priming u rostlin jak ve skleníku, tak na poli a účinně indukovat rezistenci vůči významným houbovým a bakteriálním patogenům hospodářských

plodin (Kessmann *et al.*, 1994). Nicméně obě tyto látky byly některými rostlinami špatně snášeny, a proto nebyly do praxe zavedeny (Ryals *et al.*, 1996). O něco později byl na trh představen benzothiadiazol, jehož účinek byl však pro řadu pěstitelů zklamáním, z toho důvodu jeho využití nezaznamenalo moc velký úspěch (Conrath *et al.*, 2015). V současnosti se však některé deriváty benzothiadiazolu jako induktory používají, příkladem může být např. Acibenzolar-S-Methyl (ASM) známý také pod komerčním názvem jako Bion[®], Actigard[®] (Reglinski *et al.*, 2023). Schopnost ASM indukovat rezistenci vůči padlí byla zkoumána například u ječmene, nicméně lepší ochrany (vyšší stupeň rezistence) bylo dosaženo v kombinaci s fungicidem (ethirimol) (Bousset *et Pons-Kühnemann*, 2003). Navíc odolnost rostlin ječmene vůči padlí získaná po ošetření ASM byla značně ovlivněna vlastnostmi půdy, konkrétně nízkým nebo vysokým podílem organické hmoty (Wiese *et al.*, 2003). Důležité je, že ASM svým účinkem napodobuje SA, to znamená, že aktivuje stejné obranné mechanismy jako SA, konkrétně spouští produkci PR proteinů a podílí se tedy na rozvoji systémově získané rezistence (Kessmann *et al.*, 1994; Lawton *et al.*, 1996). Dalším chemickým induktorem je probenazol (Oryzemat[®]), jenž se řadí mezi vůbec první chemické induktory rezistence využívaných na plodiny pěstované na orné půdě (Reglinski *et al.*, 2023). Tato látka je již od 70. let 20. století využívána především na ochranu rýže před patogenem *Pyricularia oryzae* způsobující závažnou houbovou chorobu (Watanabe *et al.*, 1977).

3.2.4 Biologická ochrana rostlin

Jedním z nástrojů využívaných pro ochranu rostlin před napadením patogeny, který je zároveň šetrný k životnímu prostředí, je biologická ochrana (De Waard *et al.*, 1993; Vinale *et al.*, 2008; De Silva *et al.*, 2019). Biologická ochrana rostlin proti patogenům může být definována jako využití prospěšných mikroorganismů, jejich genů a/nebo jejich produktů (např. různé metabolity) k redukci negativních účinků patogenů, případně k indukci obranných mechanismů dané rostliny (Vinale *et al.*, 2008; Tranier *et al.*, 2014; De Silva *et al.*, 2019). International Biocontrol Manufacturers Association (IBMA) definuje biologickou ochranu jako použití agens nebo produktů, které přirozeným způsobem ovlivňují patogeny zemědělských plodin prostřednictvím potlačení jejich šíření. Za agens lze v tomto případě považovat mikroorganismy, chemické mediátory a látky přírodního původu (Lecomte *et al.*, 2016). Mezi strategie biologické ochrany patří narušení některých stádií nemoci nebo životního cyklu patogenu včetně prevence infekce, snížení míry kolonizace pletiv hostitele patogenem a omezení sporulace (Punja *et Utkhede*, 2003).

Vzhledem k tomu, že endofytické houby mohou pomoci rostlinám odolávat jak biotickému, tak abiotickému stresu, mají velký potenciál se uplatnit v biologické ochraně rostlin (Li *et al.*, 2022). Jednou z hlavních výhod využití prospěšných mikroorganismů a dalších induktorů rezistence přírodního původu v rámci biologické ochrany hospodářských plodin je skutečnost, že jejich kombinace s pesticidy zajišťuje vyšší výnos než při použití pouze chemických induktorů (Conrath *et al.*, 2015). Účinky biologických a chemických induktorů se tedy vzájemně doplňují a jejich kombinace představuje vhodný způsob, jak snížit používání pesticidů v zemědělství (Conrath *et al.*, 2015). Ještě nějakou dobu však

potrvá, než bude možné například endofytické houby plně zařadit mezi biologické induktory využívané v zemědělství, protože ne všechny endofyty jsou stejně užitečné (Lu *et al.*, 2021). Z velké míry to závisí na druhu a genotypu rostlinného hostitele (Lu *et al.*, 2021).

3.3 Mechanismy podmiňující rozvoj vzájemně prospěšného vztahu mezi endofytem a rostlinou

Ustanovení vzájemně prospěšného vztahu nebo parazitického vztahu mezi rostlinou a mikroorganismem je ovlivněno řadou faktorů jako je například genotyp a fyziologický status hostitele, druh mikroba, ale také dostupnost živin či typ půdy (Kogel *et al.*, 2006; Fesel *et al.*, 2016; Šečić *et al.*, 2021). Udržení mutualistického vztahu následně vyžaduje genetické a epigenetické reprogramování a modulaci metabolomu prostřednictvím výměny efektorových molekul mezi prospěšným mikroorganismem a rostlinou (Šečić *et al.*, 2021).

Předpokládá se, že schopnost rostlin odlišně reagovat na patogeny a prospěšné mikroorganismy je výsledkem dlouhodobého vývoje, během kterého si rostliny vyvinuly specifické receptory, jež jim umožňují rozpoznat povahu daného mikroorganismu na základě drobných rozdílů v MAMPs a PAMPs (Plett *et al.*, 2018). Na druhou stranu vývoj mikroorganismů směřoval buď k tomu, aby jejich vliv na rostliny byl co nejméně destruktivní a mohly se tedy následně vyhnout imunitnímu systému rostlin nebo manipulovat s rostlinnými signálními dráhami ve svůj prospěch prostřednictvím produkce různých signálů (Plett *et al.*, 2018). Ukazuje se, že dochází ke značnému překryvu mezi signálními dráhami, jež se podílejí na rozvoji mutualistického vztahu a signálními dráhami, které zprostředkovávají reakci rostlinného hostitele na napadení patogenem (Lu *et al.*, 2021). To znamená, že některé rostliny mohou podobným způsobem reagovat jak na mutualistické mikroby, tak na biotrofní patogeny (zvýšená exprese genů *PR*, *ET*-responzivních genů, genů kódujících glutathion-S-transferázy), v mnoha případech však byly pozorovány značné rozdíly mezi reakcí rostliny na patogenní a prospěšné organismy (Plett *et al.*, 2018).

Stejně jako patogenní organismy mohou být i prospěšné mikroorganismy (např. endofyty, mykorrhizní houby) zdrojem již zmíněných MAMPs a i jejich rozpoznání rostlinnými receptory může vést ke spuštění MTI imunity (Lu *et al.*, 2021; Baron *et al.*, 2022). Nicméně molekuly, respektive MAMPs, jak již bylo naznačeno, se u prospěšných a patogenních organismů mírně liší a na základě toho může poté hostitelská rostlina odlišit nepatogenní, prospěšné organismy od patogenů, a tedy odlišným způsobem na ně reagovat (Zipfel *et al.*, 2017). Například v rámci rozpoznání mykorrhizních hub hrají důležitou roli komponenty buněčné stěny jako jsou tzv. lipo-chitooligosacharidy, také známé jako Myc faktory, jež jsou produkovány arbuskulárními mykorrhizními houbami (Gough *et al.*, 2011). Ty mohou být rozpoznány LysM receptory, které se účastní signálních drah důležitých pro navození mutualistického vztahu (Gough *et al.*, 2011). Je tedy žádoucí, aby rozpoznání prospěšného mikroorganismu danou hostitelskou rostlinou nevedlo ke spuštění exprese obranných genů v takové míře jako je tomu v případě rozpoznání patogenu. Z toho důvodu jsou některé (pro rostliny) prospěšné mikroorganismy vybaveny mechanismy, které je chrání před rozpoznáním hostitelskou

rostlinou nebo aktivně potlačují obranné mechanismy prostřednictvím efektorových molekul (Zipfel *et al.*, 2017).

Ukazuje se, že podobné mechanismy se vyvinuly i u endofytů (Lu *et al.*, 2021). V případě endofytů může být takovým mechanismem speciální modifikace MAMPs, například chitinu nebo dalších komponentů buněčné stěny, a to tak, aby nedošlo k jejich rozpoznání hostitelskými receptory a následně tedy ke spuštění exprese obranných genů (Zipfel *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2021). U *S. indica* byla konkrétně pozorována modifikace β -glukanu buněčné stěny prostřednictvím tzv. houbově specifického β -glukan-vazebného lektinu (angl. fungal-specific β -glucan-binding lectin), jenž je kódován genem *FGBI* (Wawra *et al.*, 2016). To následně mění stavbu i vlastnosti buněčné stěny této houby, a díky tomu je schopna potlačit imunitní odpověď řady rostlinných hostitelů (Wawra *et al.*, 2016). Podobnou strategii některých endofytických hub může být modifikace chitinu prostřednictvím enzymů chitin deacetyláz za vzniku oligomerů chitosanu, které následně nejsou hostitelskou rostlinou rozpoznány a nedochází ke spuštění obranných mechanismů (Cord-Landwehr *et al.*, 2016).

Dále mohou některé endofyty produkovat efektorové molekuly jako tzv. apoplastické proteinové efektorové molekuly (proteiny vylučované do extracelulárního prostoru) nebo extracelulární nukleotidy jako je eATP (Lu *et al.*, 2021). Tyto efektorové molekuly následně interferují s komponenty signalizačních kaskád, jež hrají důležitou roli v rostlinné imunitě a v konečném důsledku mohou přispívat k navození endosymbiotického vztahu (Lu *et al.*, 2021). Extracelulární ATP původem z endofytů může aktivovat některé MAP kinázy a spustit expresi genů zapojených do imunitní odpovědi, přičemž u *S. indica* dochází v počátečních stádiích kolonizace daného rostlinného hostitele k akumulaci této molekuly v apoplastu (Nizam *et al.*, 2019). U některých patogenů mohou být efektorovými molekulami kromě proteinů i malé RNA (sRNAs), které prostřednictvím RNA interference (RNAi) mohou potlačit imunitní systém hostitele (Weiberg *et al.*, 2013). Zdá se, že molekuly sRNA mohou hrát důležitou roli i při navození vzájemně prospěšného vztahu mezi endofytem a danou hostitelskou rostlinou, konkrétním příkladem může být interakce mezi *S. indica* a *B. distachyon* (Šečić *et al.*, 2021). Bylo zjištěno, že vznik mutualistického vztahu je doprovázen u obou zmíněných organismů nejen významnou změnou exprese některých genů (rozsáhlým transkripčním reprogramováním), ale také změnami v hladinách molekul sRNA (Šečić *et al.*, 2021). Šečić *et al.*, 2021 konkrétně detekovali u *B. distachyon* sRNA účastníci se RNAi, které by potenciálně mohly hrát důležitou roli v rámci spuštění obranné reakce rostlin a na druhou stranu se podílet na udržování vzájemně prospěšného vztahu. Podle Plett *et al.*, 2018 se některé microRNA (miRNA) v případě napadení rostliny patogenem podílí na spuštění exprese obranných genů, ovlivňují detoxifikační dráhy a v průběhu interakce rostliny s prospěšným organismem se podílí na vypnutí obranných mechanismů, které by v opačném případě potlačily šíření daného organismu v rostlině.

Mezi další strategie, díky kterým jsou endofyty schopny se vyhnout obranným reakcím rostlin, je i změna exprese fytohormon-responzivních genů, což je následováno dočasným potlačením imunitní reakce a díky tomu jsou endofyty schopny kolonizovat danou část rostliny (Brotman *et al.*, 2013).

Potlačení imunitní odpovědi v kořenech rostlin je běžným projevem prospěšných mikroorganismů, jež vyvolávají ISR (Pieterse *et al.*, 2014). Některé druhy endofytů, které podporují růst rostlin a navozují ISR si také vyvinuly odolnost vůči antimikrobiálním látkám produkované danou rostlinou, díky tomu pak může docházet k selektivní inhibici houbových patogenů bez negativního vlivu na endofyty (Lu *et al.*, 2021). Řada rostlin také produkuje látky, které následně působí jako chemoatraktanty pro prospěšné mikroorganismy a také je zásobují živinami a tímto způsobem jsou rostliny schopny ovlivňovat zastoupení prospěšných mikroorganismů například ve svých kořenech (Lu *et al.*, 2021).

3.4 Stanovení úrovně exprese genů zapojených do obranných reakcí rostlin pomocí RT-qPCR

Kvantitativní PCR v reálném čase spojená s reverzní transkripcí (RT-qPCR) je jednou z hojně využívaných metod pro analýzu genové exprese, a to především díky její vysoké přesnosti, specifitě, citlivosti a reprodukovatelnosti (Derveaux *et al.*, 2010; Štajner *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2019). Stanovení hladiny mRNA studovaných genů umožňuje osvětlit molekulární podstatu řady biologických procesů (Bustin *et al.*, 2005), včetně podstaty obranných mechanismů spuštěných v důsledku vystavení rostlin biotickému stresu (Štajner *et al.*, 2013). V rámci této práce byla metoda RT-qPCR konkrétně použita pro studium reakce rostliny na napadení houbovými patogeny a kolonizaci endofytickými houbami.

I přes jednoduchost provedení RT-qPCR je nutné si v průběhu pracovního postupu dávat pozor na řadu faktorů jako je variabilita v kvalitě a množství izolované RNA a následně nasyntetizované cDNA, případně variabilita v koncentraci a účinnosti amplifikace, které mohou negativně ovlivnit samotný průběh reakce a spolehlivost obdržovaných výsledků (Miao *et al.*, 2019). Aby bylo možné získat spolehlivá data, je nutné dodržovat několik klíčových kroků jako je správný návrh experimentu, izolace kvalitní RNA a zejména výběr vhodného referenčního genu (Derveaux *et al.*, 2010; Delporte *et al.*, 2015; Miao *et al.*, 2019). V rámci návrhu experimentu je nutné zvážit počet biologických vzorků potřebných pro získání statisticky významných dat (Derveaux *et al.*, 2010). Důležité je také posoudit kvalitu izolované RNA, která může výrazně ovlivnit stabilitu exprese referenčních genů (Bustin *et al.*, 2009). Stejně tak je důležité počítat s tím, že vlivem vnitřních faktorů a vnějšího prostředí, které na buňku působí se bude absolutní množství a relativní obsah RNA v jednotlivých vzorcích lišit (Kozera *et Rapacz*, 2013).

Referenční geny slouží jako vnitřní kontrola a umožňují porovnání hladin mRNA napříč různými vzorky, jsou tedy nezbytné pro normalizaci a interpretaci dat v rámci relativní kvantifikace a informují uživatele o jejich spolehlivosti (Bustin *et al.*, 2009). Základním požadavkem při výběru referenčního genu je stabilní exprese za různých experimentálních podmínek a stejně tak by se míra exprese neměla lišit mezi tkáněmi/pletivy a různými vývojovými stádii daného organismu (Kozera *et Rapacz*, 2013). Referenční gen by měl naopak demonstrovat variabilitu způsobenou nedokonalostí použité technologie a přípravných postupů, což následně umožňuje srovnat množství genetického materiálu mezi jednotlivými vzorky (Kozera *et Rapacz*, 2013). Z uvedených požadavků vyplývá, že funkci referenčních genů nejlépe splňují tzv. geny základního metabolismu, někdy nazývané jako 'provozní geny' (angl. house-keeping genes), které hrají nezbytnou roli v základních buněčných

procesech a jsou esenciální pro přežití každé buňky (Kozera *et Rapacz*, 2013). Nicméně je důležité podotknout, že ne všechny house-keeping geny se účastní pouze základních metabolických procesů a splňují tyto podmínky (Delporte *et al.*, 2015) a také jeden konkrétní referenční gen nemusí být vhodný pro všechny experimenty (Kozera *et Rapacz*, 2013). Při využití referenčních genů pro normalizaci mRNA dat je výsledkem informace o poměru hladiny mRNA studovaných genů a hladiny mRNA referenčních genů (Bustin *et al.*, 2009). Pro stanovení hladiny mRNA genů zapojených do obranných reakcí u *B. distachyon* byl použit jako referenční gen *BdSamDC* kódující S-adenosylmethionin dekarboxylázu (Hong *et al.*, 2008). Tento enzym hraje klíčovou roli v syntéze polyaminů, konkrétně katalyzuje dekarboxylaci S-adenosylmethioninu (SAM) (Slocum *et al.*, 1984).

3.4.1 Geny zapojené do obranných procesů u *B. distachyon*

Jedním z přístupů využívaných pro kvantitativní a kvalitativní posouzení reakce rostliny na infekci daným patogenem a případných mechanismů rezistence je získání expresních profilů tzv. hormon-responzivních genů v čase (angl. expression profiling of phytohormone-responsive marker gene), v tomto případě genů, jejichž exprese může být spuštěna fytohormony, které jsou zapojeny v obraně rostlin (SA, JA, ET) (Ward *et al.*, 1991; Lyons *et al.*, 2013; Kakei *et al.*, 2015; Kouzai *et al.*, 2016). Tento přístup poskytuje informace o síle a typu odpovědi, jež byla u dané rostliny spuštěna (Kouzai *et al.*, 2016). Geny indukované rostlinnými hormony, případně geny, jejichž produkty se účastní biosyntézy fytohormonů SA, JA, ET nebo signalizace lze tedy považovat za markery obranných reakcí rostlin na napadení patogeny (Kouzai *et al.*, 2016). Cílem studie Kouzai *et al.*, 2016 bylo vybrat kandidátní geny, které by potenciálně mohly sloužit jako markery SA, JA, ET u *B. distachyon* na základě podobnosti proteinové sekvence s proteinovou sekvencí markerů u *A. thaliana* a rýže (*Oryza sativa*). Bylo zjištěno, že exprese těchto fytohormon-responzivních genů je u rýže a *B. distachyon* konzervována, to znamená, že rostlinné hormony regulují expresi stejných genů jak u rýže, případně *A. thaliana*, tak u *B. distachyon* (Kakei *et al.*, 2015). Nicméně v aspektech obranných reakcí se *B. distachyon* více podobá rýži (Kouzai *et al.*, 2016).

Za účelem zjištění potenciálních mechanismů, jež hrají důležitou roli při reakci rostlin na patogenní a endofytické houby, byla v rámci této práce u *B. distachyon* testována míra exprese genů (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*). Gen *BdWRKY41* se řadí mezi geny indukované kyselinou salicylovou (SA markery), gen *BdLOX3* mezi geny indukované kyselinou jasmonovou (JA markery) a gen *BdEIN3* mezi geny indukované ethylenem (ET markery) (Kouzai *et al.*, 2016). V případě rýže bylo navíc zjištěno, že některé geny jako je *OsPRI* a *OsWRKY45* (Mitsuhara *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2012) mohou být indukovány jak SA, tak JA a předpokládá se, že takové geny dohromady představují obranný systém, který je tedy aktivován oběma zmíněnými fytohormony, pokud je rostlina vystavena biotickému a abiotickému stresu (Tamaoki *et al.*, 2013). U *A. thaliana* kyselina salicylová a jasmonová působí antagonisticky, to znamená, že ošetření rostlin SA může vést k potlačení exprese genů indukovaných JA jako je gen *LOX3* (Leon-Reyes *et al.*, 2010).

3.4.1.1 Gen *BdPR-1*

Gen *BdPR-1* kóduje malý protein (pathogenesis-related protein 1, PR-1), který patří v rámci skupiny antifungálních PR proteinů k nejrozšířenějším a lze ho považovat za jeden z nejznámějších markerů imunitní odpovědi (marker SA) rostlin vůbec (Gamir *et al.*, 2017). Byl objeven u infikovaných rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) jako nejhojněji zastoupený protein v rámci extracelulárních proteinů produkovaných rostlinou v reakci na napadení patogenem (Gianinazzi *et al.*, 1970; van Loon *et al.*, 1970; Kammen, 1970; Gamir *et al.*, 2017). Na významnou roli PR-1 v rámci systémově získané rezistence se přišlo poté, co bylo zjištěno, že k jeho akumulaci nedochází pouze lokálně, ale i v rámci celé rostliny (van Loon *et al.*, 2006). PR-1 proteiny se specificky řadí do tzv. rodiny CAP proteinů (angl. cystein-rich secretory protein (CRISP), antigen 5, and pathogenesis-related 1) (Gamir *et al.*, 2017). Jak již bylo zmíněno, podle novějších poznatků spočívá antimikrobiální účinek PR-1 proteinů v odnětí sterolů, jež jsou využívány některými patogeny (Gamir *et al.*, 2017). Bylo demonstrováno, že tento specifický účinek PR-1 má své uplatnění např. v obraně rostlin před patogeny z rodu *Phytophthora*, jež jsou na nedostatek sterolů obzvláště citlivé (Gamir *et al.*, 2017).

3.4.1.2 Gen *BdPOX2*

Jednou z reakcí rostlin na napadení patogeny je produkce různých primárních a sekundárních metabolitů jako jsou již zmíněné fytohormony, fytoalexiny, ale také peroxid vodíku (Sandoya *et al.*, 2014). Peroxid vodíku slouží jako donor elektronu pro enzymy peroxidázy (POX), jež katalyzují oxidaci řady substrátů (Almagro *et al.*, 2009). U *B. distachyon* je jedním z genů kódujících peroxidázy ze třídy III rostlinných peroxidáz (Almagro *et al.*, 2019) gen *POX2*, jehož exprese je indukována právě vlivem poškození rostliny patogeny či hmyzem (Passardi *et al.*, 2004; Almagro *et al.*, 2009; Sandoya *et al.*, 2014). Rostlinné peroxidázy třídy III jsou glykoproteiny vyskytující se ve vakuolách a buněčných stěnách a u krytosemenných rostlin tvoří většinou velké multigenové rodiny (Passardi *et al.*, 2004). Obecně jsou peroxidázy řazeny mezi jednu z mnohých rodin proteinů PR (van Loon *et al.*, 2006; Almagro *et al.*, 2009). Tyto enzymy se účastní řady fyziologických procesů rostlin jako je tvorba ligninu a suberinu, zesíťování komponentů buněčné stěny, syntéza fytoalexinů či průběh tvorby ROS a RNS (Passardi *et al.*, 2004). Významnou roli však hrají i v rámci obranné reakce rostlin na nekrotrofní a biotrofní patogeny a po napadení rostliny jsou těmito patogeny, jak již bylo zmíněno, indukovány (van Loon *et al.*, 2006). Jedním z mechanismů, kterým peroxidázy společně s ethylenem přispívají k obraně rostlin je zesílení buněčné stěny, kdy ethylen nejprve vyvolává produkci H₂O₂ a spolu s účinkem peroxidázy dochází k zvýšené dimerizaci ferulátu, což vede k zesílení buněčné stěny, jakožto ochranné bariéry proti vstupu patogenních organismů (Sandoya *et al.*, 2014).

3.4.1.3 Gen *BdLOX3*

Gen *BdLOX3* kóduje enzym lipooxidázu (LOX), jež společně s allen oxid syntázou (AOS) hraje důležitou roli v syntéze kyseliny jasmonové (Mueller, 1997). Jedná se o gen, který je pozitivně regulován kyselinou jasmonovou, a proto je využíván jako marker JA u řady rostlinných druhů (Kouzai *et al.*,

2016). Zvýšená exprese genu *BdLOX3* tedy zpravidla poukazuje na napadení rostliny nekrotrofními patogeny (Sandoya *et* Buanafina, 2014; Ors *et al.*, 2018).

3.4.1.4 Gen *BdCHIT* / geny pro chitinázy

Expres genů kódujících enzymy chitinázy či β -glukanázy není na rozdíl od výše zmíněných genů spuštěna fytohormony, ale přítomností chitinu, který je typickým představitelem MAMPs/PAMPs struktur u rostlin a jeho významným zdrojem je buněčná stěna hub (Kouzai *et al.*, 2014, 2016; Bakhat *et al.*, 2023). Zvýšená exprese genů kódujících chitinázy může být tudíž pozorována při napadení rostliny houbovými patogeny. Chitinázy se řadí mezi hydrolázy a podle mechanismu působení lze (u rostlin) rozlišovat dva typy chitináz, a to endochitinázy a exochitinázy, jejichž hlavní funkcí je tedy ochrana rostlin před patogenními houbami (Hamid *et al.*, 2013; Bakhat *et al.*, 2023). Prvním typem jsou tzv. endochitinázy, jež náhodně štěpí chitin uvnitř řetězce (angl. at internal sites) za vzniku dimerů diacetylchitobiózy a rozpustných nízkomolekulárních multimerů N-acetyl-glukosaminu jako je chitotrióza a chitetraóza (Sahai *et* Manocha, 1993; Hadim *et al.*, 2013). Druhým typem jsou exochitinázy, které buď postupně uvolňují diacetylchitobiózy z neredukujících konců chitinového řetězce (tzv. chitobiosidázy) nebo štěpí oligomerní produkty endochitináz a chitobiosidáz (1-4- β -glukosaminidázy) na monomery N-acetylglukosaminu (Sahai *et* Manocha, 1993; Hadim *et al.*, 2013).

3.4.1.5 Gen *BdWRKY41* / geny pro WRKY transkripční faktory (TF)

Mezi další geny, jejichž míra exprese může být ovlivněna napadením rostliny (*B. distachyon*) houbovým patogenem, patří geny kódující transkripční faktory WRKY (Powell *et al.*, 2017). Identifikace transkripčních faktorů, jež jsou indukovány během infekce poskytuje nástroje k funkční charakterizaci postupů vedoucích k pochopení toho, jak rozpoznání patogenu hostitelem spouští lokální a systémovou signalizaci (Powell *et al.*, 2017). Společným znakem všech WRKY TF je jejich DNA vazebná doména neboli WRKY doména o délce asi 60 aminokyselin, ze které byl odvozen název těchto transkripčních faktorů (Rushton *et al.*, 2010). WRKY doména je tvořena krátkou aminokyselinovou sekvencí „WRKYGQK“ na N-terminálním konci, která je u většiny WRKY proteinů značně konzervativní (Rushton *et al.*, 1996; Eulgem *et al.*, 2000) a motivem zinkového prstu atypického charakteru na C-konci (Rushton *et al.*, 2010). Prostřednictvím WRKY domény se tyto TF vážou na specifickou DNA sekvenci (T)TGAC(C/T) označovanou jako W-box, jež je obsažena v promotoru řady obranných genů včetně genů kódujících PR proteiny (Ülker *et* Somssich, 2004). WRKY transkripční faktory jsou mimo jiné klíčovými regulátory obranných mechanismů rostlin (bazální imunity PTI/MTI a ETI), například těch závislých na SA (Pieterse *et al.*, 2012) a mnohé z těchto TF jsou samy působením SA upregulovány (Rushton *et al.*, 2010). Některé z WRKY TF se účastní cross-talku signální dráhy SA a JA nebo mohou aktivovat či blokovat odpověď na SA (Pieterse *et al.*, 2012). Vzhledem k tomu, že WRKY TF představují jednu z největších rodin transkripčních regulátorů u vyšších rostlin a některé ze zástupců se podílejí na regulaci významných agronomických znaků, studium WRKY TF u *B. distachyon* a pšenice by mohlo přispět k objevu nových strategií pro vylepšení některých těchto znaků (Tripathi

et al., 2012). Transkripční faktor WRKY41 u *A. thaliana* působí jako negativní regulátor genů zapojených v mrazové toleranci (TAIR, arabidopsis.org). Higashi *et al.*, 2008 dále zjistili, že k indukci exprese genu *WRKY41* u *A. thaliana* dochází vlivem přítomnosti flagellinu z *Pseudomonas syringae* a navíc rostliny s nadměrnou expresí *WRKY41* vykazovaly konstitutivní expresi genu *PR5*.

3.4.1.6 Gen *BdEIN3*

Gen *EIN3* (*ETHYLENE-INSENSITIVE 3*) kóduje malý jaderný protein, který funguje jako transkripční faktor (TF) (Chao *et al.*, 1997; Dolgikh *et al.*, 2019). TF EIN3 společně s TF EIN3-like 1 (EIL1) a TF EIN3-like 2 (EIL2) se řadí mezi klíčové transkripční regulátory signalizace ethylenu (Dolgikh *et al.*, 2019) a podílí se na regulaci exprese ET-responzivních genů (Chao *et al.*, 1997; Solano *et al.*, 1998). TF EIN3 a EIL1 spolu vytváří transkripční komplex, který je stabilizován v přítomnosti ethylenu, což je klíčovým krokem vedoucím ke spuštění exprese ET-responzivních genů (Dolgikh *et al.*, 2019). Stabilizovaný komplex EIN3/EIL1 je akumulován v jádře (Dolgikh *et al.*, 2019). Mezi cílovými geny TF EIN3 patří například gen *ERF1* (Solano *et al.*, 1998), jehož nadměrná exprese podmiňuje u *A. thaliana* rezistenci vůči řadě nekrotrofním patogenům jako je *B. cinerea*, *F. oxysporum* či hemibiotrofní bakterii *P. syringae* (Huang *et al.*, 2016). Dále pak TF EIN3 reguluje u některých druhů rostlin procesy vývoje kořenových vlásků či odpověď na abiotický stres (chlad, solný stres) (Zhang *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2017). TF EIN3 se také účastní regulační kaskády modulující expresi *PR* genů (Boutrot *et al.*, 2010). Proteiny EIN3 a EIL1 přetrvávají v organismu pouze krátkodobě a v nepřítomnosti ethylenu podstupuje EIN3 ubikvitinaci a degradaci v proteazomu prostřednictvím příslušných ubikvitin-ligáz (Gagne *et al.*, 2004; An *et al.*, 2010; Dolgikh *et al.*, 2019)

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

- Osivo *Brachypodium distachyon*: semena linie Bd21 z Joint Genome Institute (<https://jgi.doe.gov/>)
- Izoláty endofytických a patogenních hub: *M. bolleyi*, *C. cereale* původem z pšenice (*T. aestivum*), *F. culmorum* původem z *B. distachyon* a *S. indica* ze sbírky the CBS Collection of yeasts and filamentous fungi, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (WI-KNAW), the Netherlands
- Perlit
- Obilky rýže
- Profí výsevni substrát FLORCOM SV (BB Com, 885)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, kat. č. P551)
- Primery (EastPort)
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio, kat. č. P440)
- Nukleáz-prostá voda pro PCR (Quiagen, kat. č. 129114)
- RNase AWAY™ Surface Decontaminant (Thermo Scientific, kat. č. 7000TS1)
- 2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, kat. č. M6250)
- Deionizovaná voda

Použité roztoky

- 1% NaOCl (SAVO)
- 70% ethanol

Použité soupravy

- RNeasy Plant Mini Kit (50) (QIAGEN, kat. č. 74904)
- Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis Kit (Roche Diagnostics, kat. č. 05 081 955 001)

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Homogenizátor FastPrep®-24 (MP Biomedicals)
- Cycler Real-Time PCR CFX Connect (BIO-RAD)
- Termocycler Vapo.Protect Mastercycler® Pro (Eppendorf)
- Spektrofotometr Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Mikrocentrifuga MiniStar Silverline (VWR)
- Vortex 1 Shaker (IKA™)
- Stolní chlazená centrifuga Micro Star 17 R (VWR)
- ThermoCell heating block 202 (BIOER)
- Laboratorní autokláv VX-55 (Systec)

- Digestoř (Merci®)
- Fytotron (PSI)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Příprava inokula

Jako zdroj pro přípravu inokula byly použity izoláty dvou endofytických (*S. indica* a *M. bolleyi*) a dvou patogenních (*C. cereale* a *F. culmorum*) druhů hub. Houby *M. bolleyi* a *C. cereale* byly původně izolovány z kořenů pšenice (*T. aestivum*), *F. culmorum* z listů *B. distachyon* a *S. indica* byla získána ze sbírky CBS Collection of yeasts and filamentous fungi, the Netherlands. Nejprve byly připraveny kultury jednotlivých druhů hub na agarovém živném médiu (bramborový agar s glukózou) a následně byla část kultury společně s živným médiem přenesena na obilky rýže (*Oryza*). Před kultivací bylo vždy 200 g obilek rýže vloženo do plastového sáčku s 50 ml destilované vody a poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 120 °C po dobu 20 min. Po 24 hodinách byla sterilizace zopakována. Na takto připravených obilkách rýže probíhala kultivace po dobu 3 týdnů ve tmě při 20 °C.

4.4.2 Setí

V říjnu 2022 byl poprvé založen experiment. Obilky *B. distachyon* (z rostlin ze srpna 2022) se povrchově dezinfikovaly v roztoku NaOCl (SAVO) (3 díly vody a 1 díl NaOCl) po dobu 5 min a poté byly třikrát promyty sterilní deionizovanou vodou. Povrchově dezinfikované obilky se nechaly vyklíčit na povrchu poskládaného filtračního papíru navlhčeného deionizovanou vodou. Z filtračního papíru byly vždy vytvořeny pruhy vyztužené pomocí plátů alobalu a ty se pak poskládaly postupným přehýbáním ve 'stylu harmoniky', tak aby vznikly žlábků. Filtrační papír byl navlhčen a do každého žlábků byly rovnoměrně rozmístěny obilky. Vzniklá konstrukce z filtračního papíru byla vložena do plastových misek naplněných deionizovanou vodou, tak aby byla postupně nasávána filtračním papírem. Tento způsob naklíčení a následné pěstování rostlin však nebyl úspěšný, jelikož nastolené podmínky byly pro rostliny zcela nevyhovující a bylo tedy nutné zvolit jiný způsob pro pěstování rostlin. Z toho důvodu byl v lednu 2023 založen pokus znovu. V tomto případě se postupovalo tak, že se na dno 25 květináčů vložil vysterilizovaný substrát, poté vrstva perlitu a na povrch perlitu povrchově dezinfikované obilky (do každého květináče 10 obilek). Na závěr byly obilky opět zasypany perlitem. Rostliny byly pěstovány ve fytotronu (12 h den / 12 hod noc, 20/20 °C, relativní vlhkost 41 %) po dobu 5 týdnů a před následnou inokulací byl počet rostlin v každém květináči zredukován na čtyři. Způsob vrstvení substrátu je znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5: Rostliny *Brachypodium distachyon* těsně před inokulací (stáří 5 týdnů, vlevo), způsob vrstvení substrátu a perlitu (vpravo)

4.4.3 Inokulace rostlin *B. distachyon* endofytickými a patogenními houbami

Inokulace byla provedena tak, že se z každého květináče opatrně odstranila (odsála pomocí vysavače) část horní vrstvy perlitu, tak aby došlo k obnažení, ale ne poškození kořenů. Následně se ke kořenům na místo perlitu vložilo inokulum (kolonizované obilky rýže, do každého květináče 10 čajových lžiček rýže, tj. cca 25 g). Celkově se připravilo 5 variant (5 květináčů každé varianty): rostliny inokulované *S. indica* (BdSi), *M. bolleyi* (BdMb), *F. culmorum* (BdFc), *C. cereale* (BdCc) a rostliny, ke kterým se přidala pouze autoklávovaná (neinokulovaná) rýže, sloužily jako kontrola (BdK). Celý proces inokulace je znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6: Postup inokulace

Legenda: 1: odsátí horní vrstvy perlitu pomocí vyrobeného násadce (plastová trubice) napojeného na hadici vysavače, 2: obnažené kořeny připravené pro inokulaci, 3: inokulum (kolonizované obilky rýže), 4: inokulované rostliny *Brachypodium distachyon*

4.4.4 Odběr vzorků

Odběr vzorků byl prováděn 3 následující dny po inokulaci (1–3 dpi). Vždy byly odebrány 3 listy u 3 rostlin každé varianty (vždy 1 rostlina z jednoho květináče). Tímto způsobem se získaly vzorky ve 3 biologických opakováních a celkově se tedy získalo 15 vzorků z každého dne (3 vzorky každé varianty). Nicméně z finančních důvodů se následně analyzovaly pouze vzorky 2 biologických opakování (tabulka 3). Ustřížené listy se ihned vložily do mikrozkušavky umístěné do nádoby s tekutým dusíkem. Zkušavky s odebranými vzorky byly vloženy do mrazáku na -80°C a později byly použity pro izolaci RNA.

4.4.5 Izolace RNA

Izolace celkové RNA z listů *B. distachyon* zmrazených tekutým dusíkem byla provedena pomocí kitu RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (50) podle modifikovaných pokynů protokolu Quick-Start Protocol, který je určen pro izolaci celkové RNA z různých druhů rostlin a také některých druhů hub. Před samotným zahájením izolace bylo nutné ošetřit pracovní plochu a veškeré pomůcky přípravkem RNase AwayTM Surface Decontaminant, aby byla minimalizována kontaminace vzorků RNázami. Vzorky byly až do doby homogenizace umístěné v nádobě s tekutým dusíkem.

Jako první bylo nutné k lyzační pufru RLT přidat 2-Merkaptoethanol (10 μl 2-Merkaptoethanolu na 1 ml RLT pufru). Do každé zkušavky se vzorkem (10–100 mg rostlinného materiálu) byla následně přidána sterilní homogenizační kulička a následně 450 μl připraveného lyzačního pufru RLT. Následovala homogenizace v homogenizátoru FastPrep[®]-24 po dobu 30 s. Zkušavky s homogenátem se nechaly inkubovat 2 min při 56°C na ThermoCell heating bloku. Po inkubaci se lyzát přemístil do QIAshredder spin kolon umístěných do 2ml sběrných zkušavek. Následovala centrifugace po dobu 2 min při maximálních otáčkách (13 300 rpm). Získaný supernatant se přepipetoval do 1,5ml mikrozkušavek, tak aby nedošlo k porušení peletu. Do každé zkušavky byl přidán 96% ethanol, jehož množství odpovídalo polovině celkového množství supernatantu. Takto vzniklý roztok byl ihned důkladně promíchán opětovným nasátím a vypouštěním pomocí pipety a poté přepipetován do RNeasy Mini spin kolon umístěných do 2ml sběrných zkušavek. Roztok v koloně byl centrifugován po dobu 1 min při 13 000 rpm. Kolony byly přemístěny na nové 2ml sběrné zkušavky a na střed membrány bylo přidáno 350 μl RW1 pufru a opět následovala centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Mezitím byl připraven roztok Dnázy a to tak, že se k 20 μl Dnázy přidalo 140 μl RDD pufru, vzniklý roztok se promíchal. Po centrifugaci se napipetovalo 80 μl připraveného roztoku Dnázy přímo na membránu kolony. Následovala inkubace po dobu 15 min při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo do každé kolony přidáno opět 350 μl RW1 pufru. Poté byla provedena centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Po centrifugaci se kolony přemístily na nové 1,5ml mikrozkušavky a do každé bylo přidáno 500 μl RPE pufru, vše se nechalo zcentrifugovat 1 min při 13 000 rpm. Pro odstranění zbytkového ethanolu následovala ještě jedna centrifugace ('na sucho') po dobu 1 min při maximálních otáčkách. Po centrifugaci byly kolony přemístěny na nové 1,5ml mikrozkušavky a na membránu bylo napipetováno 60 μl RNáz-prosté vody. Následovala inkubace 2 min při pokojové teplotě. Poté byla provedena poslední centrifugace po dobu

1 min při 10 000 rpm, při které došlo k uvolnění RNA. Zkumavky s vyizolovanou RNA byly ihned umístěny na led. Koncentrace RNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop. Izolovaná RNA byla následně uchovávána při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.6 Reverzní transkripce

Přepis RNA do cDNA byl proveden pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Zkumavky s vyizolovanou RNA byly po vyjmutí z mrazáku umístěny na led. Podle počtu vzorků byl připraven premix I sestávající se z reagensů označených číslem 5 (Anchored oligo(dT)₁₈ primers) a 8 (voda, PCR-grade) a následně byl rozpipetován do 0,2ml PCR mikrozkušavek po 3,4 μl (tabulka 1). Do každé mikrozkušavky bylo poté přidáno 30 μl vyizolované RNA. Po krátkém zvortexování a centrifugaci následovala inkubace po dobu 10 min při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termocykléru, což umožnilo denaturaci sekundárních struktur RNA a nasednutí primerů. Po inkubaci se do každé mikrozkušavky přidalo 8,6 μl premixu II sestávajícího se z reagensů označených číslem 2 (Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer 5x), 4 (Deoxynucleotide mix), 7 (DTT), 3 (Protector RNase Inhibitor), 1 (Transcriptor High Fidelity reverse transcriptase) (reagencie č. 3 a 1 se přidaly až na závěr, po promíchání reagensů č. 2, 4, 7 se již nevortexovalo, aby se nepoškodila reverzní transkriptáza) (tabulka 2). Následovala inkubace po dobu 30 minut při $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, v tomto kroku proběhla reverzní transkripce. Vzorky cDNA byly uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 1: Složení Premixu I pro reverzní transkripci

Reagencie	Koncentrace	Objem pro 1 test [μl]
Anchored-oligo (dT) ₁₈ primer (5)	$50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1,0
voda, PCR-grade (8)	–	2,4
RNA	–	30
Celkem		33,4

Tabulka 2: Složení Premixu II pro reverzní transkripci

Reagencie	Koncentrace	Objem pro 1 test [μl]
Transcriptor High Fidelity Reaction Buffer (2)	5x	4,0
Deoxynucleotide Mix (4)	$10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	2,0
DTT (7)	$0,1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1,0
Protector RNase inhibitor (3)	$40\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$	0,5
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (1)	$20\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	1,1
Celkem		8,6

4.4.7 Měření exprese genů pomocí metody RT-qPCR

Pomocí metody RT-qPCR byla měřena exprese vybraných genů, které jsou zapojeny do obranných mechanismů rostlin, v tomto případě *B. distachyon* (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*). V každé reakci byly použity vzorky cDNA získané přepisem z RNA izolované z listů *B. distachyon* každé varianty (BdK, BdSi, BdMb, BdFc, BdCc), vždy ze všech tří odběrů, tzn. 1, 2, 3 dpi (tabulka 3).

Tabulka 3: Seznam použitých vzorků cDNA získaných reverzní transkripcí RNA izolované z listů *Brachypodium distachyon*

Číslo vzorku	Varianta	Dpi	Opakování
1	BdK	1	1
2	BdSi	1	1
3	BdMb	1	1
4	BdCc	1	1
5	BdFc	1	1
6	BdK	2	1
7	BdSi	2	1
8	BdMb	2	1
9	BdCc	2	1
10	BdFc	2	1
11	BdK	3	1
12	BdSi	3	1
13	BdMb	3	1
14	BdCc	3	1
15	BdFc	3	1
16	NTC	-	-
17	BdK	1	2
18	BdSi	1	2
19	BdMb	1	2
20	BdCc	1	2
21	BdFc	1	2
22	BdK	2	2
23	BdSi	2	2
24	BdMb	2	2
25	BdCc	2	2
26	BdFc	2	2
27	BdK	3	2
28	BdSi	3	2
29	BdMb	3	2
30	BdCc	3	2
31	BdFc	3	2
32	NTC	-	-

Legenda: Dpi: den po inokulaci; NTC (no template control): negativní kontrola

Před samotnou přípravou reakční směsi byly primery naředěny na pracovní koncentraci $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a vzorky cDNA na koncentraci $1,25 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Reakční směs byla připravena smícháním jednotlivých reagensů dle tabulky 4. Podle počtu vzorků bylo nejprve smícháno příslušné množství SYBR Green Master Mixu (2x) a nukleáz-prosté vody, po zvortexování a centrifugaci byl vzniklý roztok rozdělen do dvou mikrozkušavek. Do jedné se následně napipetoval pár primerů pro amplifikaci testovaného genu (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*) a do druhé pár primerů pro amplifikaci referenčního genu (*BdSamDC*). Veškeré použité páry primerů jsou uvedeny v tabulce 5. Každá z reakčních směsí byla vortexována, centrifugována a následně rozpipetována po 13 μl do 0,2ml PCR mikrozkušavek ve stripu po 8 kusech, umístěných do vychlazeného stojánu. Do každé mikrozkušavky bylo následně přidáno 4 μl (5 ng) naředěného vzorku cDNA, přičemž každý vzorek byl do reakce pipetován ve 3 technických opakování (triplikátech). Mikrozkušavky ve stripu byly krátce centrifugovány a vloženy do cykléru, kde proběhla reakce následovaná analýzou křivek tání s teplotním profilem dle tabulky 6. Součástí každé qPCR reakce byla i negativní kontrola (NTC), která obsahovala místo cDNA vodu. Získané C_t hodnoty byly použity pro výpočet hodnoty FD (fold difference, relativní rozdíl v expresi) s cílem zjistit míru exprese studovaných genů.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro qPCR

Chemikálie	Koncentrace	Objem pro 1 test [μl]
Nukleáz-prostá voda pro PCR	–	3,1
SYBR Green Master Mix	2x	7,5
Primer F	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2
Primer R	$10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2
Templátová cDNA	$1,25 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	4
Celkem		15

Tabulka 5: Seznam primerů použitých pro amplifikaci testovaných genů

Primer	Sekvence (5'– 3')	Literatura
<i>BdSamDC</i>	F: TGCTAATCTGCTCCAATGGC R: GACGCAGCTGACCACCTAGA	Hong <i>et al.</i> , 2008
<i>BdPR-1</i>	F: TACTACACGCACGCCAACAA R: GTCGTAGAGGCAGAGCGTG	Kouzai <i>et al.</i> , 2016
<i>BdCHIT</i> (<i>BdChitinase1</i>)	F: CAGTGGGGCTACTGCTTCAA R: GCTGGTAGTTGGACTGCCCT	Hong <i>et al.</i> , 2008
<i>BdPOX2</i>	F: TTCAGCAGCGCCTTTGCTT R: CGAGTTAACCTTGGAGCAGACG	Sandoya <i>et Buanafina</i> , 2014
<i>BdLOX3</i>	F: TCAACTTGCCCTTTCCACATG R: GCAAACCGGATTAACCTCCTGC	Sandoya <i>et Buanafina</i> , 2014
<i>BdWRKY41</i>	F: TCTTCGTCCTCGCTACCATTG R: TGACTTCATCTCCATTTCCATCTC	Subramanyam <i>et al.</i> , 2019
<i>BdEIN3</i>	F: ATGCTGAATGACAAGTTCCT R: ATGCTGAATGACAAGTTCCT	Kouzai <i>et al.</i> , 2016

Tabulka 6: Teplotní program qPCR reakce

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	1
Denaturace	95	10 s	
Nasedání primerů (annealing)	60	30 s	39
Syntéza DNA (elongace)	72	20 s	
Analýza křivek tání	95	10 s	
	65	0,05 s	–
	95	0,5 s	

5 VÝSLEDKY

5.1 Vizuální vyhodnocení intenzity poškození rostlin *Brachypodium distachyon*

Dva týdny po inokulaci a necelé dva týdny po odběru vzorků pro izolaci RNA byly vizuálně zhodnoceny příznaky infekce u rostlin *B. distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) (obr. 7). Způsob hodnocení příznaků spočíval v určení počtu zhnědnutých listů, případně bází u testovaných rostlin, v rámci tohoto experimentu vždy u 20 rostlin každé varianty (4 rostliny v 5 květináčích (1 květináč = 1 opakování) každé varianty). Intenzita poškození se hodnotila na základě určení počtu zhnědnutých listů na hlavní odnoži v dané kategorii procenta poškození/napadení (listy poškozené do 5 %, 25 %, 50 %, 75 % a 100 %, případně procento zhnědlých bází). Každá ze zmíněných kategorií má přiřazenu odlišnou hodnotu stupně poškození: 5 % (hodnota 1), 25 % (hodnota 2), 50 % (hodnota 3), 75 % (hodnota 4), 100 % (hodnota 5). U každé hodnocené rostliny se tedy postupovalo tak, že se určil celkový počet listů na hlavní odnoži a z toho počet zhnědnutých listů dané kategorie a počet zdravých listů. Ke zpracování zjištěných dat byl použit program MS Excel. Na základě získaných hodnot se vypočítalo celkové procento poškození (P) u dané rostliny pomocí vzorce dle Townsenda a Heubergera (Kúdela *et al.*, 1989):

$$P = \frac{\sum (n \times v) \times 100}{x \times N}$$

n = počet listů v jednotlivých stupních poškození (napadení)

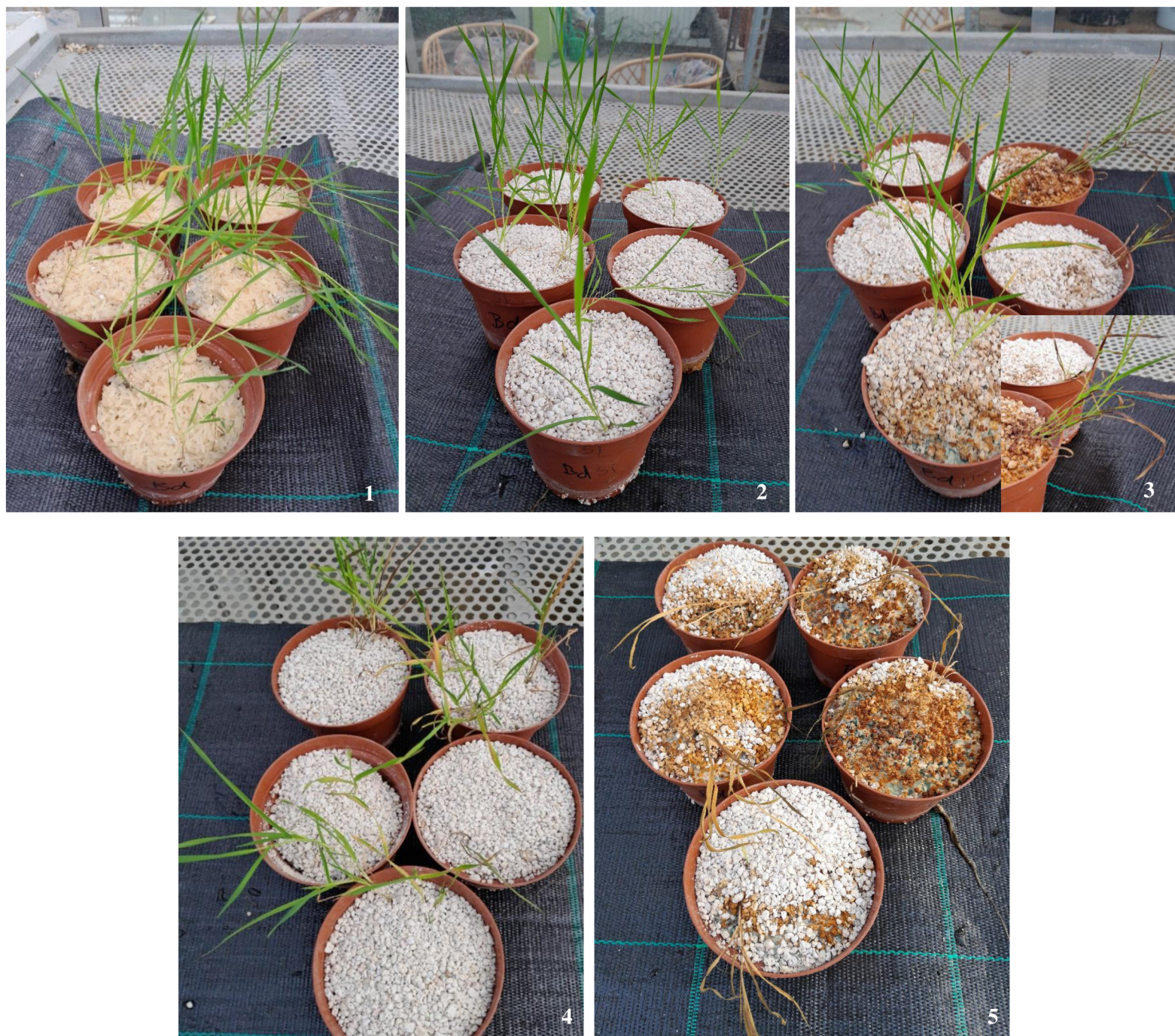
v = hodnota příslušného stupně poškození (1–5)

x = počet stupňů poškození (5)

N = celkový počet hodnocených rostlin/listů

Z hodnot celkového procenta poškození u každé z 20 rostlin dané varianty se poté vypočítalo průměrné procento poškození dané varianty (tabulka 7, 3. sloupec). V tabulce 7 lze pozorovat, že průměrné procento poškození rostlin *B. distachyon* se liší v závislosti na tom, zda byla rostlina napadena patogenními houbami nebo kolonizována endofytickými houbami. Lze říct, že v nejlepším stavu se nacházely rostliny *B. distachyon*, jež byly kolonizovány endofytem *S. indica* (BdSi), u kterých bylo průměrné poškození nejnižší (0,85 %) a to i nižší než u rostlin kontrolní varianty (1,84 %). Nicméně tento zjištěný rozdíl nebyl statisticky významný (tabulka 8). Na druhou stranu průměrné poškození rostlin kolonizovaných (potenciálně) endofytickou houbou *M. bolleyi* (BdMb) činilo 23,04 %, což je dokonce více než v případě rostlin napadených patogenem *F. culmorum* (BdFc) (průměrné poškození 15,61 %), toto zjištění tedy nesplňuje očekávání. Důvodem může být skutečnost, že u příliš stresovaných a oslabených rostlin se endofytická houba může stát pro daného hostitele patogenní (Galindo-Solis *et Fernández*, 2022; Akram *et al.*, 2023). Z největší míry byly poškozeny rostliny napadané patogenem *C. cereale* (BdCc), u kterých průměrné poškození činilo 100 %. Patogen

C. cereale se tedy v rámci tohoto experimentu choval jako závažnější patogen než *F. culmorum*, což neodpovídalo očekávání. Možným vysvětlením může být zvolený způsob inokulace rostlin *B. distachyon* (prostřednictvím kořenů), vzhledem k tomu, že *C. cereale* je významným kořenovým patogenem na rozdíl od *F. culmorum*, který napadá především nadzemní části rostlin. Původ použitého izolátu *F. culmorum* v této práci je z nekrotických skvrn na listech *B. distachyon*.



Obrázek 7: Soubor obrázků znázorňující stav (míru poškození) rostlin jednotlivých variant
Legenda: 1: rostliny varianty BdK, 2: rostliny varianty BdSi, 3: rostliny varianty BdMb, 4: rostliny varianty BdFc, 5: rostliny varianty BdCc

Tabulka 7: Výsledky vizuálního zhodnocení intenzity poškození rostlin *Brachypodium distachyon*

Varianta	Počet rostlin	Průměrné poškození [%]	Směrodatná odchylka	Standardní chyba	Interval spolehlivosti -95	Interval spolehlivosti +95
BdK	20	1,84	2,09	0,47	0,86	2,82
BdSi	20	0,85	1,62	0,36	0,09	1,61
BdMb	20	23,04	28,76	6,43	9,57	36,50
BdCc	20	100,00	0,00	0,00	100,00	100,00
BdFc	20	15,61	29,32	6,56	1,89	29,33

Získaná data byla následně statisticky otestována pomocí metody analýza rozptylu (ANOVA) s následným Tukeyho post-hoc testem ($p < 0,05$) za použití softwaru Statistica 12. ANOVA představuje metodu, jež se používá při statistickém testování hypotéz za účelem srovnání průměrů mezi sledovanými skupinami (Mishra *et al.*, 2019). Získaná p-hodnota (pokud $p < 0,05$) udává, že existuje statisticky významný rozdíl v průměru alespoň u jednoho sledovaného páru skupin (v tomto případě páru variant). Tukeyho post-hoc test poté umožňuje determinovat tento statisticky významný pár skupin (Mishra *et al.*, 2019).

Na základě výsledků statistické analýzy získaných dat (tabulka 8, 9) lze říct, že mezi průměrným procentem poškození srovnávaných variant byl prokázán statisticky významný rozdíl (hodnota $p < 0,05$; v tabulce 8 zeleně zvýrazněno). Konkrétně mezi variantami: BdK vs. BdMb/BdCc a dále pak mezi variantou BdSi vs. BdMb/BdCc a také mezi variantou BdMb vs. BdCc/BdK/BdSi (tabulka 9). V případě varianty BdCc byl zjištěn statisticky významný rozdíl při srovnání se všemi testovanými variantami a v případě varianty BdFc byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze ve srovnání s variantou BdCc. Pro ověření správnosti navržení experimentu byly srovnány i jednotlivá opakování a na základě zjištěné p-hodnoty ($p > 0,05$; tabulka 8, 2. řádek) lze říct, že mezi jednotlivými opakováními nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Toto porovnání bylo provedeno pomocí Tukeyho post-hoc testu, výsledky jak vizuálního zhodnocení intenzity poškození, tak statistického vyhodnocení jsou shrnuty v grafu 1.

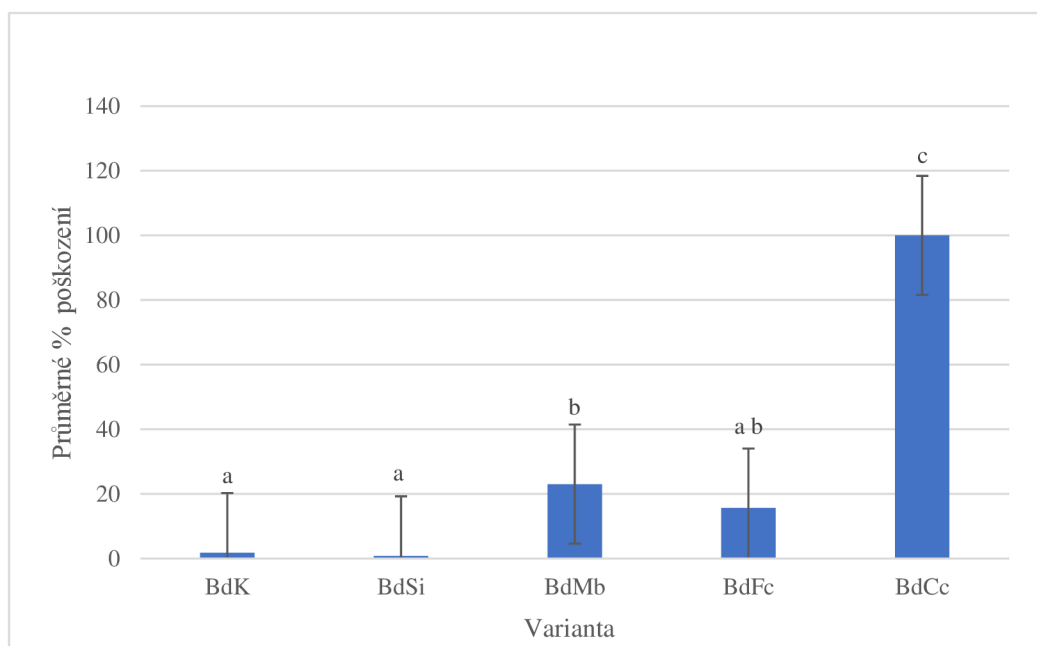
Tabulka 8: Výsledky statistického vyhodnocení intenzity poškození rostlin *Brachypodium distachyon* pomocí metody ANOVA

Zdroj variability	SS	Počet stupňů volnosti	MS	F	p
Varianta	135669,8	4	33917,44	90,7462	0,00000
Opakování	1150,6	4	287,64	0,7696	0,54839
Chyba	28032,1	75	373,76		

Legenda: SS: sum of squares (součet čtverců), MS: mean squares (průměrné čtverce), F: F distribution, statisticky významné hodnoty jsou zeleně zvýrazněny

Tabulka 9: Výsledky Tukey-HSD testu pro jednotlivé testované varianty

Varianta	Průměrné poškození [%]	Tukey-HSD test, $p < 0,05$	
BdK	1,84	a	
BdSi	0,84	a	
BdMb	23,04		b
BdCc	100,00		c
BdFc	15,61	a	b



Graf 1: Průměrné poškození rostlin *Brachypodium distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdFc, BdCc) zjištěné na základě vizuálního zhodnocení příznaků

Legenda: a, b, c: výsledek Tukeyho post-hoc testu ($p < 0,05$), který udává, mezi kterými srovnávanými variantami byl nalezen statisticky významný rozdíl; úsečky nad sloupci znázorňují standardní chybu

Na základě výsledků statistické analýzy lze tedy říct, že patogenní houby *F. culmorum* a *C. cereale* dle očekávání negativně ovlivňují svého hostitele a endofyt *M. bolleyi* má na rostliny méně negativní vliv oproti patogenu *C. cereale*, ale větší negativní vliv než patogen *F. culmorum*. Naopak se zdá, že endofyt *S. indica* neomezuje rostliny *B. distachyon* v růstu, respektive na rozdíl od ostatních studovaných hub nepoškozuje svého hostitele.

5.2 Výsledky qPCR (měření exprese genů zapojených do obranné reakce rostlin)

Pomocí kvantitativní Real-time PCR byla měřena exprese 6 vybraných genů (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*), jež hrají důležitou roli v obranných mechanismech rostlin (kapitola 3.4.1). Konkrétně bylo testováno, jak se mění míra exprese daného genu poté, co je rostlina (*B. distachyon*) napadena patogenními houbami *C. cereale* a *F. culmorum* (varianta BdCc a BdFc) ve srovnání s kontrolní variantou (BdK), přičemž na začátku experimentu se předpokládalo, že *F. culmorum* je závažnější patogen (způsobuje větší poškození rostlin) než *C. cereale*. Dále bylo sledováno, zda ke změnám exprese dochází i vlivem kolonizace rostlin endofytickými houbami *S. indica* (varianta BdSi) a *M. bolleyi* (varianta BdMb). Na základě toho lze následně posoudit, zda existuje rozdíl mezi intenzitou reakce rostliny na přítomnost patogenní vs. endofytické houby, respektive zda dochází ke spuštění obranných mechanismů rostlin v případě obou typů houbových organismů.

Vzhledem k tomu, že byla v rámci této práce provedena relativní kvantifikace genové exprese, musela být exprese studovaných genů vztažena k referenčnímu genu *BdSamDC*. Tudiž relativní kvantifikace podává informaci o relativní změně exprese cílového genu vůči vnitřní kontrole (referenčnímu genu). Výpočet hladiny relativní genové exprese provedl CFX Maestro Software (Bio-Rad) pomocí metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$:

Výpočet podle metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$ *

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1} - \Delta C_{t2}$$

$$\Delta C_{t1} = C_t (\text{cílového genu testovaného vzorku}) - C_t (\text{referenčního genu testovaného vzorku})$$

$$\Delta C_{t2} = C_t (\text{cílového genu kontrolního vzorku}) - C_t (\text{referenčního genu kontrolního vzorku})$$

*

C_{t1} : C_t testovaného vzorku (varianta BdSi, BdMb, BdCc, BdFc)

C_{t2} : C_t kontrolního vzorku (varianta BdK)

cílový gen: *BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*

referenční gen: *BdSamDC*

Pomocí metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se získala hodnota relativní exprese, která se následně použila pro stanovení hodnoty FD (fold difference, relativní rozdíl v expresi), která již přímo udává, zda došlo k upregulaci či downregulaci exprese cílového genu v testovaném vzorku ('treatmentu') ve srovnání s kontrolním vzorkem v daném dnu po inokulaci. Vypočítá se tedy jako poměr hodnoty relativní exprese cílového genu u testovaného vzorku a kontroly. Získané FD hodnoty byly podrobeny statistické analýze metodou One-way ANOVA pomocí CFX Maestro Softwaru (Bio-Rad). Hodnoty FD jsou uvedeny v tabulkách (10–15) společně s p-hodnotou. Relativní rozdíl v expresi testovaného genu je považován za statisticky významný, pokud je hodnota $p < 0,05$ (zeleně zvýrazněné hodnoty v tabulkách 10–12). Na grafech 2–7

je znázorněna relativní exprese testovaných genů (hodnoty odpovídají výsledkům výpočtu podle metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$), přičemž jednotlivé sloupce představují průměr ze dvou biologických opakování.

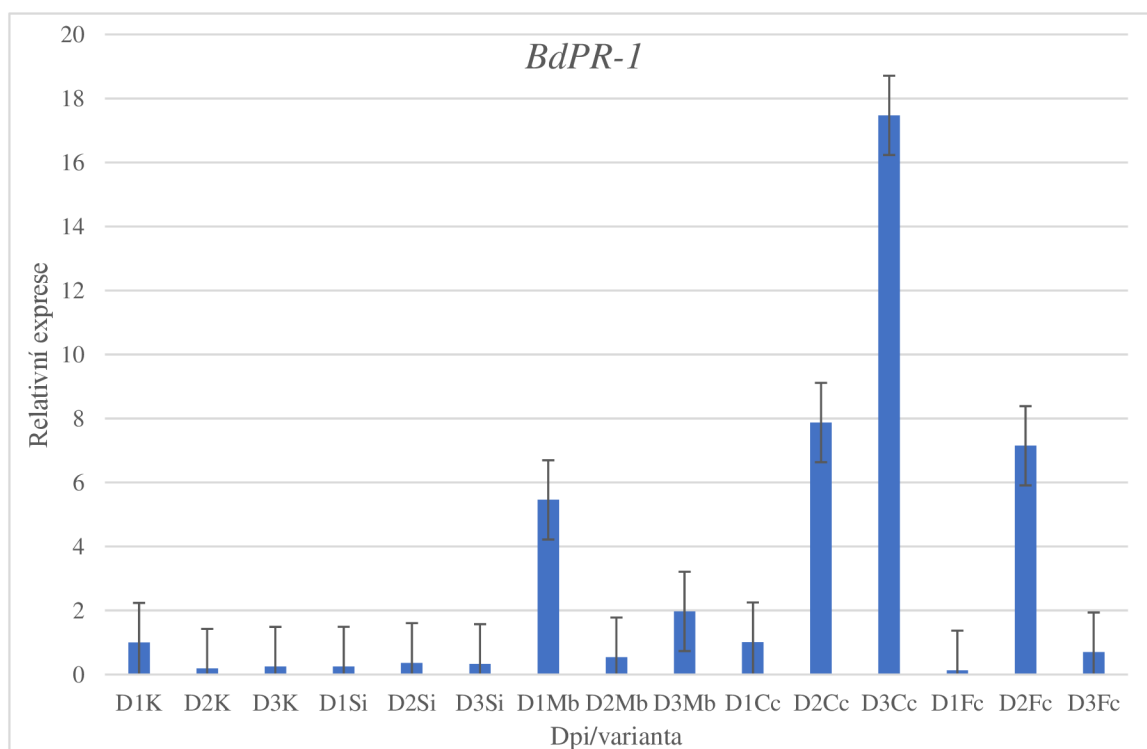
5.2.1 Exprese genu *BdPR-1*

Informace o míře exprese genu *BdPR-1* u jednotlivých variant jsou shrnuty v tabulce 10 a znázorněny na grafu 2. Relativní rozdíl v expresi testovaného genu (hodnota FD) je statisticky významný při $p < 0,05$, což lze pozorovat v případě rostlin napadených patogenem *C. cereale* (varianta BdCc) u kterých došlo ke zvýšené expresi genu *BdPR-1* 2 dpi ($p = 0,0192$) a 3 dpi ($p = 0,0000$). Stejně tak lze pozorovat statisticky významný rozdíl v expresi u rostlin napadených patogenem *F. culmorum* (varianta BdFc), u kterých došlo ke zvýšené expresi testovaného genu 2 dpi ($p = 0,02768$), mírně zvýšená exprese lze pozorovat i 3. dpi, a naopak mírně snížená exprese během 1. dpi, v těchto případech však zjištěný relativní rozdíl v expresi není statisticky významný. Lze říct, že exprese genu *BdPR-1* byla v případě varianty BdCc přibližně 42× vyšší (2 dpi) a asi 70× vyšší (3 dpi) oproti kontrolní variantě a u varianty BdFc (2 dpi) byla exprese testovaného genu asi 38× vyšší oproti kontrole. Exprese genu *BdPR-1* byla mírně upregulována i u rostlin inokulovaných endofytem *M. bolleyi* (varianta BdMb) zejména 1 dpi a 3 dpi, nicméně v tomto případě nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. U rostlin kolonizovaných endofytem *S. indica* (varianta BdSi) nedošlo ke statisticky významné upregulaci exprese genu *BdPR-1*, což odpovídá očekávání vzhledem k tomu, že některé endofyty mají mechanismy, díky kterým se mohou vyhnout imunitnímu systému rostlin (kapitola 3.3) a velmi často poskytují rostlinám řadu výhod (kapitola 3.1.1). Celkově lze tedy říct, že míra exprese genu *BdPR-1* byla značně vyšší v případě rostlin napadených patogenními houbami než u rostlin, jež byly kolonizovány endofytickými houbami, přičemž statisticky významné hodnoty FD lze pozorovat 2 dpi a 3 dpi (v tabulce 10 kolonka E vs. P). V případě patogenních hub byla vyšší míra exprese genu *BdPR-1* pozorována u rostlin napadených patogenem *C. cereale*.

Tabulka 10: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu *BdPR-1* 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant

Varianta	1 dpi		2 dpi		3 dpi		Průměr ze všech dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
BdSi	0,25	0,61795	1,95	0,52629	1,34	0,53151	0,87	0,08136
BdMb	5,46	0,60673	2,88	0,55001	7,84	0,70910	4,97	0,39608
BdCc	1,01	0,73234	41,79	0,01922	69,43	0,00000	14,33	0,00025
BdFc	0,13	0,67358	37,94	0,02768	2,78	0,58073	2,40	0,40738
E vs. P	0,31	0,67697	16,80	0,04991	4,29	0,00604	2,82	0,00679

Legenda: FD: fold difference, relativní rozdíl v expresi; dpi: den po inokulaci; E vs. P: srovnání průměrných FD hodnot endofytů (*S. indica* a *M. bolleyi*) s patogeny (*F. culmorum* a *C. cereale*); statisticky významné hodnoty FD ($p < 0,05$) jsou zeleně zvýrazněny



Graf 2: Relativní exprese genu *BdPR-1* u rostlin *Brachypodium distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci

Legenda: D1: 1 dpi, D2: 2 dpi, D3: 3 dpi; K: kontrola; Si: *S. indica*; Mb: *M. bolleyi*; Cc: *C. cereale*; Fc: *F. culmorum*; sloupce zahrnují průměr relativní exprese ze 2 biologických opakování, úsečky nad sloupci znázorňují standardní chybu

5.2.2 Exprese genu *BdCHIT*

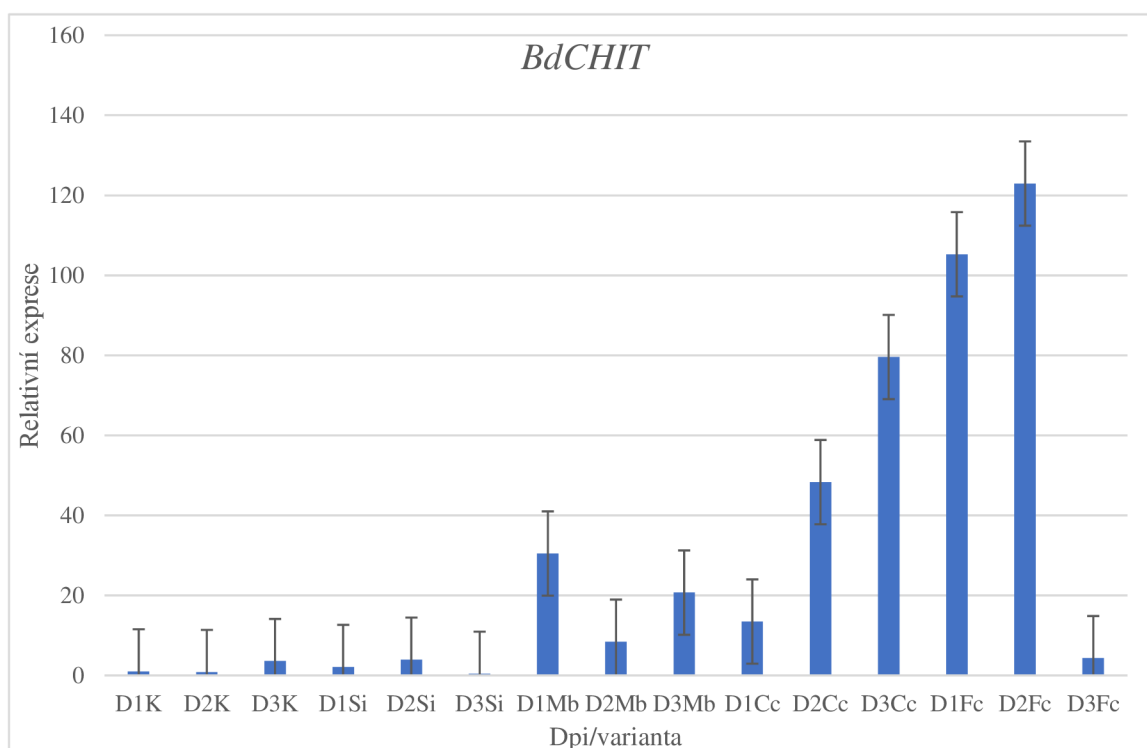
V případě genu *BdCHIT* lze pozorovat statisticky významný relativní rozdíl v expresi, jak u rostlin kolonizovaných endofytem *M. bolleyi* (varianta BdMb), tak u rostlin napadených patogeny *C. cereale* a *F. culmorum* (varianta BdCc a BdFc). K významné upregulaci exprese genu *BdCHIT* došlo u rostlin varianty BdMb zejména 1 dpi, kdy byla exprese asi 30× vyšší oproti kontrole ($p = 0,0061$) a přibližně 10× vyšší během 2. dpi ($p = 0,04489$) oproti kontrole. Ve stejné dny byla exprese studovaného genu upregulována i u rostlin varianty BdFc, a to obzvláště 1 dpi, kdy exprese byla asi 105× vyšší ve srovnání s kontrolou ($p = 0,00374$) a 146× vyšší během 2. dpi ($p = 0,00012$). U varianty BdMb lze pozorovat mírnou upregulaci exprese testovaného genu i 3 dpi, nicméně stejně jako u varianty BdFc (3 dpi) nebyl v tento den prokázán statisticky významný rozdíl. Zvýšená exprese genu *BdCHIT* lze dále pozorovat u rostlin varianty BdCc, a to během všech tří dnů po inokulaci, průměrně je exprese přibližně 26× vyšší oproti kontrolní variantě ($p = 0,00015$). U rostlin kolonizovaných endofytem *S. indica* došlo k mírně zvýšené expresi genu *BdCHIT* 1 dpi a 2 dpi, nejedná se však o statisticky významný rozdíl. Celkově lze říct, že stejně jako v případě genu *BdPR-1* byla míra exprese genu *BdCHIT* vyšší u rostlin s patogenními houbami oproti rostlinám s endofytickými houbami, což dokazuje průměrná hodnota FD

za všechny tři dny po inokulaci, jež značí, že relativní rozdíl v expresi je statisticky významný. Co se týče patogenních organismů, tak nepatrně výraznější vliv na expresi genu *BdCHIT* měl patogen *F. culmorum* (průměrná hodnota FD za všechny 3 dpi je 26,45). Výše popsané výsledky jsou shrnuty v tabulce 11 a relativní exprese testovaného genu u jednotlivých variant je znázorněna na grafu 3.

Tabulka 11: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu *BdCHIT* 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant

Varianta	1 dpi		2 dpi		3 dpi		Průměr ze všech dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
BdSi	2,11	0,36130	4,66	0,38520	0,11	0,37466	1,04	0,13096
BdMb	30,46	0,00610	10,02	0,04489	5,78	0,64844	12,08	0,01316
BdCc	13,47	0,00517	57,44	0,00452	22,23	0,00851	25,81	0,00102
BdFc	105,25	0,00374	146,17	0,00012	1,20	0,43726	26,45	0,00015
E vs. P	4,69	0,17123	13,41	0,00115	6,35	0,50862	7,37	0,00003

Legenda: FD: fold difference, relativní rozdíl v expresi; dpi: den po inokulaci; E vs. P: srovnání průměrných FD hodnot endofytů (*S. indica* a *M. bolleyi*) s patogeny (*F. culmorum* a *C. cereale*); statisticky významné hodnoty FD ($p < 0,05$) jsou zeleně zvýrazněny



Graf 3: Relativní exprese genu *BdCHIT* u rostlin *Brachypodium distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci

Legenda: D1: 1 dpi, D2: 2 dpi, D3: 3 dpi; K: kontrola; Si: *S. indica*; Mb: *M. bolleyi*; Cc: *C. cereale*; Fc: *F. culmorum*; sloupce zahrnují průměr relativní exprese ze 2 biologických opakování, úsečky nad sloupci znázorňují standardní chybu

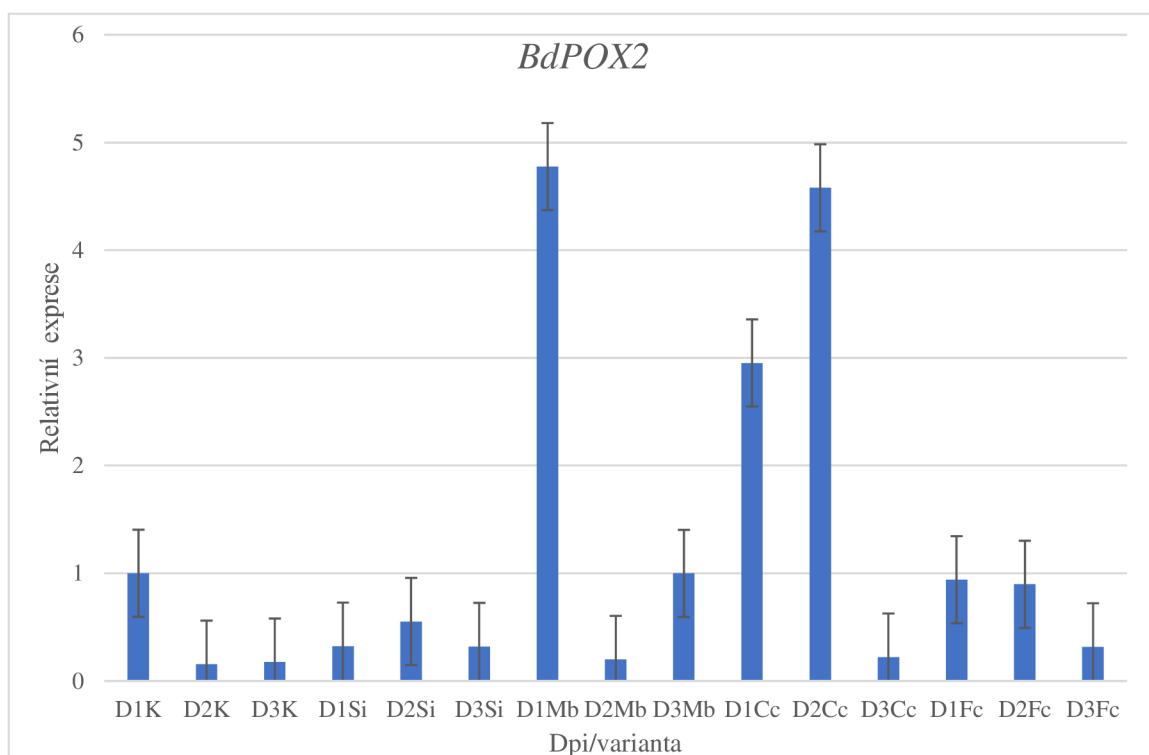
5.2.3 Exprese genu *BdPOX2*

Na základě údajů v tabulce 12 lze pozorovat zvýšenou expresi genu *BdPOX2* u rostlin kolonizovaných endofytickou houbou *M. bolleyi* (varianta BdMb) a u rostlin napadených patogeny *F. culmorum* (varianta BdFc) a *C. cereale* (BdCc). V případě rostlin varianty BdMb byl zjištěn statisticky významný relativní rozdíl v expresi během 1. dpi, kdy byla exprese daného genu asi 4,8× vyšší oproti kontrole ($p = 0,0006$) a 5,7× vyšší během 3. dpi ($p = 0,0059$) ve srovnání s kontrolou. Exprese genu *BdPOX2* byla také upregulována u rostlin varianty BdCc, přičemž statisticky významný rozdíl byl prokázán 2 dpi, během kterého byla exprese asi 29,5× vyšší oproti kontrolní variantě ($p = 0,0008$). Podobný výsledek byl zjištěn i u rostlin varianty BdFc, kdy se gen *BdPOX2* exprimoval přibližně 5,8× více ve srovnání s kontrolou ($p = 0,0055$). V ostatních dnech nebyl u zmíněných variant zjištěn statisticky významný rozdíl. Stejně jako v předchozích případech nebyl pozorován statisticky významný vliv endofytické houby *S. indica* na expresi genu *BdPOX2*, nicméně lze pozorovat, že během 1. dpi došlo tentokrát k downregulaci testovaného genu oproti kontrole a během 2. a 3. dpi došlo k mírné upregulaci. V tomto případě nelze dospět k závěru, že patogenní houby mají větší vliv na míru exprese sledovaného genu oproti endofytům, jelikož nebylo prokázáno, že získané výsledky jsou statisticky významné. Relativní exprese genu *BdPOX2* je znázorněna na grafu 4.

Tabulka 12: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu *BdPOX2* 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant

Varianta	1 dpi		2 dpi		3 dpi		Průměr ze všech dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
BdSi	0,3226	0,6691	3,5500	0,4587	1,8300	0,3870	1,2799	0,0667
BdMb	4,7759	0,0006	1,2838	0,4499	5,6974	0,0059	4,1173	0,0852
BdCc	2,9530	0,2057	29,4729	0,0008	1,2635	0,3510	4,7910	0,0187
BdFc	0,9399	0,9483	5,7743	0,0055	1,8063	0,3859	2,1402	0,1812
E vs. P	1,3423	0,5133	4,6988	0,0567	0,4681	0,2586	1,4328	0,2429

Legenda: FD: fold difference, relativní rozdíl v expresi; dpi: den po inokulaci; E vs. P: srovnání průměrných FD hodnot endofytů (*S. indica* a *M. bolleyi*) s patogeny (*F. culmorum* a *C. cereale*); statisticky významné hodnoty FD ($p < 0,05$) jsou zeleně zvýrazněny



Graf 4: Relativní exprese genu *BdPOX2* u rostlin *Brachypodium distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci

Legenda: D1: 1 dpi, D2: 2 dpi, D3: 3 dpi; K: kontrola; Si: *S. indica*; Mb: *M. bolleyi*; Cc: *C. cereale*; Fc: *F. culmorum*; sloupce zahrnují průměr relativní exprese ze 2 biologických opakování, úsečky nad sloupci znázorňují standardní chybu

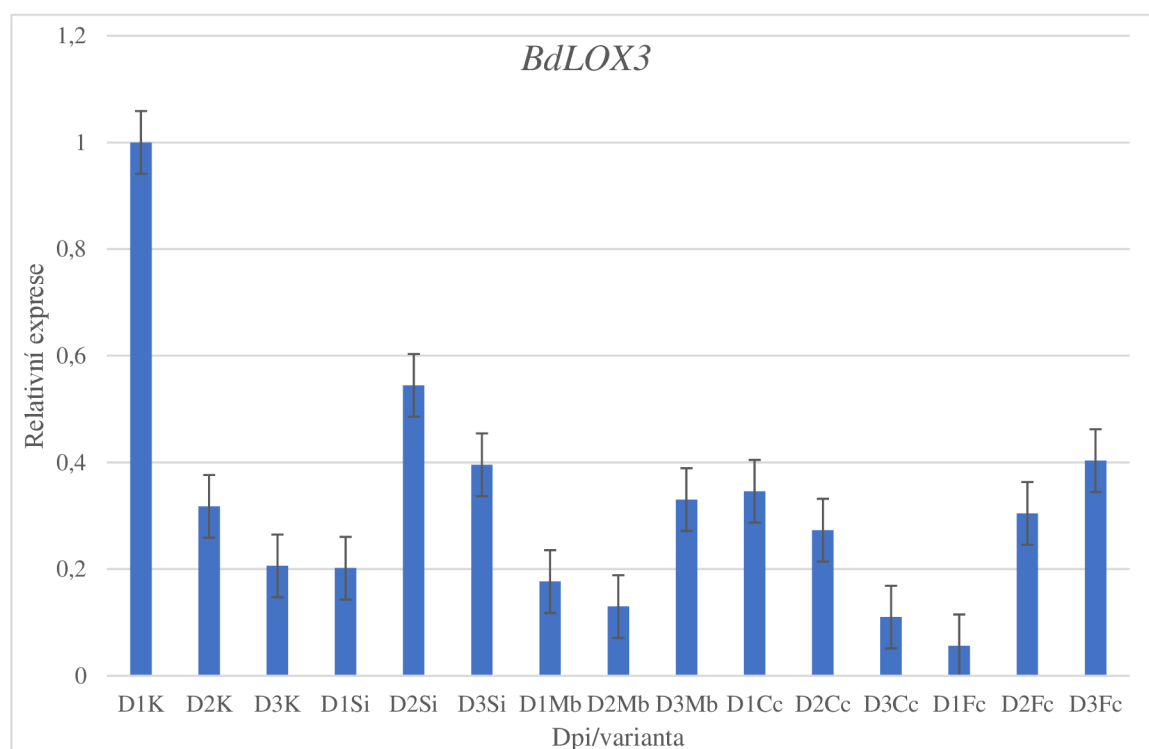
5.2.4 Exprese genu *BdLOX3*

Mírně zvýšená exprese genu *BdLOX3* lze pozorovat u rostlin varianty BdSi a to 2 dpi a 3 dpi a u varianty BdMb a BdFc 3 dpi, v případě ostatních dnů, a to i včetně varianty BdCc došlo k downregulaci exprese genu *BdLOX3*. V tomto případě se však u žádné z testovaných variant nejednalo o statisticky významný rozdíl, tudíž jak patogenní, tak endofytické houby neměly na expresi tohoto genu statisticky významný vliv. Získané hodnoty FD jsou uvedeny v tabulce 13 a relativní exprese je znázorněna na grafu 5.

Tabulka 13: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu *BdLOX3* 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant

Varianta	1 dpi		2 dpi		3 dpi		Průměr ze všech dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
BdSi	0,2018	0,2687	1,7134	0,2587	1,9201	0,7178	0,8723	0,4777
BdMb	0,1767	0,2365	0,4086	0,6166	1,6035	0,8587	0,4874	0,2709
BdCc	0,3459	0,1334	0,8593	0,9796	0,5343	0,4616	0,5416	0,2881
BdFc	0,1033	0,3246	0,9582	0,9755	1,9580	0,6864	1,7977	0,1411
E vs. P	2,1296	0,6503	1,0845	0,9009	0,5829	0,7790	1,2497	0,9786

Legenda: FD: fold difference, relativní rozdíl v expresi; dpi: den po inokulaci; E vs. P: srovnání průměrných FD hodnot endofytů (*S. indica* a *M. bolleyi*) s patogeny (*F. culmorum* a *C. cereale*)



Graf 5: Relativní exprese genu *BdLOX3* u rostlin *Brachypodium distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci

Legenda: D1: 1 dpi, D2: 2 dpi, D3: 3 dpi; K: kontrola; Si: *S. indica*; Mb: *M. bolleyi*; Cc: *C. cereale*; Fc: *F. culmorum*; sloupce zahrnují průměr relativní exprese ze 2 biologických opakování, úsečky nad sloupci znázorňují standardní chybu

5.2.5 Exprese genu *BdWRKY41*

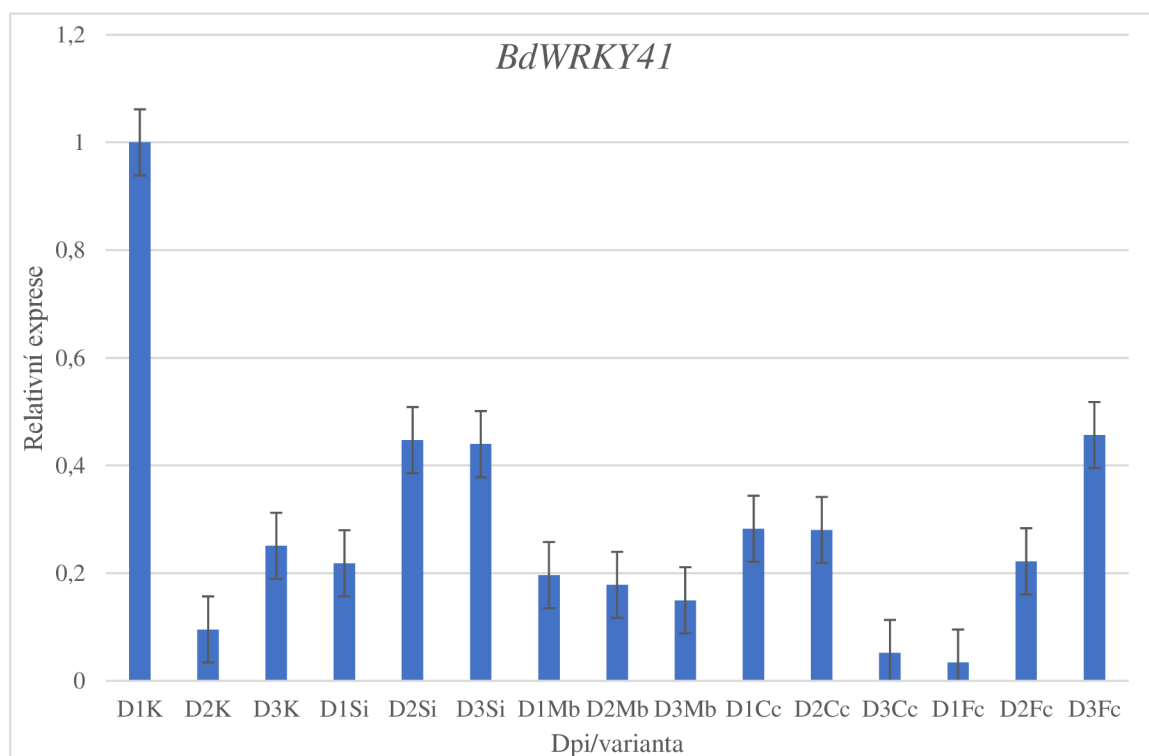
K mírné upregulaci exprese genu *BdWRKY41* došlo u rostlin varianty BdCc 2 dpi a také u rostlin varianty BdFc během 2. dpi a také 3. dpi. V případě rostlin kolonizovaných endofytem *S. indica* lze pozorovat zvýšenou expresi během 2. dpi a 3. dpi a u rostlin s endofytem *M. bolleyi* 2 dpi. V ostatních dnech lze u zmíněných variant pozorovat sníženou expresi testovaného genu. Nicméně stejně jako

v případě genu *BdLOX3* ani v jednom zmíněném případě se nejednalo o statisticky významný rozdíl. Hodnoty FD jsou uvedeny v tabulce 14 a relativní exprese testovaného genu u jednotlivých variant je znázorněna na grafu 6.

Tabulka 14: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu *BdWRKY41* 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant

Varianta	1 dpi		2 dpi		3 dpi		Průměr ze všech dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
BdSi	0,2184	0,1526	4,6843	0,3796	1,7534	0,7805	1,1835	0,2986
BdMb	0,1964	0,1473	1,8679	0,5706	0,5966	0,7517	0,6026	0,0749
BdCc	0,2825	0,1247	2,9349	0,6918	0,2065	0,3992	0,5552	0,0891
BdFc	0,0802	0,5236	2,3266	0,6508	1,8203	0,5380	2,1749	0,4975
E vs. P	1,5199	0,8508	0,8834	0,9097	0,9394	0,9653	1,1055	0,9140

Legenda: FD: fold difference, relativní rozdíl v expresi; dpi: den po inokulaci; E vs. P: srovnání průměrných FD hodnot endofytů (*S. indica* a *M. bolleyi*) s patogeny (*F. culmorum* a *C. cereale*)



Graf 6: Relativní exprese genu *BdWRKY41* u rostlin *Brachypodium distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci

Legenda: D1: 1 dpi, D2: 2 dpi, D3: 3 dpi; K: kontrola; Si: *S. indica*; Mb: *M. bolleyi*; Cc: *C. cereale*; Fc: *F. culmorum*; sloupce zahrnují průměr relativní exprese ze 2 biologických opakování, úsečky nad sloupci znázorňují standardní chybu

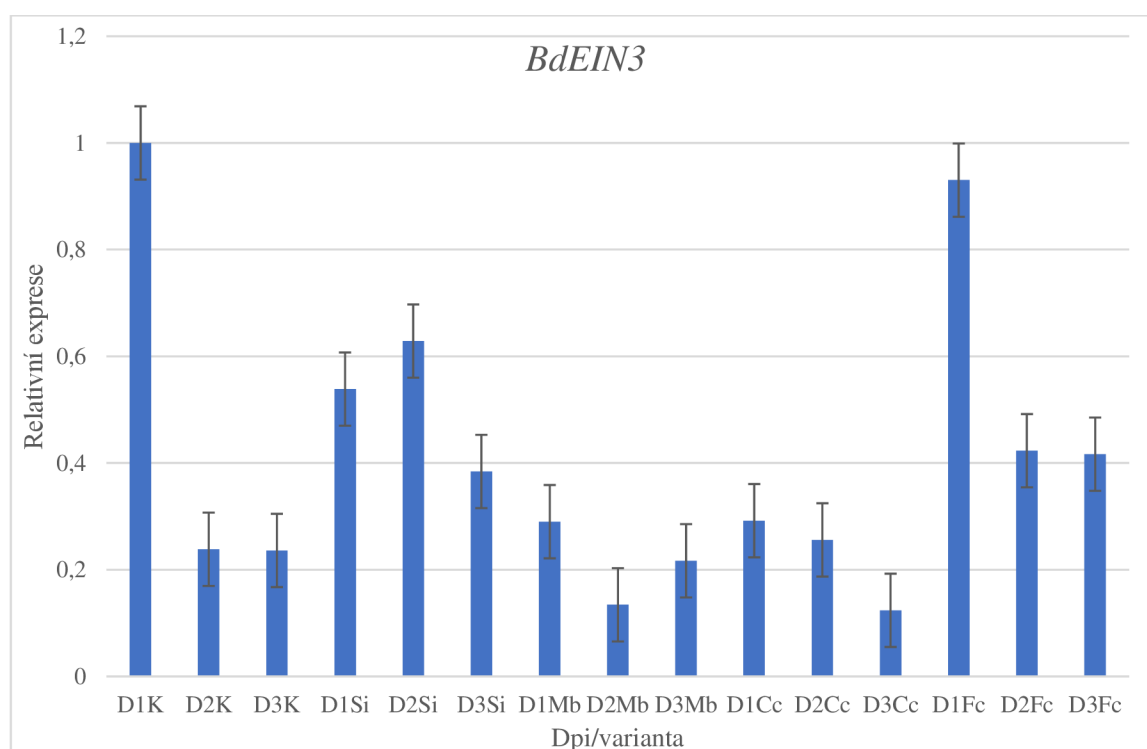
5.2.6 Expres genu *BdEIN3*

Podobně jako v případě exprese genu *BdLOX3* a *BdWRKY41* nebyl prokázán statisticky významný relativní rozdíl v expresi genu *BdEIN3* u žádné z testovaných variant (tabulka 15). Nicméně mírně zvýšená exprese genu *BdEIN3* lze pozorovat u rostlin varianty BdSi a BdFc a to 2 a 3 dpi a naopak během 1. dpi došlo k downregulaci exprese testovaného genu. U ostatních variant došlo během většiny dnů také k downregulaci. Relativní exprese testovaného genu u jednotlivých testovaných variant je znázorněna na grafu 7.

Tabulka 15: Relativní rozdíl v expresi (hodnota FD) genu *BdEIN3* 1, 2, 3 dpi u jednotlivých variant

Varianta	1 dpi		2 dpi		3 dpi		Průměr ze všech dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
BdSi	0,5386	0,0875	2,6371	0,0917	1,6271	0,7246	1,7741	0,1339
BdMb	0,2901	0,0914	0,5632	0,5323	0,9177	0,5034	0,5774	0,4182
BdCc	0,2919	0,0966	1,0737	0,5780	0,5247	0,3433	0,5534	0,3579
BdFc	0,9303	0,9035	1,7751	0,7496	1,7642	0,7422	1,4282	0,4845
E vs. P	1,6338	0,4339	0,4864	0,9180	0,7874	0,4275	0,9087	0,4885

Legenda: FD: fold difference, relativní rozdíl v expresi; dpi: den po inokulaci; E vs. P: srovnání průměrných FD hodnot endofytů (*S. indica* a *M. bolleyi*) s patogeny (*F. culmorum* a *C. cereale*)



Graf 7: Relativní exprese genu *BdEIN3* u rostlin *Brachypodium distachyon* jednotlivých variant (BdK, BdSi, BdMb, BdCc, BdFc) měřena během 3 dnů po inokulaci

Legenda: D1: 1 dpi, D2: 2 dpi, D3: 3 dpi; K: kontrola; Si: *S. indica*; Mb: *M. bolleyi*; Cc: *C. cereale*; Fc: *F. culmorum*; sloupce zahrnují průměr relativní exprese ze 2 biologických opakování, úsečky nad sloupci znázorňují standardní chybu

6 DISKUZE

Reakce rostliny na patogenní a endofytické houby může být posouzena na základě stanovení úrovně exprese řady genů zapojených do obranných procesů například pomocí metody RT-qPCR, jež se vyznačuje vysokou přesností, citlivostí a také poskytnutím rychlých výsledků (Deshmukh *et al.*, 2007; Derveaux *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2019; Panda *et al.*, 2019). V rámci experimentální části této práce byla u modelového organismu *B. distachyon* měřena exprese šesti vybraných genů zapojených do obranných mechanismů rostlin (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*) s cílem zjistit, jak se liší reakce rostlin na napadení závažnými houbovými patogeny (*F. culmorum* a *C. cereale*) a kolonizaci endofytickými houbami (*S. indica* a *M. bolleyi*). Řada z výše zmíněných obranných genů je indukována fytohormony nebo se jejich produkty účastní syntézy fytohormonů (Kouzai *et al.*, 2016). Studium exprese těchto tzv. fytohormon-responzivních genů u organismu *B. distachyon* se v rámci své studie zabývali například Sandoya *et al.*, 2014 či Kouzai *et al.*, 2016. Pozměněná exprese těchto genů vlivem endofytických hub může poukazovat na jejich schopnost vyvolat indukovanou systémovou rezistenci (tzn. posílit intenzitu obranných mechanismů) a díky tomu předpřipravit rostliny na potenciální napadení patogeny, také označováno jako priming (Edreva *et al.*, 2004; Martinez-Medina *et al.*, 2016; Rabiey *et al.*, 2017; de Silva *et al.*, 2019; Adeleke *et al.*, 2022). Z toho důvodu se uvažuje o možnosti využití některých endofytů včetně *S. indica* a *M. bolleyi* jako tzv. biologické induktory v rámci biologické ochrany rostlin, a to v podstatě jako prostředek k imunizaci rostlin. Naopak studium změn v expresi fytohormon-responzivních genů vlivem patogenů může poskytnout informaci o konkrétních mechanismech, pomocí kterých se rostlina brání a je schopna potlačit infekci daným patogenem (Kakei *et al.*, 2015; Kouzai *et al.*, 2016). Pro srovnání bylo po dvou týdnech po inokulaci provedeno i vizuální zhodnocení intenzity poškození (příznaků infekce) rostlin *B. distachyon* vyjádřené jako průměrné procento poškození vypočítané dle vzorce Townsenda a Heubergera (Kudela *et al.*, 1989). Na vhodnost využití *B. distachyon* pro studium způsobu interakce houbových patogenů se zemědělsky významnými obilovinami poukazuje studie Fitzgerald *et al.*, 2015. Peraldi *et al.*, 2011 jako první prokázali, že *B. distachyon* může být snadno infikován patogenem *F. culmorum*. Interakcí mezi *B. distachyon* a *F. culmorum* se zabývala i studie Matušinsky *et al.*, 2022, v rámci které byla také poprvé potvrzena kompatibilní interakce mezi *B. distachyon* a *M. bolleyi*. Šečić *et al.*, 2021 se zabývali interakcí mezi *B. distachyon* a *S. indica*, a to konkrétně mechanismy, které přispívají k navození vzájemně prospěšného vztahu. Interakce mezi patogenem *C. cereale* a *B. distachyon* nebyla doposud nikým studována.

Na základě výsledků RT-qPCR bylo zjištěno, že míra exprese testovaných genů v listech *B. distachyon* se lišila v jednotlivých dnech po inokulaci a také vlivem přítomnosti dané endofytické nebo patogenní houby. V případě genů *BdPR-1* a *BdCHIT* byla pozorována výrazněji vyšší míra exprese u rostlin napadených patogenními houbami (varianty BdCc, BdFc) oproti rostlinám, jež byly kolonizovány endofyty (varianty BdSi, BdMb). Průměrná míra exprese za všechny tři dpi genu *BdPR-1* byla 2,72× vyšší a exprese genu *BdCHIT* byla 7,34× vyšší. Lze tedy říct, že rostliny v tomto případě

intenzivněji reagovaly na napadení patogenem než na přítomnost endofytických hub, což odpovídá očekávání. Obecně výraznější vliv patogenů na expresi některých obranných genů ve srovnání s endofyty byl prokázán v řadě studiích (např. Deshmukh *et Kogel*, 2007; Atia *et al.*, 2019; Panda *et al.*, 2019). Co se týče endofytické houby *S. indica*, tak v rámci této práce nebyl prokázán statisticky významný vliv na míru exprese žádného z testovaných genů. Jak již bylo zmíněno, jedním z důvodů mohou být mechanismy, díky kterým je řada endofytů schopna uniknout imunitnímu systému rostlin (kapitola 3.3). Nicméně Šečić *et al.*, 2021 prokázali, že i samotná kolonizace kořenů *B. distachyon* endofytem *S. indica* vedla k upregulaci exprese řady genů včetně genu *PR-1*, genu *WRKY*, genu kódujícího peroxidázu a chitinázu. Ve studii Pedrotti *et al.*, 2013 pozorovali zvýšenou expresi genu *PR-1* v kořenech vlivem *S. indica* jak v místě kolonizace, tak na vzdálenějších místech (v nekolonizovaných částech).

Vzhledem k tomu, že *S. indica* nezpůsobila statisticky významnou změnu v expresi žádného z testovaných genů, lze říct, že její přítomnost nemá na rostlinu *B. distachyon* negativní vliv. To odráží i velmi nízké průměrné poškození (0,84 %) zjištěné na základě vizuálního zhodnocení příznaků infekce. Výsledky této práce naznačují, že zdravotní stav rostlin kolonizovaných *S. indica* se neliší od stavu kontrolních rostlin. Pro potvrzení pozitivního vlivu *S. indica* na různé vlastnosti (růst, vývoj) *B. distachyon* a schopnost navodit indukovanou rezistenci, je však nutné provést další analýzy. Význam endofytické houby *S. indica* spočívá zejména v její schopnosti posílit obranyschopnost řady rostlin, a to konkrétně prostřednictvím navození indukované rezistence (Deshmukh *et Kogel*, 2007; Panda *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022). To se může projevit, jak již bylo naznačeno odlišnou mírou exprese některých ze zmíněných obranných genů. Významné rozdíly v expresi lze pozorovat především v závislosti na tom, zda je rostlina v době napadení patogenem již danou endofytickou houbou kolonizována (tzv. ‘pre-colonized’) či nikoliv. Tímto se zabývali například autoři studie Panda *et al.*, 2019, kteří zjistili, že v počátečním stádiu infekce rostlin rajčete, které byly v době inokulace patogenem *Alternaria solani* již kolonizovány endofytem *S. indica*, došlo ke zvýšené expresi tří *PR* genů včetně genu *PR-1*. Nicméně v pozdějších fázích infekce bylo pozorováno, že míra exprese těchto genů byla vyšší u rostlin, které nebyly předtím kolonizovány endofytem *S. indica* ve srovnání s kolonizovanými rostlinami. Li *et al.*, 2022 zjišťovali účinnost indukované systémové rezistence vyvolané endofytem *S. indica* vůči patogenu *C. cereale* a *F. graminearum* u pšenice. Jejich výsledky potvrzují, že *S. indica* měla ve srovnání s patogenními houbami mnohem menší vliv na expresi obranných genů (měla nejmenší vliv na transkriptom pšenice), rostlina tedy intenzivněji reagovala na patogenní houby než na endofytickou houbu *S. indica*. Deshmukh *et Kogel*, 2007 testovali vliv *S. indica* na expresi obranných genů (*PR* genů) v kořenech rostlin ječmene infikovaných patogenem *F. graminearum* pomocí RT-qPCR. Stejně jako v rámci tohoto experimentu nevedla samotná inokulace rostlin *S. indica* ke zvýšené expresi obranných genů, pouze mírně zvýšená hladina *PR1b* transkriptů byla pozorována 1, 2 a 4 dpi. Molitor *et al.*, 2011 popsali, že endofytická houba *S. indica* indukuje rezistenci ječmene vůči padlí a je zodpovědná za fyziologickou odpověď ječmene v podobě spuštění programované buněčné smrti, tvorbě papil v místě

napadení a upregulace exprese obranných genů včetně genu *PR-1* u rostlin, které byly v době napadení patogenem kolonizovány touto endofytickou houbou.

Druhou endofytickou houbou, jejíž vliv byl na *B. distachyon* v předkládané práci testován, je *M. bolleyi*. V tomto případě byl prokázán statisticky významný vliv *M. bolleyi* na expresi genů *BdCHIT* a *BdPOX2*, kdy exprese *BdCHIT* byla značně upregulována během prvních 2 dpi a exprese *BdPOX2* byla ve větší míře upregulována během 1. a 3. dpi. Vliv *M. bolleyi* na expresi *BdCHIT* byl prokázán i ve studii Matušinsky *et al.*, 2022. Radková (2023) ve své práci prokázala statisticky významný vliv samotného endofytu *M. bolleyi* na expresi některých z obranných genů, nikoliv však na geny *BdCHIT* a *BdPOX2*, ale na expresi genů *BdLOX3* a *BdWRKY41*. V případě genu *BdPR-1* se jí nepodařilo, stejně jako v této práci, získat statisticky významné hodnoty FD. Upregulace exprese genů *BdCHIT* a *BdPOX2* způsobená vlivem *M. bolleyi* v tomto případě odráží i míru poškození rostlin zjištěnou na základě vizuálního zhodnocení, jelikož průměrné poškození u rostlin varianty BdMb bylo 23,04 %. To je mnohem více, než se očekávalo, vzhledem k tomu, že je organismus *M. bolleyi* obecně považován za endofytickou houbu (Rothen *et al.*, 2018; kapitola 3.1.2). Nicméně v některých studiích (Murray *et Gadd*, 1981; Sprague, 1948) je *M. bolleyi* skutečně popisován jako slabý patogen. Obecně lze říct, že endofytické houby se mohou stát patogenní, pokud je daná rostlina v době kolonizace nějakým způsobem oslabena a stresována (Galindo-Solís *et Fernández*, 2022; Akram *et al.*, 2023).

V případě patogenních hub byla zaznamenána intenzivní reakce rostlin *B. distachyon* zejména na infekci *C. cereale*. To se projevilo významnou upregulací exprese genu *BdPR-1* (2 a 3 dpi), *BdCHIT* (během všech dpi) a *BdPOX2* (2 dpi), zatímco na expresi genů *BdLOX3*, *BdWRKY41* a *BdEIN3* neměl patogen statisticky významný vliv. V řadě studií bylo prokázáno, že geny kódující PR proteiny (včetně *PR1*) a také např. gen *chitinase1* hrají významnou roli v rámci ochrany pšenice před infekcí *C. cereale*, jakožto původce onemocnění lemovaná stébelná skvrnitost, což se právě může projevit zvýšenou expresí některých ze zmíněných genů (Chen *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2014, 2017). Su *et al.*, 2022 testovali u pšenice vliv *C. cereale* na expresi jednoho z potenciálně obranných genů-*TaPIMA1*, který patří do tzv. MATE (Multi-Antimicrobial Extrusion) genové rodiny, jejíž zástupci se pravděpodobně podílí na rezistenci rostlin vůči různým patogenům.

Stejně jako v případě *C. cereale* došlo k upregulaci exprese genů *BdPR-1* (2 dpi), *BdCHIT* (1 dpi a 2 dpi), *BdPOX2* (2 dpi) i v důsledku napadení rostlin *B. distachyon* patogenem *F. culmorum*. Na expresi *BdLOX3*, *BdWRKY41* a *BdEIN3* neměla přítomnost *F. culmorum* statisticky významný vliv. Podobné výsledky získala ve své práci Radková (2023), nicméně v jejím případě byl prokázán statisticky významný vliv *F. culmorum* i na expresi genů *BdLOX3* a *BdWRKY41*. Ve studii Matušinsky *et al.*, 2022 byl prokázán statisticky významný vliv *F. culmorum* na expresi *BdPR-1*, *BdLOX3* a *BdCHIT*. Zhu *et al.*, 2021 testovali vliv patogenů *Magnaporthe oryzae* a *Fusarium graminearum* na expresní profily obranných genů u *B. distachyon*, přičemž bylo zjištěno, že *B. distachyon* reaguje na tyto patogenní houby odlišným způsobem. Konkrétně byly pozorovány významné změny v expresi genů zapojených do syntézy a signalizace JA jako je gen *LOX* a *AOS*, přičemž jejich míra exprese byla nižší

v případě *F. graminearum* než u *M. oryzae*, dále pak byla vlivem obou patogenů ovlivněna exprese genů kódujících transkripční faktory WRKY, MYB, bZIP a také receptor-like kinázy (RLK) či komponenty MAPK kaskády. Pasquet *et al.*, 2014 testovali reakci *B. distachyon* na dva kmeny *F. graminearum* (wild-type-produkující deoxynivalenol (Fg DON+) a mutantní-neprodukující deoxynivalenol (Fg DON⁻)). Výsledky této studie ukazují, že oba kmeny indukovaly syntézu JA a ET včetně exprese ET-responzivních genů kódujících transkripční faktory. Kmen FgDON+ způsobil mimo jiné upregulaci exprese genu *LOX*, zatímco vlivem kmenu FgDON⁻ došlo na příklad k významné upregulaci exprese genu *BdPR-1*, *BdCHIT* či genu pro PR9-like peroxidase.

U výše zmíněných patogenních hub, jež byly předmětem této práce, se předpokládalo, že *F. culmorum* je závažnější patogen než *C. cereale*, nicméně v rámci tohoto experimentu byl pozorován opačný efekt. To dokazuje vyšší míra upregulace exprese u řady testovaných genů, ale také výsledky vizuálního zhodnocení intenzity poškození rostlin, jelikož průměrné poškození u rostlin napadených *C. cereale* bylo 100 %. Jak již bylo zmíněno, jedním z důvodů může být zvolený způsob inokulace rostlin *B. distachyon* (prostřednictvím kořenů), vzhledem k tomu, že *C. cereale* je významným kořenovým patogenem na rozdíl od *F. culmorum*, který napadá především nadzemní části rostlin.

V případě genů *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3* nebyl v rámci této práce prokázán statisticky významný rozdíl v jejich expresi u žádné z testovaných variant (tj. BdSi, BdMb, BdCc, BdFc). Exprese genu *BdLOX3* může být spuštěna kyselinou jasmonovou (JA marker), která hraje důležitou roli v ochraně rostlin před napadením nekrotrofními patogeny a hmyzem (Sandoya *et Buanafina*, 2014; Wasternack *et Song*, 2017; Subramanyam *et al.*, 2019). Přestože je *F. culmorum* představitelem hemibiotrofních (Petti *et al.*, 2012) a *C. cereale* nekrotrofních (Zhu *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2022) patogenů, nebyla exprese *BdLOX3*, jak již bylo naznačeno, jimi ovlivněna. Nicméně změna v expresi genu *BdLOX3* u *B. distachyon* vlivem patogenní houby *Sclerotinia homeocarpa* byla prokázána ve studii Sandoya *et Buanafina*, 2014 a také v již zmíněné studii Pasquet *et al.*, 2014 vlivem patogenu *F. graminearum*. Downregulace tohoto genu u *B. distachyon* v důsledku napadení škodlivým hmyzem (*Mayetiola destructor*) byla pozorována ve studii Subramanyam *et al.*, 2019. Geny kódující transkripční faktory WRKY pak mohou sloužit jako SA markery, přičemž se podílí na regulaci exprese řady genů zapojených do obranné reakce rostlin včetně genů pro PR proteiny (Ülker *et Somssich*, 2004; Pieterse *et al.*, 2012). Kouzai *et al.*, 2020 zjišťovali vliv patogenu *Rhizoctonia solani* na expresi SA-responzivních genů jako je *BdWRKY38* a *BdWRKY44* u linie *B. distachyon* Bd3-1 vykazující rezistenci vůči tomuto patogenu ve srovnání s náchylnou linií Bd21 (linie použita v rámci této práce). Výsledky analýzy transkriptomu *B. distachyon* získané v této studii ukázaly, že k indukci těchto genů došlo mnohem rychleji u rezistentní linie Bd3-1 než u linie Bd21.

Gen *EIN3* se řadí mezi ET-responzivní geny. V rámci studie Kouzai *et al.*, 2016 se podařilo u *B. distachyon* identifikovat jeden homolog genu *EIN3*, jehož exprese však ethylenem nebyla indukována. Studie Huang *et al.*, 2016 shrnuje poznatky o roli ET-responzivních transkripčních faktorů

(např. *ERF1*) v obranných mechanismech *A. thaliana* vůči řadě patogenů, včetně nekrotrofních hub. Nicméně doposud se žádná studie nezabývala vlivem patogenních a endofytických hub přímo na expresi *EIN3* u *B. distachyon*.

Vzhledem k tomu, že obě patogenní houby (*C. cereale* a *F. culmorum*) měly vliv na expresi genu *BdPR-1*, *BdCHIT* a *BdPOX2*, lze říct, že v obraně *B. distachyon* před napadením hrají významnou roli zejména antifungální proteiny PR-1, přičemž gen *PR-1* je primárně považován za SA marker, nicméně podle některých studií je indukován i fytohormonem JA (Kouzai *et al.*, 2016). Důležité jsou také enzymy chitinázy, jejichž exprese je stimulována chitinem, který je zároveň i jejich substrátem (Kouzai *et al.*, 2014, 2016; Bakhat *et al.*, 2023) a v neposlední řadě enzymy peroxidázy, jež se podílí na ochraně rostlin prostřednictvím zesílení buněčné stěny s cílem zabránit vstupu patogenu (Sandoya *et Buanafina*, 2014). Jelikož je *B. distachyon* modelovým organismem pro studium obilovin, lze na základě výsledků této práce předpokládat, že obdobným způsobem mohou na patogeny reagovat i příbuzné zemědělsky významné druhy (pšenice, ječmen). Díky tomu se lze následně na tyto mechanismy detailněji zaměřit.

7 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla stanovena úroveň exprese šesti genů (*BdPR-1*, *BdCHIT*, *BdPOX2*, *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3*) zapojených do obranných mechanismů modelového organismu *B. distachyon* pomocí metody RT-qPCR. Na základě analýzy genové exprese bylo zjištěno, jakým způsobem reaguje *B. distachyon* na napadení patogenními houbami (*C. cereale* a *F. culmorum*) a kolonizaci endofytickými houbami (*S. indica* a *M. bolleyi*). Vypěstované rostliny byly inokulovány příslušnými houbami prostřednictvím kořenů a exprese genů byla měřena ve vzorcích odebraných tři následující dny po inokulaci.

Napadení rostliny *B. distachyon* patogeny *C. cereale* a *F. culmorum* se projevilo zvýšenou expresí genů *BdPR-1*, *BdCHIT* a *BdPOX2*. V případě exprese genů *BdPR-1* a *BdCHIT* bylo navíc prokázáno, že ve srovnání s endofyty, došlo k upregulaci exprese ve vyšší míře vlivem patogenů. Lze tedy říct, že v obraně rostlin *B. distachyon* před patogenními houbami jsou zapojeny zejména antifungální proteiny PR-1 a také enzymy chitinázy a peroxidázy. Exprese genů *BdCHIT* a *BdPOX2* byla ovlivněna i endofytem *M. bolleyi*. U rostlin kolonizovaných endofytem *S. indica* nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v relativní expresi u žádného z testovaných genů. V případě genů *BdLOX3*, *BdWRKY41*, *BdEIN3* nebyla úroveň exprese ovlivněna ani jedním ze studovaných organismů. Pro porovnání byl vliv jednotlivých hub posouzen i na základě vizuálního zhodnocení příznaků infekce rostlin jednotlivých variant. Z největší míry byly poškozeny rostliny napadené patogenem *C. cereale* (průměrné poškození 100 %), což bylo pravděpodobně umocněno inokulací rostlin *B. distachyon* přímo prostřednictvím kořenů. Znamky poškození vykazovaly i rostliny napadené patogenem *F. culmorum*, ale také rostliny kolonizované *M. bolleyi*. Na rozdíl od endofytu *S. indica*, byla tedy v rámci tohoto experimentu pozorována slabá patogenita *M. bolleyi*. V nejlepším stavu se nacházely rostliny kolonizované endofytem *S. indica*, u kterých nebyly pozorovány žádné známky poškození. Tudíž jak na základě výsledků analýzy genové exprese, tak vizuálního zhodnocení míry poškození rostlin, je možné předpokládat, že *S. indica* je skutečně endofyt a jeho přítomnost nemá na rostliny *B. distachyon* negativní vliv. Nicméně pro úplné potvrzení pozitivního vlivu organismu *S. indica* na růst a vývoj *B. distachyon*, včetně jeho role v obraně rostlin při napadení patogenními houbami, je potřeba provést další analýzy.

Výsledky této práce mohou přispět k pochopení podstaty mechanismů, jež se podílí na ochraně zemědělsky významných obilovin před závažnými houbovými patogeny a také vybízejí k provedení dalších analýz pro potvrzení pozitivního vlivu endofytu *S. indica* na modelový organismus *B. distachyon*, případně jeho roli v biologické ochraně rostlin.

8 LITERATURA

- Adeleke, B. S., Ayilara, M. S., Akinola, S. A., & Babalola, O. O. (2022). Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 46.
- Akinsanmi, O. A., Backhouse, D., Simpfendorfer, S., & Chakraborty, S. (2006). Genetic diversity of Australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum*. *Plant Pathology*, 55(4), 494–504.
- Akram, S., Ahmed, A., He, P., He, P., Liu, Y., Wu, Y., Munir, S., & He, Y. (2023). Uniting the Role of Endophytic Fungi against Plant Pathogens and Their Interaction. *Journal of Fungi*, 9(1), 72.
- Aldred, D., & Magan, N. (2004). Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters*, 153(1), 165–171.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. v, Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 377–390.
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J. R., & Guo, H. (2010). Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(7), 2384–2401.
- Anderson, J. P., Badruzsafari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., Maclean, D. J., Ebert, P. R., & Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(12), 3460–3479.
- Aoki, T., Ward, T. J., Kistler, H. C., & O'donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *JSM Mycotoxins*, 62(2), 91–102.
- Atia, M. A. M., Abdeldaym, E. A., Abdelsattar, M., Ibrahim, D. S. S., Saleh, I., Elwahab, M. A., Osman, G. H., Arif, I. A., & Abdelaziz, M. E. (2019). *Piriformospora indica* promotes cucumber tolerance against Root-knot nematode by modulating photosynthesis and innate responsive genes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1), 279–287.
- Ayliffe, M., Singh, D., Park, R., Moscou, M., & Pryor, T. (2013). Infection of *Brachypodium distachyon* with selected grass rust pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(8), 946–957.
- Bakhat, N., Vielba-Fernández, A., Padilla-Roji, I., Martínez-Cruz, J., Polonio, Á., Fernández-Ortuño, D., & Pérez-García, A. (2023). Suppression of Chitin-Triggered Immunity by Plant Fungal Pathogens: A Case Study of the Cucurbit Powdery Mildew Fungus *Podosphaera xanthii*. *Journal of Fungi*, 9(7), 771.
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B. D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K., Schäfer, P., & Schwarczinger, I. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, 180(2), 501–510.
- Baron, N. C., & Rigobelo, E. C. (2022). Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology*, 13(1), 39–55.
- Bateman, G. L., Murray, G., Gutteridge, R. J., & Coşlkun, H. (1998). Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat. *Annals of Applied Biology*, 132(1), 35–47.
- Beccari, G., Covarelli, L., & Nicholson, P. (2011). Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology*, 60(4), 671–684.

- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., & Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, 29(1), 23–32.
- Bleša, D., Matušinský, P., Sedmíková, R., & Baláž, M. (2021). The Potential of Rhizoctonia-Like Fungi for the Biological Protection of Cereals against Fungal Pathogens.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–406.
- Booker, M. A., & DeLong, A. (2015). Producing the ethylene signal: regulation and diversification of ethylene biosynthetic enzymes. *Plant Physiology*, 169(1), 42–50.
- Borowicz, V. A. (2001). Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant–pathogen relations? *Ecology*, 82(11), 3057–3068.
- Bousset, L., & Pons-Kühnemann, J. (2003). Effects of acibenzolar-S-methyl and ethirimol on the composition of a laboratory population of barley powdery mildew. *Phytopathology*, 93(3), 305–315.
- Boutrot, F., Segonzac, C., Chang, K. N., Qiao, H., Ecker, J. R., Zipfel, C., & Rathjen, J. P. (2010). Direct transcriptional control of the Arabidopsis immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14502–14507.
- Bragg, J. N., Wu, J., Gordon, S. P., Guttman, M. E., Thilmony, R., Lazo, G. R., Gu, Y. Q., & Vogel, J. P. (2012). Generation and characterization of the Western Regional Research Center Brachypodium T-DNA insertional mutant collection.
- Brotman, Y., Landau, U., Lvaro Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., Willmitzer, L., & Howlett, B. J. (2013). Trichoderma-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance.
- Buckler, E. S., Thornsberry, J. M., & Kresovich, S. (2001). Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetics Research*, 77(3), 213–218.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597–601.
- Catalán, P., Müller, J., Hasterok, R., Jenkins, G., Mur, L. A. J., Langdon, T., Betekhtin, A., Siwinska, D., Pimentel, M., & López-Alvarez, D. (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany*, 109(2), 385–405.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., & Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89(7), 1133–1144.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., & Li, X. (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(8), 2527–2540.
- Chen, L., Zhang, Z. Y., Liang, H. X., Liu, H. X., Du, L. P., Xu, H., & Xin, Z. (2008). Overexpression of *TiERF1* enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat. *Journal of Experimental Botany*, 59(15), 4195.

- Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biology*, 16, 1–10.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 289–297.
- Cohen, Y. R. (2002). β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease*, 86(5), 448–457.
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16(10), 524–531.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., & Pozo, M. J. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062–1071.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 97–119.
- Constantin, M. E., de Lamo, F. J., Vlieger, B. v, Rep, M., & Takken, F. L. W. (2019). Endophyte-mediated resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* is independent of ET, JA, and SA. *Frontiers in Plant Science*, 10, 979.
- Cook, R. J. (1980). Fusarium foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 64(12), 1061–1066.
- Cord-Landwehr, S., Melcher, R. L. J., Kolkenbrock, S., & Moerschbacher, B. M. (2016). A chitin deacetylase from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. efficiently inactivates the elicitor activity of chitin oligomers in rice cells. *Scientific Reports*, 6(1), 38018.
- Dalmais, M., Antelme, S., Ho-Yue-Kuang, S., Wang, Y., Darracq, O., d'Yvoire, M. B., Cezard, L., Légée, F., Blondet, E., & Oria, N. (2013). A TILLING platform for functional genomics in *Brachypodium distachyon*. *PLoS One*, 8(6), e65503.
- David, A. S., Haridas S., LaButti K., Lim J., Lipzen A., Wang M., Barry K., Grigoriev I. V., Spatafora J. W., May G. (2016)a: Draft genome sequence of *Microdochium bolleyi*, a dark septate fungal endophyte of beach grass. *Genome Announcements* 4: e00270–16.
- David, A. S., Seabloom, E. W., May, G. (2016)b: Plant host species and geographic distance affect the structure of aboveground fungal symbiont communities, and environmental filtering affects belowground communities in a coastal dune ecosystem. *Microbial Ecology* 71: 912–926.
- De Hoog, G. S., & Hermanides-Nijhof, E. J. (1977). Survey of the black yeasts and allied fungi. *Stud Mycol*, 15, 178–223.
- de Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*, 33(2), 133–148.
- de Vos, M., van Zaanen, W., Koornneef, A., Korzelius, J. P., Dicke, M., van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2006). Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142(1), 352–363.
- de Waard, M. A., Georgopoulos, S. G., Hollomon, D. W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. N., & Schwinn, F. J. (1993). Chemical control of plant diseases: Problems and prospects. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 403–421.

- Delporte, M., Legrand, G., Hilbert, J.-L., & Gagneul, D. (2015). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 651.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4), 227–230.
- Deshmukh, S. D., & Kogel, K.-H. (2007). *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*/Piriformospora indica schützt Gerste vor der von Fusarium graminearum verursachten Wurzelfäule. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 263–268.
- Deshmukh, S., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., & Kogel, K.-H. (2006). The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18450–18457.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., & Fobert, P. R. (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell*, 12(2), 279–290.
- Dolgikh, V. A., Pukhovaya, E. M., & Zemlyanskaya, E. v. (2019). Shaping ethylene response: the role of EIN3/EIL1 transcription factors. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1030.
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., Fitt, G. P., Sewelam, N., Schenk, P. M., & Manners, J. M. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(7), 2225–2245.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 547–552.
- Draper, J., Mur, L. A. J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G. C., Bablak, P., Hasterok, R., & Routledge, A. P. M. (2001). *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology*, 127(4), 1539–1555.
- Duczek, L. J. (1997). Biological control of common root rot in barley by *Idriella bolleyi*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19(4), 402–405.
- Edreva, A., & Kostoff, D. (2004). A novel strategy for plant protection: Induced resistance.
- Eifler, J., Martinelli, E., Santonico, M., Capuano, R., Schild, D., & di Natale, C. (2011). Differential detection of potentially hazardous *Fusarium* species in wheat grains by an electronic nose. *PloS One*, 6(6), e21026.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., & Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5(5), 199–206.
- Fan, W., & Dong, X. (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(6), 1377–1389.
- Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., Gong, Y., Xin, Y., Zhu, Z., & Wang, Y. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(52), 13834–13839.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., & Franco-Zorrilla, J. M. (2011). The Arabidopsis bHLH

- transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701–715.
- Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 103–112.
- Fitzgerald, T. L., Powell, J. J., Stiller, J., Weese, T. L., Abe, T., Zhao, G., Jia, J., McIntyre, C. L., Li, Z., & Manners, J. M. (2015). An assessment of heavy ion irradiation mutagenesis for reverse genetics in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One*, 10(2), e0117369.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., & Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 344–350.
- Fontana, D. C., de Paula, S., Torres, A. G., de Souza, V. H. M., Pascholati, S. F., Schmidt, D., & Dourado Neto, D. (2021). Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. *Pathogens*, 10(5), 570.
- Franken, P. (2012). The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1455–1464.
- Freeman, B., & Beattie, G. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores.
- Gagne, J. M., Smalle, J., Gingerich, D. J., Walker, J. M., Yoo, S.-D., Yanagisawa, S., & Vierstra, R. D. (2004). *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), 6803–6808.
- Galindo-Solís, J. M., & Fernández, F. J. (2022). Endophytic fungal terpenoids: Natural role and bioactivities. *Microorganisms*, 10(2), 339.
- Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., & Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *The Plant Journal*, 89(3), 502–509.
- Garvin, D. F., Gu, Y., Hasterok, R., Hazen, S. P., Jenkins, G., Mockler, T. C., Mur, L. A. J., & Vogel, J. P. (2008). Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Science*, 48, S-69.
- Gianinazzi, S., Martin, C., & Vallee, J. C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanti*: Apparition de nouvelles macromolécules lors de la repression de la synthèse viral. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences Paris*, 270, 2383–2386.
- Gill, S. S., Gill, R., Trivedi, D. K., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Ansari, M. W., Ansari, A. A., Johri, A. K., Prasad, R., & Pereira, E. (2016). *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 332.
- Girin, T., David, L. C., Chardin, C., Sibout, R., Krapp, A., Ferrario-Méry, S., & Daniel-Vedele, F. (2014). *Brachypodium*: a promising hub between model species and cereals. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5683–5696.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227.

- Gough, C., & Cullimore, J. (2011). Lipo-chitooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. / 867 MPMI, 24(8), 867–878.
- Hamada, M. S., Yin, Y., Chen, H., & Ma, Z. (2011). The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat. *Pest Management Science*, 67(11), 1411–1419.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., & Javed, S. (2013). Chitinases: an update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 5(1), 21.
- Harrach, B. D., Baltruschat, H., Barna, B., Fodor, J., & Kogel, K.-H. (2013). The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 599–605.
- Hernández-Restrepo, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2016). Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36(1), 57–82.
- Heřmanová, V., Barta, J., & Čurn, V. (2006). Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakterizace a možnosti využití. *Chemické Listy*, 100(7).
- Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2008). Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 303–312.
- Homdork, S., Fehrmann, H., & Beck, R. (2000). Influence of different storage conditions on the mycotoxin production and quality of fusarium-infected wheat grain. *Journal of Phytopathology*, 148(1), 7–15.
- Hong, S.-Y., Seo, J., Yang, M.-S., Xiang, F., & Park, C.-M. (2008). BMC Plant Biology Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR.
- Huang, P.-Y., Catinot, J., & Zimmerli, L. (2016). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1231–1241.
- Inglis, D. A., & Cook, R. J. (1986). Persistence of Chlamydospores of *Fusarium culmorum* in Wheat Field Soils.
- Innocenti, G., Roberti, R., Montanari, M., & Zakrisson, E. (2003). Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. *Mycological Research*, 107(4), 421–427.
- International Brachypodium Initiative, T., investigators, P., sequencing, D., assembly, P., end sequencing, B., sequencing, T., analysis, G., analysis, R., genomics, C., RNA analysis, S., annotation, M., & family analysis, gene. (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* The International Brachypodium Initiative.
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Likpa, V., Koge, K. H., & Schäfer, P. (2011). Broad-Spectrum Suppression of Innate Immunity Is Required for Colonization of *Arabidopsis* Roots by the Fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology*, 156(2), 726–740.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes—are they mycorrhizal? *Mycorrhiza*, 11, 207–211.
- Jumpponen, A. R. I., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *The New Phytologist*, 140(2), 295–310.

- Takei, Y., Mochida, K., Sakurai, T., Yoshida, T., Shinozaki, K., & Shimada, Y. (2015). Transcriptome analysis of hormone-induced gene expression in *Brachypodium distachyon*. *Scientific Reports*, 5(1), 14476.
- Kang, Z., & Buchenauer, H. (2002). Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 653–660.
- Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., Islam, R., & Pauls, K. P. (2011). Disease Resistance/Pathology/Fusarium. University of Guelph, Guelph, ON, Canada.
- Kataria, H. R., & Hoffmann, G. M. (1988). A critical review of plant pathogenic species of *Ceratobasidium* Rogers/Kritische Übersicht über pflanzenpathogene Arten der Gattung *Ceratobasidium* Rogers. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 81– 107.
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2009). Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14(7), 373–382.
- Kellogg, E. A. (2015). *Brachypodium distachyon* as a genetic model system. *Annual Review of Genetics*, 49, 1– 20.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S., & Ryals, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 439–459.
- Kirk, J. J., Deacon, J. W. (1987)a. Control of the take-all fungus by *Microdochium bolleyi*, and interactions involving *M. bolleyi*, *Phialophora graminicola* and *Periconia macrospinosa* on cereal roots. *Plant and Soil* 98: 231– 237.
- Kirk, J. J., & Deacon, J. W. (1987)b. Invasion of naturally senescing root cortices of cereal and grass seedlings by *Microdochium bolleyi*. *Plant and Soil*, 98, 239–246.
- Knudsen, I. M. B., Hockenhull, J., & Jensen, D. F. (1995). Biocontrol of seedling diseases of barley and wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana*: effects of selected fungal antagonists on growth and yield components. *Plant Pathology*, 44(3), 467–477.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 358–363.
- Kouzai, Y., Kimura, M., Yamanaka, Y., Watanabe, M., Matsui, H., Yamamoto, M., Ichinose, Y., Toyoda, K., Onda, Y., & Mochida, K. (2016). Expression profiling of marker genes responsive to the defence-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology*, 16, 1–11.
- Kouzai, Y., Mochizuki, S., Nakajima, K., Desaki, Y., Hayafune, M., Miyazaki, H., Yokotani, N., Ozawa, K., Minami, E., & Kaku, H. (2014). Targeted gene disruption of OsCERK1 reveals its indispensable role in chitin perception and involvement in the peptidoglycan response and immunity in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(9), 975–982.
- Kouzai, Y., Shimizu, M., Inoue, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Takahagi, K., Nakayama, R., Matsuura, T., Mori, I. C., Hirayama, T., Abdelsalam, S. S. H., Noutoshi, Y., & Mochida, K. (2020). BdWRKY38 is required

- for the incompatible interaction of *Brachypodium distachyon* with the necrotrophic fungus *Rhizoctonia solani*. *Plant Journal*, 104(4), 995–1008.
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54, 391–406.
- Kůdela, V. (1989): *Obecná fytopatologie*. Praha: Academia
- Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., & Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, 10(1), 71–82.
- Lawton, K. A., Potter, S. L., Uknes, S., & Ryals, J. (1994). Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent. *The Plant Cell*, 6(5), 581–588.
- Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., & Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control*, 101, 17–30.
- Lemańczyk, G., & Kwaśna, H. (2013). Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat.
- Leonard, K. J., & Bushnell, W. R. (2003). *Fusarium head blight of wheat and barley*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Leon-Reyes, A., van der Does, D., de Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., van Wees, S. C. M., Ritsema, T., & Pieterse, C. M. J. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta*, 232, 1423–1432.
- Li, C., Rudi, H., Stockinger, E. J., Cheng, H., Cao, M., Fox, S. E., Mockler, T. C., Westereng, B., Fjellheim, S., & Rognli, O. A. (2012). Comparative analyses reveal potential uses of *Brachypodium distachyon* as a model for cold stress responses in temperate grasses. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1–15.
- Li, L., Guo, N., Feng, Y., Duan, M., & Li, C. (2022). Effect of *Piriformospora indica*-induced systemic resistance and basal immunity against *Rhizoctonia cerealis* and *Fusarium graminearum* in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 13, 836940.
- Li, W., Sun, H., Deng, Y., Zhang, A., & Chen, H. (2014). The heterogeneity of the rDNA-ITS sequence and its phylogeny in *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat. *Current Genetics*, 60, 1–9.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M. J., Valle-Algarra, F. M., & Jiménez, M. (2004). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 43–54.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Saénchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(7), 1938–1950.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15(1), 165–178.
- Lowe, R. G. T., Allwood, J. W., Galster, A. M., Urban, M., Daudi, A., Canning, G., Ward, J. L., Beale, M. H., & Hammond-Kosack, K. E. (2010). A Combined 1H Nuclear Magnetic Resonance and Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Analysis to Understand the Basal Metabolism of Plant-Pathogenic *Fusarium* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(12), 1605–1618.

- Lu, H., Wei, T., Lou, H., Shu, X., & Chen, Q. (2021). A critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. *Journal of Fungi*, 7(9), 719.
- Lyons, R., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). Jasmonate biosynthesis and signaling in monocots: a comparative overview. *Plant Cell Reports*, 32(6), 815–827.
- Magan, N., Aldred, D., Mylona, K., & Lambert, R. J. W. (2010). Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Additives and Contaminants*, 27(5), 644–650.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., & Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi: Under the Aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998–2003'*, EU Project (QLK 1-CT-1998–01380), 723–730.
- Martin, R. C., Dombrowski, J. E. (2015): Isolation and identification of fungal endophytes from grasses along the Oregon coast. *American Journal of Plant Sciences* 6: 3216.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M. J., Pozo, M. J., Ton, J., van Dam, N. M., & Conrath, U. (2016). Recognizing Plant Defense Priming. *Trends in Plant Science*, 21(10), 818–822.
- Matušinsky, P., Sedláková, B., & Bleša, D. (2022). Compatible interaction of *Brachypodium distachyon* and endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *PLOS ONE*, 17(3), e0265357.
- McGrath, K. C., Dombrecht, B., Manners, J. M., Schenk, P. M., Edgar, C. I., Maclean, D. J., Scheible, W.-R., Udvardi, M. K., & Kazan, K. (2005). Repressor-and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology*, 139(2), 949–959.
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Harish, Tripathi, Y. N., Zehra, A., Marwal, A., & Upadhyay, R. S. (2020). PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *Journal of Basic Microbiology*, 60(10), 828–861.
- Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2022). Resistance to geminivirus infections: natural and induced by controlled elicitation. In *Geminivirus: Detection, Diagnosis and Management*. Elsevier, pp. 487–495.
- Memelink, J. (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry*, 70(13–14), 1560–1570.
- Miao, L., Qin, X., Gao, L., Li, Q., Li, S., He, C., Li, Y., & Yu, X. (2019). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in cucumber (*Cucumis sativus* L.), pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) and cucumber–pumpkin grafted plants. *Peer J*, 7, e6536.
- Mishina, T. E., & Zeier, J. (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 50(3), 500–513.
- Mishra, P., Singh, U., Pandey, C., Mishra, P., & Pandey, G. (2019). Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(4), 407.

- Mitsuhara, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., Ohkawa, Y., & Ohashi, Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 415–427.
- Molitor, A., Zajic, D., Voll, L. M., Pons-Kühnemann, J., Samans, B., Kogel, K. H., & Waller, F. (2011). Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 24(12), 1427–1439.
- Moore, J. W., Loake, G. J., & Spoel, S. H. (2011). Transcription dynamics in plant immunity. *The Plant Cell*, 23(8), 2809–2820.
- Mueller, M. J. (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 653–663.
- Murray, D. I. L., & Gadd, G. M. (1981). Preliminary studies on *Microdochium bolleyi* with special reference to colonization of barley. *Transactions of the British Mycological Society*, 76(3), 397–403.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., & Hirt, H. (2005). Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science*, 10(7), 339–346.
- Niu, Y., Figueroa, P., & Browse, J. (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 2143–2154.
- Nizam, S., Qiang, X., Wawra, S., Nostadt, R., Getzke, F., Schwanke, F., Dreyer, I., Langen, G., & Zuccaro, A. (2019). *Serendipita indica* E5' NT modulates extracellular nucleotide levels in the plant apoplast and affects fungal colonization. *EMBO Reports*, 20(2), e47430.
- Ors, M. E., Randoux, B., Selim, S., Siah, A., Couleaud, G., Maumené, C., Sahmer, K., Halama, P., & Reignault, P. (2018). Cultivar-dependent partial resistance and associated defence mechanisms in wheat against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology*, 67(3), 561–572.
- Ort, P. (2007): Fuzariózy-nebezpečné choroby obilnin. *Obilnářské listy* 15 (3): 68–69.
- Panda, S., Busatto, N., Hussain, K., & Kamble, A. (2019). *Piriformospora indica*-primed transcriptional reprogramming induces defense response against early blight in tomato. *Scientia Horticulturae*, 255, 209–219.
- Pasquet, J. C., Chaouch, S., Macadré, C., Balzergue, S., Huguet, S., Martin-Magniette, M. L., Bellvert, F., Deguercy, X., Thareau, V., Heintz, D., Saindrenan, P., & Dufresne, M. (2014). Differential gene expression and metabolomic analyses of *Brachypodium distachyon* infected by deoxynivalenol producing and non-producing strains of *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics*, 15(1).
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65(13), 1879–1893.
- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., Chico, J. M., Bossche, R. vanden, Sewell, J., & Gil, E. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, 464(7289), 788–791.
- Pauwels, L., & Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell*, 23(9), 3089–3100.

- Pedrotti, L., Mueller, M. J., & Waller, F. (2013). *Piriformospora indica* Root Colonization Triggers Local and Systemic Root Responses and Inhibits Secondary Colonization of Distal Roots. *PLOS ONE*, 8(7), e69352.
- Peraldi, A., Beccari, G., Steed, A., & Nicholson, P. (2011). *Brachypodium distachyon*: A new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. *BMC Plant Biology*, 11(1), 1–14.
- Petti, C., Reiber, K., Ali, S. S., Berney, M., & Doohan, F. M. (2012). Auxin as a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1–9.
- Pieterse, C. M. J., van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375.
- Pieterse, C. M., van Wees, S. C., Hoffland, E., van Pelt, J. A., & van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, 8(8), 1225–1237.
- Plett, J. M., & Martin, F. M. (2018). Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *Plant Journal*, 93(4), 729–746.
- Powell, J. J., Carere, J., Sablok, G., Fitzgerald, T. L., Stiller, J., Colgrave, M. L., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Vogel, J. P., & Henry, R. J. (2017). Transcriptome analysis of *Brachypodium* during fungal pathogen infection reveals both shared and distinct defense responses with wheat. *Scientific Reports*, 7(1), 17212.
- Pozo, M. J., van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2004). Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23, 211–222.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., de Vos, M., Pieterse, C. M. J., & Memelink, J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, 147(3), 1347–1357.
- Punja, Z. K., & Utkhede, R. S. (2003). Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 21(9), 400–407.
- Rabiey, M., Ullah, I., Shaw, L. J., & Shaw, M. W. (2017). Potential ecological effects of *Piriformospora indica*, a possible biocontrol agent, in UK agricultural systems.
- Radková, A. (2023): *Expres genů zapojených do obrany rostlin proti patogenům u Brachypodium distachyon*. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Reglinski, T., Havis, N., Rees, H. J., & de Jong, H. (2023). The practical role of induced resistance for crop protection. *Phytopathology®*, 113(4), 719–731.
- Reinecke, P. (1978): *Microdochium bolleyi* at the stem base of cereals / *Microdochium bolleyi* an der Halmbasis von Getreide. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection* 85: 679–685.
- Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Microbiology*, 136(9), 1771–1778.

- Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14(3), 340–358.
- Rothen, C., Miranda, V., Fracchia, S., Godeas, A., & Rodríguez, A. (2018). *Microdochium Bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Physiological characterization and structural features of its association with wheat. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 53(2), 1–10.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5), 247–258.
- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., & Somssich, I. E. (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO Journal*, 15(20), 5690–5700.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8(10), 1809.
- Sabol, P., Pilátová J. (2020). Jak funguje imunita rostlin? *Živa*, 1/2020, 17–19.
- Sahai, A. S., & Manocha, M. S. (1993). Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host—parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), 317–338.
- Saleem, S., Sekara, A., & Pokluda, R. (2022). *Serendipita indica*—A Review from Agricultural Point of View. *Plants* 2022, Vol. 11, Page 3417, 11(24), 3417.
- Salt, G. A. (1976). A survey of fungi in cereal roots at rothamsted, woburn and saxmundham 1970-75.
- Sandoya, G. v., & de Oliveira Buanafina, M. M. (2014). Differential responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to insect and fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 53–64.
- Sato, M., Tsuda, K., Wang, L., Coller, J., Watanabe, Y., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2010). Network modeling reveals prevalent negative regulatory relationships between signaling sectors in Arabidopsis immune signaling. *PLoS Pathogens*, 6(7), e1001011.
- Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., & Migheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: Causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 323–341.
- Scholthof, K. B. G., Irigoyen, S., Catalan, P., & Mandadi, K. K. (2018). *Brachypodium*: A Monocot Grass Model Genus for Plant Biology. *The Plant Cell*, 30(8), 1673–1694.
- Šečić, E., Zanini, S., Wibberg, D., Jelonek, L., Busche, T., Kalinowski, J., Nasfi, S., Thielmann, J., Imani, J., Steinbrenner, J., & Kogel, K.-H. (2021). A novel plant-fungal association reveals fundamental sRNA and gene expression reprogramming at the onset of symbiosis. *BMC Biology*, 19(1), 171.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2883–2894.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., Lee, J. S., & Choi, Y. do. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4788–4793.
- Shadmani, L., Jamali, S., & Fatemi, A. (2018). Biocontrol activity of endophytic fungus of barley, *Microdochium bolleyi*, against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Mycologia Iranica*, 5(1), 7–14.

- Shahollari, B., Varma, A., & Oelmüller, R. (2005). Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *Journal of Plant Physiology*, 162(8), 945–958.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., & Browse, J. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400–405.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A., & Oelmüller, R. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26241–26247.
- Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V. M., Nitz, I., Varma, A., Grundler, F. M., & Oelmüller, R. (2008). PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *The Plant Journal*, 54(3), 428–439.
- Shi, Y., Tian, S., Hou, L., Huang, X., Zhang, X., Guo, H., & Yang, S. (2012). Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(6), 2578–2595.
- Singhal, U., Prasad, R., & Varma, A. (2017). *Piriformospora indica* (*Serendipita indica*): The novel symbiont. *Mycorrhiza-Function, Diversity, State of the Art*, 349–364.
- Slocum, R. D., Kaur-Sawhney, R., & Galston, A. W. (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 235(2), 283–303.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*, 12(23), 3703–3714.
- Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., & Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137(5), 860–872.
- Sprague, R. (1948). Gloeosporium decay in Gramineae. *Phytopathology*, 38 (2).
- Staswick, P. E., & Tiriyaki, I. (2004). The Oxylin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in *Arabidopsis* W.
- Su, Q., Rong, W., & Zhang, Z. (2022). The Pathogen-Induced MATE Gene *TaPIMAI* Is Required for Defense Responses to *Rhizoctonia cerealis* in Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6).
- Subramanyam, S., Nemacheck, J. A., Hargarten, A. M., Sardesai, N., Schemerhorn, B. J., & Williams, C. E. (2019). Multiple molecular defense strategies in *Brachypodium distachyon* surmount Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae-induced susceptibility for plant survival. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–18.

- Sun, C., Shao, Y., Vahabi, K., Lu, J., Bhattacharya, S., Dong, S., Yeh, K.-W., Sherameti, I., Lou, B., & Baldwin, I. T. (2014). The beneficial fungus *Piriformospora indica* protects *Arabidopsis* from *Verticillium dahliae* infection by downregulation plant defense responses. *BMC Plant Biology*, 14, 1–16.
- Suryanarayanan, T., Rajulu, G., & Vidal, S. (2016). Biological Control Through Fungal Endophytes: Gaps In Knowledge Hindering Success. *Current Biotechnology*, 05(999), 1–1.
- Štajner, N., Cregeen, S., & Javornik, B. (2013). Evaluation of reference genes for RT-qPCR expression studies in hop (*Humulus lupulus* L.) during infection with vascular pathogen *Verticillium albo-atrum*. *PLoS One*, 8(7), e68228.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., & Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321(5891), 952–956.
- Tamaoki, D., Seo, S., Yamada, S., Kano, A., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2013). Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6), e24260.
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U. S., Sugiura, Y., & Ueno, Y. (1988). Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 979–983.
- Theis, T., & Stahl, U. (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61, 437–455.
- Thole, V., Worland, B., Wright, J., Bevan, M. W., & Vain, P. (2010). Distribution and characterization of more than 1000 T-DNA tags in the genome of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Plant Biotechnology Journal*, 8(6), 734–747.
- Tomaso-Peterson, M., & Trevathan, L. E. (2007). Characterization of Rhizoctonia-like fungi isolated from agronomic crops and turfgrasses in Mississippi. *Plant Disease*, 91(3), 260–265.
- Tranier, M.-S., Pognant-Gros, J., Quiroz, R. D. la C., González, C. N. A., Mateille, T., & Roussos, S. (2014). Commercial biological control agents targeted against plant-parasitic root-knot nematodes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57, 831–841.
- Tripathi, P., Rabara, R. C., Langum, T. J., Boken, A. K., Rushton, D. L., Boomsma, D. D., Rinerson, C. I., Rabara, J., Reese, R. N., & Chen, X. (2012). The WRKY transcription factor family in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics*, 13, 1–20.
- Ülker, B., & Somssich, I. E. (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 491–498.
- Unnikumar, K. R., Sree, K. S., & Varma, A. (2013). *Piriformospora indica*: a versatile root endophytic symbiont. *Symbiosis*, 60, 107–113.
- van Loon, L. C. (1985). Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 4, 111–116.
- van Loon, L. C., Bakker, P., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 453–483.
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–162.

- van Loon, L. C., & van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40(2), 199–211.
- Varma, A., Singh, A., Sudha, Sahay, N. S., Sharma, J., Roy, A., Kumari, M., Rana, D., Thakran, S., & Deka, D. (2001). *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. *Fungal Associations*, 125–150.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B., & Franken, P. (1999). *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2741–2744.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütchorn, B., & Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90(5), 896–903.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177–206.
- Vogel, J. P., Tuna, M., Budak, H., Huo, N., Gu, Y. Q., & Steinwand, M. A. (2009). Development of SSR markers and analysis of diversity in Turkish populations of *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1–11.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.-P., & Ryals, J. A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 3(10), 1085–1094.
- Wasternack, C., & Song, S. (2017). Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303–1321.
- Watanabe, T. (1979). Rice blast controlling agent of benzisothiazole analogs III. Effects of probenazole (Oryzmate®) on rice plants with reference to controlling rice blast. *Journal of Pesticide Science*, 4, 53–59.
- Wawra, S., Fesel, P., Widmer, H., Timm, M., Seibel, J., Leson, L., Kessler, L., Nostadt, R., Hilbert, M., & Langen, G. (2016). The fungal-specific β -glucan-binding lectin FGB1 alters cell-wall composition and suppresses glucan-triggered immunity in plants. *Nature Communications*, 7(1), 13188.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F. M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H. da, & Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6154), 118–123.
- Weigel, R. R., Pfitzner, U. M., & Gatz, C. (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(4), 1279–1291.
- Weiss, M., Selosse, M.-A., Rexer, K.-H., Urban, A., & Oberwinkler, F. (2004). Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycological Research*, 108(9), 1003–1010.

- Wiese, J., Bagy, M. M. K., & Schubert, S. (2003). Soil properties, but not plant nutrients (N, P, K) interact with chemically induced resistance against powdery mildew in barley. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(3), 379–384.
- Yadav, V., Kumar, M., Deep, D. K., Kumar, H., Sharma, R., Tripathi, T., Tuteja, N., Saxena, A. K., & Johri, A. K. (2010). A phosphate transporter from the root endophytic fungus *Piriformospora indica* plays a role in phosphate transport to the host plant. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26532–26544.
- Yamada, S., Kano, A., Tamaoki, D., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K., & Gomi, K. (2012). Involvement of OsJAZ8 in jasmonate-induced resistance to bacterial blight in rice. *Plant and Cell Physiology*, 53(12), 2060–2072.
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., & Shao, D. (2019). Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3327–3340.
- Yang, J., Klopper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1–4.
- Yun, D.-J., Ibeas, J. I., Lee, H., Coca, M. A., Narasimhan, M. L., Uesono, Y., Hasegawa, P. M., Pardo, J. M., & Bressan, R. A. (1998). Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. *Molecular Cell*, 1(6), 807–817.
- Yun, D.-J., Zhao, Y., Pardo, J. M., Narasimhan, M. L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (1997). Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 7082–7087.
- Zhang, L., Li, Z., Quan, R., Li, G., Wang, R., & Huang, R. (2011). An AP2 domain-containing gene, ESE1, targeted by the ethylene signaling component EIN3 is important for the salt response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 157(2), 854–865.
- Zhu, G., Gao, C., Wu, C., Li, M., Xu, J.-R., Liu, H., & Wang, Q. (2021). Comparative transcriptome analysis reveals distinct gene expression profiles in *Brachypodium distachyon* infected by two fungal pathogens. *BMC Plant Biology*, 21(1), 304.
- Zhu, X., Lu, C., Du, L., Ye, X., Liu, X., Coules, A., & Zhang, Z. (2017). The wheat NB-LRR gene TaRCR1 is required for host defence response to the necrotrophic fungal pathogen *Rhizoctonia cerealis*. *Plant Biotechnology Journal*, 15(6), 674–687.
- Zhu, X., Qi, L., Liu, X., Cai, S., Xu, H., Huang, R., Li, J., Wei, X., & Zhang, Z. (2014). The wheat ethylene response factor transcription factor pathogen-induced ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses. *Plant Physiology*, 164(3), 1499–1514.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., Jiang, Z., Kim, J.-M., To, T. K., Li, W., & Zhang, X. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), 12539–12544.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345–351.
- Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Plants encounter a myriad of microorganisms, particularly at the root-soil interface, that can Plant signalling in symbiosis and immunity.

Internetové zdroje:

Locus: AT4G11070, TAIR (The Arabidopsis Information Resource) [online] [navštíveno dne 26. 3. 2024]

Dostupné z: <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=at4g11070>

Škodlivé organismy – choroby – Lemovaná stébelná skvrnitost obilnin, Rostlinolékařský portál, eagri.cz [online] [navštíveno dne 26. 3. 2024]

Dostupné z:

https://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%221d717fd390a3896993e5fa66fb1d22ab%22#r1p|so|choroby|detail:1d717fd390a3896993e5fa66fb1d21f2|popis