

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Expresse genů zapojených do obrany rostlin proti
patogenům u *Brachypodium distachyon***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Andrea Radková
Studijní program:	R210548 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 21.04.2023

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Mgr. Pavlu Matušinskému, Ph.D., za jeho věnovaný čas, ochotu, cenné rady, přátelský přístup, odbornou pomoc a trpělivost v laboratoři, ale i při sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat členům katedry botaniky za cenné rady a příjemné pracovní prostředí.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Andrea Radková
Název práce	Exprese genů zapojených do obrany rostlin proti patogenům u <i>Brachypodium distachyon</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra botaniky
Vedoucí práce	Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Fusarium culmorum je patogenní houba, která je původcem onemocnění růžovění klasů či krčkové hniloby u obilovin. V současné době se výzkum zabývá hledáním alternativní biologické ochrany, která by mohla pomoci zmírnit příznaky tohoto patogena a celkově tak zvýšit výnos obilovin. Jako potenciální biologická ochrana se momentálně zkoumají endofytické houby, které produkcí svých metabolitů a pomocí dalších mechanismů snižují patogenní účinky a příznivě ovlivňují vývoj svého hostitele.

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování vlivu endofytického organismu *Microdochium bolleyi* na intenzitu napadení patogenní houbou *F. culmorum* u modelové rostliny *Brachypodium distachyon*. Pomocí jedné z metod molekulární biologie qPCR byl sledován vliv těchto organismů na genovou expresi u 10 markerových genů (*BdPR1-5*; *BdPR2*; *BdPR6*; *BdPR9*; *BdPR10*; *BdPOX2*; *BdLOX3*; *BdChitinase1*; *BdWRKY41* and *BdTCP*), které se podílí na obraně u *B. distachyon*. U 4 z nich nebyla genová exprese ovlivněna žádným ze zkoumaných organismů. Vliv *M. bolleyi* na mírnění symptomů onemocnění způsobené *F. culmorum* se potvrdil a jeho přítomnost v kořenovém systému *B. distachyon* pozitivně ovlivnila celkový vývoj rostliny. Získané výsledky by v budoucnu mohly posloužit jako zdroj při hledání nové biologické ochrany proti *F. culmorum*.

Klíčová slova	<i>Brachypodium distachyon</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Microdochium bolleyi</i> , obrana rostlin, qPCR
Počet stran	80
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Andrea Radková
Title	Expression of genes involved in plant defense against pathogens in <i>Brachypodium distachyon</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Botany
Supervisor	Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Fusarium culmorum is a pathogenic fungus, the causal agent of Fusarium head blight or Fusarium crown rot disease in cereals. Research is currently focused on alternative biological control that could help alleviate the symptoms of this pathogen and increase the overall yield of cereals. Endophytic fungi are currently being investigated as potential biological control agents that reduce the pathogenic effects by producing their metabolites and, through other mechanisms, positively influencing the development of their host.

This thesis aims to investigate the effect of the endophytic organism *Microdochium bolleyi* on the intensity of the attack by the pathogenic fungus *F. culmorum* in the model plant *Brachypodium distachyon*. Using one of the molecular biology qPCR methods, the effect of these organisms on gene expression was investigated for 10 marker genes (*BdPR1-5*; *BdPR2*; *BdPR6*; *BdPR9*; *BdPR10*; *BdPOX2*; *BdLOX3*; *BdChitinase1*; *BdWRKY41* and *BdTCP*) involved in defence in *B. distachyon*. In 4 of these, gene expression was not affected by any of the organisms studied. The effect of *M. bolleyi* in alleviating the symptoms of the disease caused by *F. culmorum* was confirmed and its presence in the root system of *B. distachyon* positively affected the overall development of the plant. The results obtained could serve as a resource in the future in the search for new biological control against *F. culmorum*.

Keywords	<i>Brachypodium distachyon</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Microdochium bolleyi</i> , plant defense, qPCR
Number of pages	80
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Modelový organismus <i>Brachypodium distachyon</i>	2
2.1.1	<i>Brachypodium distachyon</i> jako model pro studium chorob obilovin.....	3
2.2	Rod <i>Fusarium</i>	4
2.2.1	<i>Fusarium culmorum</i>	5
2.2.2	Interakce <i>Brachypodium distachyon</i> – rod <i>Fusarium</i>	6
2.3	Endofytické houby	7
2.3.1	Využití endofytických hub k ochraně rostlin	8
2.3.1.1	<i>Microdochium bolleyi</i>	8
2.4	Mechanismy signalizace napadení patogenem v rostlinné buňce.....	10
2.4.1	Imunita u rostlin	10
2.4.1.1	PAMP aktivovaná imunita	11
2.4.1.2	Efektorem spuštěná imunita.....	11
2.4.2	Systémově získaná rezistence	12
2.5	Role rostlinných hormonů v obranných reakcích rostlin.....	14
2.5.1	Biosyntéza a signalizace kyseliny salicylové.....	14
2.5.1.1	Gen <i>NPR1</i>	15
2.5.1.2	Gen <i>WRKY</i>	17
2.5.2	Biosyntéza a signalizace kyseliny jasmonové.....	17
2.5.2.1	Lipoxygenasy	20
2.5.3	Biosyntéza a signalizace ethylenu	21
2.5.4	Geny spojené s patogenezí	23
2.5.4.1	Gen <i>PR-1</i>	24
2.5.4.2	Gen <i>PR-2</i>	25
2.5.4.3	Gen <i>PR-6</i>	25
2.5.4.4	Gen <i>PR-9</i>	25
2.5.4.5	Gen <i>PR-10</i>	25
2.5.4.6	Rostlinné chitinasy u <i>B. distachyon</i>	26
2.5.4.7	Rostlinné peroxidasy u <i>B. distachyon</i>	26
2.5.5	Transkripční faktor TCP	27
3	Experimentální část	28
3.1	Materiál.....	28
3.1.1	Biologický materiál	28
3.1.2	Chemikálie	28
3.1.3	Média a roztoky	28
3.1.4	Primery.....	29
3.1.5	Použité soupravy	29
3.1.6	Přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky	30

3.1.7	Software pro vyhodnocení výsledků	30
3.2	Metody	31
3.2.1.1	Příprava <i>M. bolleyi</i> k inokulaci obilak <i>B. distachyon</i>	31
3.2.1.2	Příprava <i>F. culmorum</i> k infekci listů	31
3.2.2	Založení experimentu ve skleníku.....	32
3.2.2.1	Výsev semen <i>B. distachyon</i> a jejich inokulace endofytickým organismem <i>M. bolleyi</i>	32
3.2.2.2	Infekce listů <i>B. distachyon</i> patogenním organismem.....	33
	<i>F. culmorum</i>	33
3.2.2.2.1	Odběr lisů <i>B. distachyon</i> pro izolaci RNA	34
3.2.2.2.2	Odběr listů <i>B. distachyon</i> pro vyhodnocení symptomů onemocnění	34
3.2.2.2.3	Odběr vzorků <i>B. distachyon</i>	35
3.2.2.3	Světelná mikroskopie.....	36
3.2.2.4	Izolace RNA pomocí RNeasy Plant Mini Kitu	36
3.2.2.5	Příprava cDNA z vyizolované RNA	37
3.2.2.6	Kvantitativní real-time PCR (qPCR).....	38
4	Výsledky	40
4.1	Vliv endofytu <i>M. bolleyi</i> na mírnění symptomů onemocnění	40
4.1.1	Statistické vyhodnocení symptomů onemocnění na listech <i>B. distachyon</i>	41
4.2	Vliv endofytu <i>M. bolleyi</i> na růstovou fázi <i>B. distachyon</i>	42
4.3	Ověření úspěšné inokulace <i>M. bolleyi</i> pomocí mikroskopování	43
4.4	Analýza exprese markerových genů zapojených do obrany rostlin	43
4.4.1	Exprese genu <i>BdPR1-5</i>	44
4.4.2	Exprese genu <i>BdPR2</i>	45
4.4.3	Exprese genu <i>BdPR6</i>	46
4.4.4	Exprese genu <i>BdPR9</i>	47
4.4.5	Exprese genu <i>BdPR10</i>	48
4.4.6	Exprese genu <i>BdPOX2</i>	49
4.4.7	Exprese genu <i>BdLOX3</i>	50
4.4.8	Exprese genu <i>BdChitinase1</i>	51
4.4.9	Exprese genu <i>BdWRKY41</i>	52
4.4.10	Exprese genu <i>BdTCP</i>	53
5	Diskuse	55
6	Závěr	59
7	Literatura	60
8	Seznam použitých zkratk.....	70

CÍLE PRÁCE

- zpracování literární rešerše na témata:
 - modelový organismus *B. distachyon*, patogenní houba *F. culmorum*, *M. bolleyi* a jeho endofytický vliv
 - imunitní systém u rostlin, signální dráhy fytohormonů a exprese jejich významných genů zapojených do obrany rostlin proti patogenům
- sledování exprese genů zapojených do obrany rostlin u *B. distachyon* po inokulaci endofytickou houbou *M. bolleyi* a infekci houbovým patogenem *F. culmorum*
 - sledování vlivu patogena *F. culmorum* na změnu genové exprese
 - sledování vlivu endofyta *M. bolleyi* na změnu genové exprese
 - sledování vlivu endofyta *M. bolleyi* v kombinaci s patogenem *F. culmorum* na změnu genové exprese
- ověření hypotézy, že přítomnost endofytu *M. bolleyi* ovlivňuje symptomy onemocnění způsobené patogenními houbami, konkrétně *F. culmorum*

1 ÚVOD

Brachypodium distachyon je malá jednoděložná rostlina z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), která se především využívá jako modelový organismus pro studium trav a obilovin. Jedná se o rostlinu, která má malý diploidní genom, krátký životní cyklus a malý vzrůst.

V současné době je jedním z hlavních problémů při pěstování plodin napadení patogenními organismy, kterými jsou viry, bakterie či houby. Jedním z nejzávažnějších patogenů pšenice a dalších obilovin je *Fusarium culmorum*, vláknitá houba, která je původcem onemocnění růžovění klasů, krčkové hniloby a dalších. Během těchto onemocnění navíc dochází k produkci mykotoxinů, které jsou nebezpečné jak pro člověka, tak pro zvířata. Proti této chorobě prozatím chybí účinná biologická ochrana, proto se ve velké míře používají fungicidy, které jsou jednak nákladné, ale také mají negativní dopad na životní prostředí. Jako potenciální biologická ochrana by v budoucnu mohly sloužit endofytické organismy, které produkcí svých sekundárních metabolitů a prostřednictvím dalších mechanismů, eliminují účinek některých patogenů, ale také příznivě ovlivňují vývoj svého hostitele. Pro experimentální část mé diplomové práce byla vybrána endofytická houba *Microdochium bolleyi*, řadící se mezi kořenové endofyty, kteří se označují jako tzv. dark septate endophytes (DSE). *Microdochium bolleyi* je častým a úspěšným endofytem kolonizující zejména trávy a obiloviny.

Obranná reakce rostlin je založena na souhrnu molekulárních dějů, které zahrnují produkci signálních molekul včetně fytohormonů. Pokud je rostlina infikovaná dochází ke změnám jejich hladiny, což může posloužit při sledování exprese genů, které jsou jednotlivými hormony rostlin indukovány. U modelových rostlin jako je *Brachypodium distachyon* se jako markery používají geny, které jsou zapojeny do biosyntézy či signální dráhy fytohormonů. V této práci bude pro sledování genové exprese využita jedna ze základních molekulárních metod kvantitativní real-time PCR (qPCR). Získané výsledky by mohly v budoucnu posloužit jako zdroj při hledání nových biologických ochran u trav a obilovin vůči patogennímu druhu *Fusarium culmorum*.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

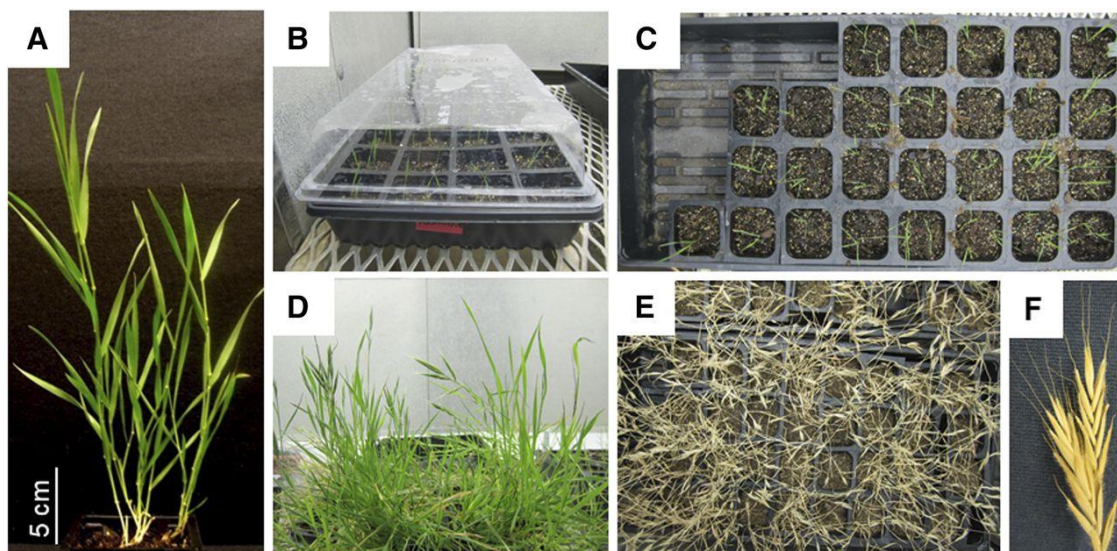
2.1 Modelový organismus *Brachypodium distachyon*

Brachypodium distachyon (L.) P. Beauv. (Válečka dvouřadá) (*Bd*) je jednoděložná rostlina mírného pásma, která se řadí do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Tento malý rostlinný druh pochází z Blízkého východu a jižní Evropy, ale dobře se usadil i v mírných oblastech Austrálie, Asie a Ameriky (Vogel a Bragg, 2009).

Čeleď *Poaceae* zahrnuje několik podčeledí jako jsou *Pooideae*, kde se kromě *Brachypodium* řadí oves (*Avena sativa*), pšenice (*Triticum aestivum* L.) a ječmen (*Hordeum vulgare* L.). Další podčeledí jsou *Ehrhartoideae*, kde je zařazena rýže (*Oryza sativa*) a *Panicoideae*, kde je zařazeno proso (*Panicum miliaceum*), cukrová třtina (*Saccharum officinarum*) nebo kukuřice (*Zea mays*) (Catalán *et al.*, 1997; Kellogg, 2001). Podčeleď *Pooideae* zahrnuje kmen *Brachypodieae*, jejímž jediným členem je právě rod *Brachypodium*, který je sesterský s kmenem *Triticeae* (pšenice, ječmen) (patřící rovněž do podčeledi *Pooideae*), proto rod *Brachypodium* sdílí s pšenicí a ječmenem blízkou sekvenční homologii a řadu morfologických znaků (Khan & Stace, 1999; Mochida & Shinozaki, 2013).

Ačkoliv má *B. distachyon* velmi malý zemědělský význam, přináší několik výhod jako experimentální modelový organismus pro pochopení genetické, buněčné a molekulární biologie jednoděložných travních plodin a obilovin mírného pásma. Proto byl v roce 2001 navržen jako nový modelový systém (Draper *et al.*, 2001).

B. distachyon má doposud nejjednodušší genom, který byl u trav popsán, kompletní osekvenování inbrední linie Bd21 bylo provedeno v roce 2010. Diploidní genom má velikost přibližně 272 Mbp, obsahuje 5 chromozomů a cca 25 000 sekvencí kódujících proteiny (The International Brachypodium Initiative, 2010). K dispozici je i databáze celé délky cDNA (FLcDNA) (Mochida *et al.*, 2013). Další výhodou *B. distachyon* je, že se jedná o samosprašnou jednoletou rostlinu s krátkým životním cyklem (kolem 8-10 týdnů), což umožňuje rychle se množit a geneticky upravovat (Obr. 1). Jedná se o rostlinu nízkého vzrůstu, která může dosahovat výšky kolem 30 cm a vyžaduje tak jednoduché podmínky pro pěstování. Klásek obsahuje typicky kolem 10-12 semen a obilka má velikost cca 8 mm x 2 mm (Draper *et al.*, 2001; Garvin *et al.*, 2008).



Obr. 1 Životní cyklus *Brachypodium distachyon*. **A)** Zralý *B. distachyon* (Bd21-3) ~6 týdnů starý **B)** Sedmidenní chladem ošetřená semena Bd21-3, která klíčí v miskách **C)** Nezakryté misky obsahující 2-3 rostliny v květináči v rané vegetativní fázi ~2 týdny po výsadbě **D)** Zralé rostliny Bd21-3 s květenstvím ~8 týdnů po výsadbě **E)** Senescentní rostliny, připravené ke sklizni ~12 týdnů po výsadbě **F)** Záběr na sušené květenství, semena lze oddělit od laty, vysušit a skladovat při 4 °C (upraveno podle Scholthof *et al.*, 2018).

2.1.1 *Brachypodium distachyon* jako model pro studium chorob obilovin

Obiloviny jsou pěstovány především pro svá semena, která se využívají k výrobě potravin jako jsou mouka, škrob a slad pro výrobu alkoholických nápojů, ale používají se také jako krmivo pro zvířata. V poslední době vzrostl zájem o jejich odpadní materiál, tj. sláma a odpad ze zpracování, který může být využíván jako alternativní zdroj energie (van Dam *et al.*, 2007) sloužící pro výrobu „biopaliv“ (Fike *et al.*, 2006). Z důvodu onemocnění obilovin dochází každoročně ke snižování jejich výnosu, přičemž ztráty tvoří cca 10 % z celkové produkce na celém světě (Oerke, 2006). Proto by studium molekulárního základu interakce hostitel-patogen mohlo přinést lepší porozumění mechanismů rezistence vůči chorobám u různých druhů obilovin a vést tak k celkovému zvýšení obranyschopnosti rostlin (Fitzgerald *et al.*, 2015).

Bylo prokázáno, že je *Bd* hostitelem mnoha významných biotrofních, hemibiotrofních či nekrotrofních houbových patogenů, jež běžně napadají obiloviny a trávy. Mezi zástupce patří např. *Magnaporthe oryzae* způsobující onemocnění rýže (Kawahara *et al.*, 2012), *Rhizoctonia solani* (Sandoya & de Oliveira Buanafina, 2014), *Sclerotinia homoeocarpa* (Sandoya & de Oliveira Buanafina, 2014) či *Claviceps purpurea* (Kind *et al.*, 2018). Peraldi *et al.* (2011) také prokázali náchylnost k *Fusarium graminearum* (*Fg*) a *Fusarium culmorum* (*Fc*), což jsou původci růžovění klasů u pšenice (FHB; *Fusarium*

head blight). Kromě houbových patogenů je *Bd* také citlivý na některé bakteriální patogeny, tj. *Xanthomonas translucens* (Fitzgerald *et al.*, 2015), viry (Mandadi *et al.*, 2014) či oomycety (Sandoya & de Oliveira Buanafina, 2014).

2.2 Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* (srpovnička) je rozmanitá skupina vláknitých hub, patřící do řádu *Hypocreales*, čeledi *Nectriaceae*, která se řadí mezi významné celosvětové patogeny napadající zemědělské a hospodářské plodiny. Tento rod zahrnuje nejméně 300 fylogeneticky odlišných druhů a je velmi rozšířený po celém světě (Burgess, 1981; O'Donnell *et al.*, 2015). V Evropě jsou za hlavní původce onemocnění považovány nekrotrofní rody *F. graminearum* (O'Donnell *et al.*, 2004), *F. culmorum* (Kollers *et al.*, 2013) či *F. pseudograminearum* (*Fp*), které přežívají v půdě a na zbytcích plodin (Chakraborty *et al.*, 2010).

Identifikace jednotlivých druhů *Fusarium* je založena na primárních a sekundárních charakteristikách, ve kterých jsou podstatné rozdíly. Primární charakteristiky zahrnují např. tvar makrokonidií, přítomnost či nepřítomnost mikrokonidií, jejich tvar či typ mikrokonidioforů (Windels, 1991). Sekundární charakteristiky zahrnují např. přítomnost či nepřítomnost chlamydospor jejich polohu a konfiguraci, přítomnost či nepřítomnost sporodochií nebo sklerocií (Burgess, 1981). Jednotlivé druhy mají odlišné způsoby rozmnožování, obecně produkují mitotické (asexuální) konidie, ale *F. avenaceum* a *Fg* mohou produkovat meiotické (sexuální) askospory. Přičemž *Fc* a *Fg* navíc produkují chlamydospory, které mají silnější buněčnou stěnu, proto jsou schopny přežít delší dobu v půdě (Campbell & Griffiths, 1974). Hlavním zdrojem inokula jsou kontaminované zbytky plodin ležící na povrchu půdy. Inokulum může být také zavlečeno infikovaným osivem nebo pomocí konidií (Leplat *et al.*, 2013). Infikují téměř všechny rostlinné orgány a vyvolávají širokou škálu příznaků. Způsobují primárně růžovění klasů obilovin, hnilobu kořenů (FRR; *Fusarium* root rot), krčkovou hnilobu (FCR; *Fusarium* crown rot) či fusariové vadnutí (Backhouse *et al.*, 2004; Parry *et al.*, 1995). Krčkovou hnilobu způsobují primárně druhy *Fc* a *Fg*, které infikují pletiva stébla či kořene pšenice a ječmene a vyvolávají tak jejich nekrózu. Rozvoji onemocnění napomáhá horké a suché počasí, naproti tomu k rozvoji růžovění klasů obilovin přispívá vlhké a teplé počasí (McMullen *et al.*, 1997).

Růžovění klasů je jednou z celosvětově nejničivějších chorob pšenice a ječmene, která je zodpovědná za snížení výnosů a kontaminaci zrna. Onemocnění je způsobeno několika druhy *Fusarium*, které se liší v závislosti na regionu a klimatu, avšak převládajícím druhem ve světě je *Fg*. Napadení patogenem lze pozorovat krátce po infekci, jelikož dochází k předčasnému bělení napadených klásků. Také dochází k produkci zrn, která mají špatnou kvalitu, dochází ke změně jejich barvy, ke smršťení a ke snížení celkové hmotnosti (O'Donnell *et al.*, 2000).

Během růžovění klasů i krčkové hniloby navíc dochází k produkci některých druhů sekundárních metabolitů – mykotoxinů, jako jsou trichotheceny, mezi něž patří např. toxiny T-2 a HT-2, deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) a estrogení mykotoxin zearalenon (ZEA) (Placinta *et al.*, 1999). Mykotoxiny jsou pro lidi i zvířata velice toxické, některé z nich jsou odolné vůči vysokým teplotám, takže je můžeme nalézt v zemědělských plodinách, ale zůstávají v potravinových výrobcích i po jejich zpracování (Hazel & Patel, 2004). Experimenty s mutanty *Fg*, kteří nebyli schopni produkovat DON, ukázaly, že DON funguje jako faktor virulence u pšenice a zvyšuje šíření choroby. Ukázalo se, že DON inhibuje syntézu proteinů v eukaryotických buňkách, tím že se váže na ribozomální podjednotku 60S, což vede k aktivaci signální dráhy vedoucí k programované buněčné smrti (Desmond *et al.*, 2008). Fytotoxickými účinky DON u pšenice jsou chloróza, nekróza a vadnutí, které častokrát vede k vybělení celých klasů (Lemmens *et al.*, 2005).

2.2.1 *Fusarium culmorum*

F. culmorum je půdní houba, která je konkurenčním saprotrofem a fakultativním parazitem. Přebývá v chladnějších oblastech Evropy, severní Afriky, Ameriky, Austrálie a Asie (Parry *et al.*, 1995) (Obr. 2). Produkuje zakřivené makrokonidie, které jsou poměrně tlustostěnné. Mikrokonidie nejsou produkovány. Chlamydozpy se tvoří hojně a rychle, vyskytují se buď jednotlivě nebo v řetězcích. Mycelium je obecně bílé, ale často žluté až žlutohnědé. Objevují se i oranžová až červenohnědá sporodochia (Nelson *et al.*, 1983; Wagacha & Muthomi, 2007).

K infekci klasů pšenice dochází během krátké fáze kvetení, což je období, kdy je pšenice nejvíce náchylná na onemocnění (Fernando *et al.*, 1997; Lacey *et al.*, 1999). Hlavním faktorem podporujícím infekci a produkci mykotoxinů je vysoká vlhkost vzduchu. Vyšší teploty (nad 25 °C), úroveň odolnosti odrůdy a hnojení dusíkem jsou

dalšími klíčovými faktory, které přispívají k rozvoji onemocnění (Lacey *et al.*, 1999; Mentewab *et al.*, 2000; Wagacha & Muthomi, 2007). Vzduchem přenášené konidie uvolněné ze zbytků plodin se ukládají na nebo uvnitř pšeničných prašníků, které jsou primárním místem infekce, tam dochází cca 12-24 hai (hours after infection) k jejich klíčení. Houbové hyfy mohou dále prostupovat do jednotlivých hostitelských pletiv. První příznaky napadení klasu je možné pozorovat na pluškách infikovaných kvítků, kde se objevují tmavě hnědé skvrny (Brown *et al.*, 2010; Kheiri *et al.*, 2019; Wagacha & Muthomi, 2007).



Obr. 2 Mikroskopický snímek makrokonidií patogenní houby *Fusarium culmorum*. Zvětšení 400×. Foto: Mgr. Pavel Marušinský, Ph.D.

2.2.2 Interakce *Brachypodium distachyon* – rod *Fusarium*

Z důvodu velkého hexaploidního genomu není pšenice vhodná pro genetické studie, proto bylo potřeba najít vhodnějšího kandidáta pro výzkum interakcí s druhy *Fusarium*. Nejprve se předpokládalo, že by vhodnými modely mohl být ječmen (Langevin *et al.*, 2004) nebo rýže (Amatulli *et al.*, 2010), obě plodiny, ale nakonec vykazovaly nevhodné vlastnosti pro další studium. Jako další navrhovaný model byla vysoce zkoumaná *Arabidopsis thaliana*, která však není přirozeným hostitelem rodu *Fusarium* a vykazuje jiné příznaky napadení, než se vyskytují u pšenice (Urban *et al.*, 2002).

Peraldi *et al.* (2011) navrhli pro studium jednoděložnou rostlinu mírného pásma *Brachypodium distachyon*, která se jevila jako ideální model pro studium interakce, což bylo vzápětí potvrzeno. Listy *Bd* byly pomocí postřiku inokulovány oběma patogeny *Fg* a *Fc*. A obdobně jako v případě onemocnění růžovění klasů u pšenice se ukázalo se, že je *Bd* nejvíce náchylné na infekci v období kvetení (Xu *et al.*, 2008). Část listů byla před

inokulací porušena a část listu nikoliv. Neočekávaně se i u předem neporušených listů po inokulaci vytvořily nekrotické a chlorotické léze, stejně jako v případě u předem poraněných listů. Progres onemocnění byl však u neporušených zpomalen asi o 48 h. Kromě listů byly naočkovány i další orgány jako stébla, listy, listové pochvy či kořeny, u všech byla prokázána citlivost na patogeny. Celkově se ukázalo, že *Brachypodium* po infekci patogenů rodu *Fusarium* vykazuje obdobné příznaky, které byly pozorovány u klasů pšenice po infekci stejnými patogeny, což prokazuje potenciál tohoto modelového druhu zkoumat rezistenci vůči druhům rodu *Fusarium* a přinášet nové informace, které mohou být aplikovány na dalších obilovinách (Peraldi *et al.*, 2011).

Prozatím chybí účinná biologická ochranná opatření proti růžovění klasů, neexistuje žádný plně rezistentní kultivar a ochrana choroby je proto primárně založena na používání fungicidů, jejichž účinnost se liší podle druhu patogenu (Chala *et al.*, 2003). Mimo to je používání fungicidů velmi nákladné a vede k enviromentálním a zdravotním problémům. Proto by měl současný výzkum směřovat směrem k biopesticidům šetrným k životnímu prostředí a k hledání nových biologických ochran z různých zdrojů (Comby *et al.*, 2017).

2.3 Endofytické houby

Jako vhodná biologická ochrana se v posledních letech osvědčují houby či bakterie, které se nacházejí na povrchu či ve vnitřních pletivech rostlin, aniž by způsobovaly zjevné příznaky onemocnění (Rodriguez *et al.*, 2009). Pokud se nacházejí pouze na povrchu rostliny a nepronikají dovnitř jedná se o epifyty (Zambell & White, 2015). Pokud v určité fázi svého životního cyklu intra- či intercelulárně kolonizují vnitřní pletiva rostlin pak hovoříme o endofytech (Rodriguez *et al.*, 2009). Přestože se o přítomnosti živých mikroorganismů uvnitř rostlin ví již od počátku minulého století, nepřitáhlo to pozornost mykologů, dokud se nepřišlo na jejich farmaceutický a ekologický význam (Gunatilaka, 2006).

Endofytické houby jsou typicky nepatogenní houby, které jsou v rostlinách všudypřítomné a extrémně rozmanité, každá rostlina obsahuje minimálně jeden druh této houby. Vyskytují se jak v nadzemní části rostliny, tak i v podzemní části, kde kolonizují kořeny (Fierer & Jackson, 2006). Navzdory široké rozmanitosti skupiny byly endofytické houby klasifikovány do dvou kategorií z angl. na clavicipitaceous a non-clavicipitaceous.

Později byly na základě symbiotických a ekologických parametrů rozděleny do čtyř hlavních tříd (Rodriguez *et al.*, 2009).

Endofytická interakce je definovaná jako vyvážený antagonismus, výměnou za využití rostliny jako stanoviště a zdroj živin, jí endofyt poskytuje řadu výhod včetně podpory jejího růstu, celkového vývoje či toleranci k biotickým a abiotickým stresům (Schulz *et al.*, 2015).

2.3.1 Využití endofytických hub k ochraně rostlin

Prokázalo se, že endofytické houby poskytují svému hostiteli zvýšenou ochranu před onemocněním, což vede ke snížení úrovně infekce, potlačení růstu nebo ke snížení produkce inokula patogenu, který rostlinu napadá. Mimo to byla prokázána i zvýšená odolnost vůči hmyzu a škůdcům (Bacon & White, 2016).

Mechanismy, kterými endofytické houby zlepšují výkonnost a odolnost rostliny se dělí na přímé (interakce endofytů a patogenů) a nepřímé (posílená obrana rostlin). Do přímých mechanismů jsou zařazeny sloučeniny, které endofyt produkuje. Zde je zařazena sekrece antibiotik, lytických enzymů, fytohormonů nebo indolových sloučenin. Na druhé straně nepřímé mechanismy zahrnují reakce rostlin na přítomnost endofytu, kde patří stimulace ISR (induction of systemic resistance) nebo SAR (systemic acquired resistance) či stimulace sekundárních metabolitů rostlin především alkaloidů (Fadji & Babalola, 2020).

2.3.1.1 *Microdochium bolleyi*

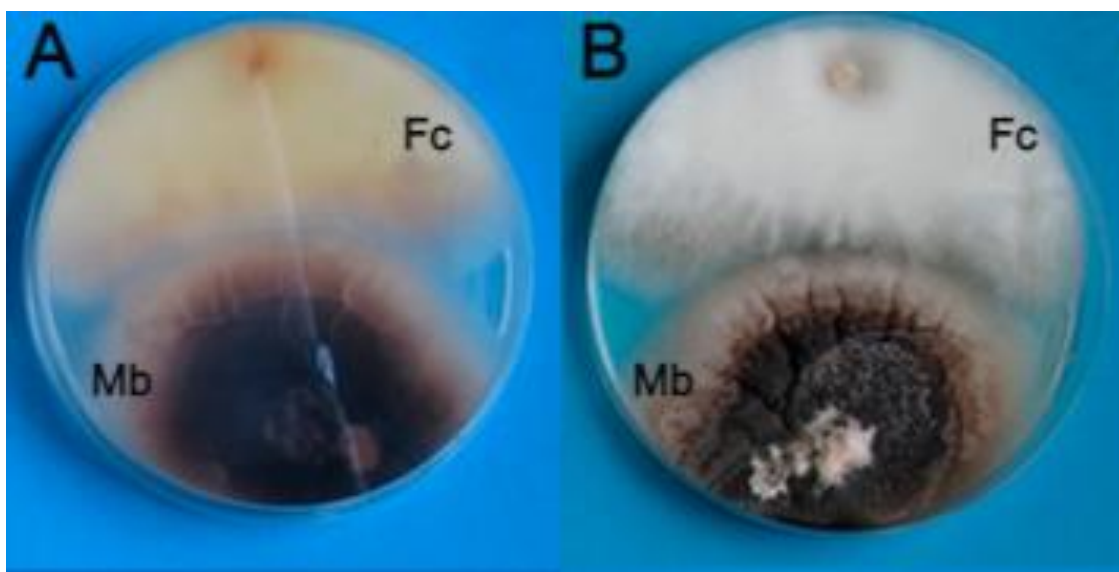
Microdochium bolleyi (Sprague) de Hoog and Hermanides-Nijhof (*Mb*) je houba, která je častým a úspěšným endofytem kolonizující kořeny trav a obilovin (Obr. 3). Podle taxonomie se řadí do oddělení *Ascomycota*, řádu *Xylariales* (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016). *Mb* je považován za slabého patogena či dokonce za nepatogenní druh houby, která by mohla přinést potenciál jako biologická ochrana proti agresivním půdním patogenům obilovin (Kirk & Deacon, 1987; Rothen *et al.*, 2018).

Řadí se do skupiny kořenových endofytů, kteří jsou označováni jako tzv. dark septate endophytes (DSE), z toho důvodu, že vytvářejí typické tmavé přepážkové hyfy (Mandyam *et al.*, 2010). Jedná se o různorodou skupinu hub, která je charakterizovaná melanizovanými buněčnými stěnami a intra – či intercelulární kolonizací zdravých rostlin (Jumpponen & Trappe, 1998). *Mb* produkuje jednobuněčné konidie, které mají tvar

půlměsíce a tmavě hnědé hyfy, někdy může docházet k uvolňování i oranžového pigmentu (De Hoog & Hermanides-Nijhof, 1977).

Jeho přínosy pro obiloviny byly prokázány především u pšenice a ječmene, kdy přítomnost *Mb* v kořenech potlačovala různé listové a půdní patogeny rostlin. Například Kirk & Deacon (1987) prokázali významně sníženou infekci v kořenech pšenice, která byla infikovaná *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, další studie prokázaly potenciál *Mb* na potlačení i jiných patogenů, kterými jsou např. *Septoria nodorum* (Sieber *et al.*, 1988) či *F. culmorum* (Comby *et al.*, 2017). I přesto, že je *Mb* pro pšenici mírně patogenní a způsobuje na jejích kláscích hnědé plochy, bylo zjištěno, že za přítomnosti *Mb* dochází k inhibici růstu *F. culmorum*, napadajícího pšenici, až o 24,4-33 %. Rovněž došlo ke snížení symptomů onemocnění způsobené *F. graminearum* na 54 % (Comby *et al.*, 2017).

Z těchto důvodů nám *Mb* přináší potenciál využití endofytických hub jako vhodná biologická ochrana proti růžovění klasů obilovin a dalších devastujících onemocnění.



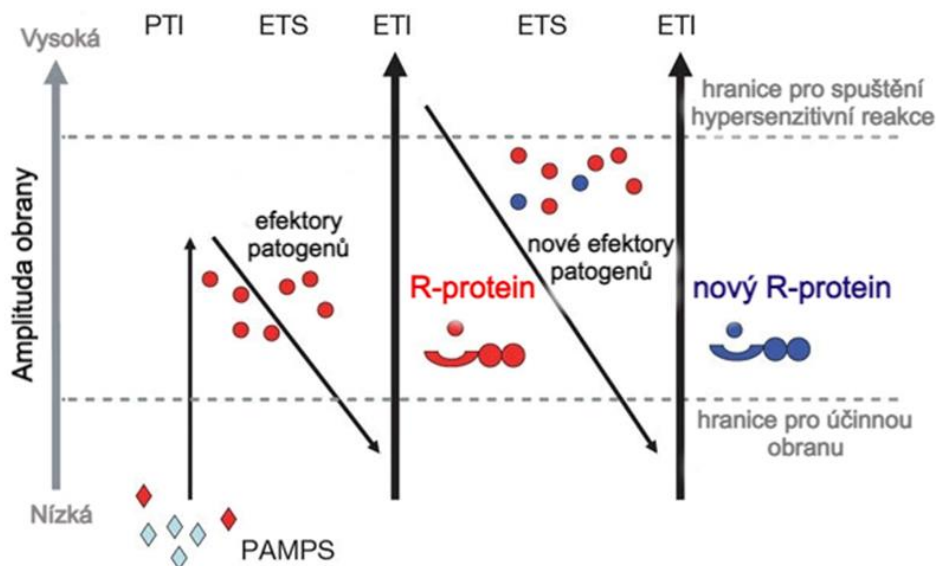
Obr. 3 Kompetitivní *in vitro* test. Obrázek znázorňuje současný růst endofytické houby *Microdochium bolleyi* (Mb) izolované z pšenice společně s patogenní houbou *Fusarium culmorum* (Fc) na stejné Petriho desce s bramboro-dextrózovým agarem a ampicilinem. A – pohled zespodu; B – pohled shora. (upraveno podle Bleša *et al.*, 2021).

2.4 Mechanismy signalizace napadení patogenem v rostlinné buňce

2.4.1 Imunita u rostlin

Při napadení rostlin patogenem využívají rostliny na svou ochranu řadu různých obranných mechanismů. Mezi přirozené, pasivní obranné mechanismy řadíme fyzické bariéry, které zamezují průniku patogenů do rostlinné buňky. Jako ochranná fyzická bariéra může sloužit např. buněčná stěna, kutikula, vosky či trichomy (Serrano *et al.*, 2014). Obrana může být i chemického původu, kdy rostlina produkuje specifické enzymy nebo toxické sloučeniny, které negativně ovlivňují patogeny (Chen, 2008).

V průběhu evoluce si rostliny vyvinuly vlastní imunitní systém, který na rozdíl od imunitního systému živočichů postrádá mobilní obranné buňky, specificky likvidující cizorodé látky. Rovněž u nich nebyl vyvinut získaný imunitní systém, proto při obraně proti různorodým mikroorganismům využívají imunitní systém vrozený (Dangl & Jones, 2001). Ten je tvořen dvěma úrovněmi obrany, které jsou navzájem propojené. Vzájemné propojení těchto systémů a jejich účinek na patogeny popsali Jones & Dangl (2006) jako tzv. „zig-zag model“ (Obr. 4).



Obr. 4 Zig-zag model rostlinné imunity. Schéma zobrazuje koevoluci mezi obrannými mechanismy rostlinné buňky a molekulami patogenu. V první fázi se MAMPs/PAMPs (červené a bílé kosočtverce) vážou na PRR receptor, tím dochází ke spuštění PTI imunity. Ve druhé fázi dodávají patogeny efekty, které PTI imunitu potlačují, což vede k aktivaci ETS (efektorem spuštěná citlivost). Ve třetí fázi je efektor (červené kolečko) rozpoznán receptorem NB-LRR, čímž dochází k aktivaci ETI, přičemž je častokrát překročena hranice pro spuštění hypersenzitivní reakce, která vede k programované buněčné smrti. Ve čtvrté fázi reagují patogeny na HR, tím že dochází k tvorbě nových efektorů, které jsou schopné ETI potlačit. Rostliny tak vyvíjejí nové R-proteiny (Jones & Dangl, 2006, upraveno).

2.4.1.1 PAMP aktivovaná imunita

První úroveň obrany zahrnuje transmembránové receptory PRR (pathogen recognition receptors), které rozpoznávají konzervované molekulární vzory typické pro patogeny tzv. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) nebo své vlastní poškozené struktury tzv. DAMPs (damage-associated molecular patterns). Souhrnně se tyto molekulární vzory označují jako MAMPs (microbe-associated molecular patterns) tedy molekulární vzory spojené s mikroby. MAMPs jsou tedy složeny buď z patogenních nebo mikrobiálních struktur, jako jsou lipopolysacharidy, bičíky nebo složky buněčné stěny (glukany a chitiny) a následně aktivují PAMP/MAMP aktivovanou imunitu PTI/MTI (PAMP/MAMP triggered immunity) (Ausubel, 2005; Jones & Dangl, 2006).

Pravděpodobně nejlépe prozkoumaným receptorem je bičíkový receptor FLS2 (flagellin sensitive 2), který se řadí do receptorů podobný kinasám (RLK). FLS2 je složen z extracelulární repetice bohaté na leucin (LRR; leucine rich repeats) a intracelulární kinasové domény (RK). LRR-RK rozpoznává složku bakteriálních bičíků flagelin (Felix *et al.*, 1999). Další příklady interakce MAMP/PRR zahrnují elongační faktor (EF-Tu)/EFR (Zipfel *et al.*, 2006), houbový chitin/CERK1 (*Arabidopsis*) (Miya *et al.*, 2007) nebo chitin/CEBiP (rýže) (Kaku *et al.*, 2006).

PTI imunita zahrnuje aktivaci MAP kinasy (MAPK) (mitogen-activated protein kinase) a kalcium dependentní proteinkinasy (CDPK) (calcium-dependent protein kinase), tvorbu extracelulárního superoxidu, aktivaci obranných genů a ukládání kalózy (Tsuda & Katagiri, 2010).

2.4.1.2 Efektorem spuštěná imunita

Mikrobiální patogeny produkují efektorové molekuly (také nazývané virulentní faktory), což jsou specifické bílkoviny, které potlačují PTI. Rostliny si na efekторы vyvinuly tzv. geny rezistence, které se nazývají *R*-geny a ztělesňují tradiční teorii „gen proti genu“, která byla poprvé popsána v patosystému rzi lnu (Flor, 1971; Jones & Dangl, 2006). *R*-geny kódují *R*-proteiny, z velké části se jedná o intracelulární receptory NLR (NOD-like receptor) obsahující nukleotid vázající místo NB (nucleotide binding) a LRR. Efektory patogenů se na NLR receptor váží buď přímo nebo nepřímo, čímž dochází k aktivaci efektořem spuštěné imunity ETI (effector triggered immunity), ta je rychlejší a silnější než PTI nebo efektořem spouštěná citlivost (ETS) (Jones & Dangl, 2006).

ETI je většinou, ale ne vždy spojena s hypersenzitivní reakcí (HR). HR je charakteristická rychlou apoptickou buněčnou smrtí, která má lokální nektrózu v místě infekce zabránit šíření biotrofních patogenů do zdravých pletiv v rostlině (Boller & Felix, 2009; Nimchuk *et al.*, 2003).

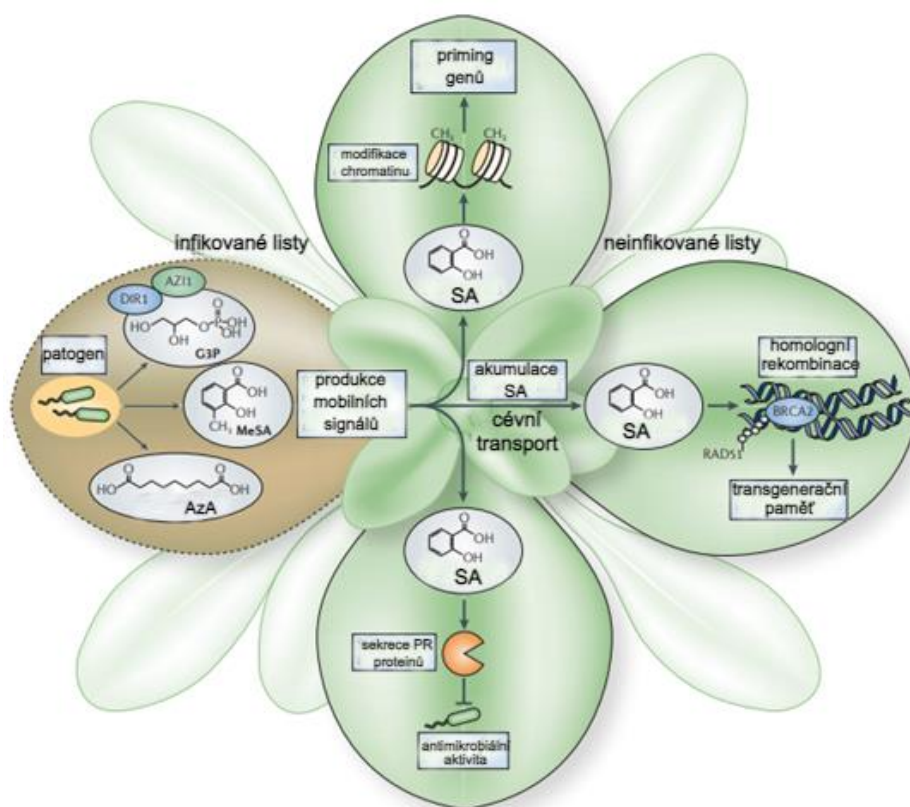
Aktivace PTI nebo ETI omezuje růst patogenů a zvyšuje odolnost rostlin vůči různým chorobám (Bari & Jones, 2009). Ačkoliv se liší ve své síle, trvání i v načasování aktivace signálních drah vzájemně se překrývají a vyvolávají stejné akce. Jako jsou změna propustnosti kanálků pro vápenaté ionty, aktivace MAPK a CDPK, produkce ROS a indukce obranných genů. Rovněž dochází k aktivaci signálních drah fytohormonů např. signální dráhy kyseliny salicylové (SA), která vede k produkci proteinů souvisejících s patogenezí (PR; pathogenesis-related 1) (Delaney *et al.*, 1994; Glazebrook, 2005).

2.4.2 Systémově získaná rezistence

Kromě aktivace obranných mechanismů přímo v místě poranění či infekce může docházet po napadení patogenem ke spuštění obranných reakcí systémově tj. i v neinfikovaných částech rostliny, což zajistí imunitu vůči reinfekci v celém těle a zvýší tak celkovou rezistenci rostliny. Tento typ systémové imunity se nazývá systémově získaná rezistence SAR (Ross, 1961).

SAR je typicky indukovaná ETI, ale existují i zmínky o aktivaci prostřednictvím PTI, která ji vyvolává slaběji (Mishina & Zeier, 2007). Vyvolaná rezistence může trvat několik dní nebo i po celý život rostliny a je schopna přenosu z generace na generaci (Henry *et al.*, 2013). Až o třicet let později od objevení SAR se zjistilo, že zásadní molekulou pro indukci rezistence je fytohormon SA (Malamy *et al.*, 1990; Sticher *et al.*, 1997). Pro aktivaci SAR je důležitá komunikace na dálku mezi primárním infikovaným orgánem a zbytkem rostliny bez patogenu. Aby došlo k expresi obranných genů i v neinfikované části rostliny musí tato část získat informaci prostřednictvím tzv. SAR signálu. Nejprve se předpokládalo, že přenos signálu je zprostředkován SA, to však bylo vyvráceno (Attaran *et al.*, 2009) a došlo k identifikaci jiných signálních molekul, které pravděpodobně putují do neinfikovaných částí prostřednictvím floému. Jedná se o derivát SA methylsalicylát (MeSA) (Park *et al.*, 2007) a dehydroabietinal (DA) (Chaturvedi *et al.*, 2012), které podporují akumulaci SA v neinfikovaných listech. Kyselina azaleová (AZA) a kyselina pipekolová (Pip) (Návarová *et al.*, 2012) se rovněž podílejí na rychlejší a silnější aktivace SA v reakci na patogeny. Také se předpokládá, že glycerol-3-fosfát

(G3P) se účastní SAR, tím, že se účastní translokace do neinfikovaných částí rostliny společně s proteinem přenášejícím lipidy DIR1 (defective in induced resistance 1) (Chanda *et al.*, 2011). Předpokládá se, že sloučeniny, které jsou zodpovědné za přenos SAR signálu se liší v závislosti na rostlinném druhu a typu interakce rostlina-patogen. Rostliny s aktivovanou SAR aktivují řadu obranných genů, nejčastěji se jedná o PR proteiny (Obr. 5) (Yalpani *et al.*, 1991).



Obr. 5 Aktivace SAR v infikovaných listech a její šíření do listů neinfikovaných. Patogenní infekce má za následek tvorbu mobilních imunitních signálů jako jsou: glycerol-3-fosfát (G3P), kyselina methylsalicylová (MeSA) a kyselina azaleová (AzA) a tvorbu transferových proteinů DIR1 a AZI1 (azelaic acid induced 1). Mobilní signály jsou přenášeny cévním transportem do neinfikovaných částí, kde neznámým mechanismem vyvolávají indukci kyseliny salicylové (SA), která je signální molekulou pro SAR. Akumulace SA indukuje sekreci PR proteinů, které mají antimikrobiální aktivitu; metylaci histonů a další chromatinové modifikace a homologní rekombinaci působením BRCA2 (breast cancer susceptibility 2) a RAD51 pro vytvoření transgenerační imunitní paměti (Spoel & Dong, 2012, upraveno).

2.5 Role rostlinných hormonů v obranných reakcích rostlin

Rostlinné hormony hrají důležitou roli v obranných reakcích rostlin proti škůdcům a chorobám. Fytohormony jsou produkovány rostlinou jako odpověď na poškození či napadení. Kromě SA se na obranných reakcích podílí i další fytohormony, jako jsou auxiny, gibbereliny (GA), cytokininy (CK) nebo brassinosteroidy (BR), jež významně podporují růst rostlin a velikost jejich orgánů. Naproti tomu kyselina abscisová (ABA), ethylen (ET), jasmonáty (JA) a SA jsou spojeny s regulací reakcí, které souvisí se stresovými podmínkami nebo se zpomalením růstu rostliny (Kakei *et al.*, 2015).

Jako kontrola odpovědi rostliny na daný patogen slouží kromě fenotypového pozorování vytvořených lézí také sledování produkce fytohormonů. Jestliže je rostlina infikovaná patogenem, dochází ke změnám jejich hladiny, čehož může být využito při profilování exprese markerových genů citlivých na jednotlivé fytohormony. U modelových rostlin se jako markery používají geny, které jsou zapojeny do biosyntézy či signalizačních drah fytohormonů (Kakei *et al.*, 2015). Většina signálních drah zmíněných fytohormonů se vzájemně překrývá a působí antagonisticky či synergeticky. U *A. thaliana* mají např. SA a JA antagonistický účinek, SA potlačuje JA-indukovatelné geny. Kromě toho se role fytohormonů může lišit v závislosti na hostiteli a kmenu patogenů, SA-indukovaná obrana je cílená proti biotrofním a hemibiotrofním patogenům, zatímco JA-indukovaná obrana působí na herbivory a nekrotrofní patogeny (Leon-Reyes *et al.*, 2010; Spoel *et al.*, 2003).

K pochopení obranných mechanismů u *B. distachyon* bylo ve studiích Kouzai *et al.* (2016) či Sandoya & de Oliveira Buanafina (2014) použito a studováno několik genů fytohormonových markerů, ale jejich počet zůstává nadále omezený a nedostatečný, proto je potřeba provádět další studie (Kakei *et al.*, 2015). V mé diplomové práci bylo použito celkem 10 genů fytohormonových markerů, které jsou uvedeny (Tab. 2) v experimentální části.

2.5.1 Biosyntéza a signalizace kyseliny salicylové

Důležitým aspektem pro pochopení mechanismu indukce SAR je identifikace faktorů, které spojují signál SA s expresí *PR* genů, jejichž zvýšená exprese slouží jako molekulární marker SAR (Návarová *et al.*, 2012).

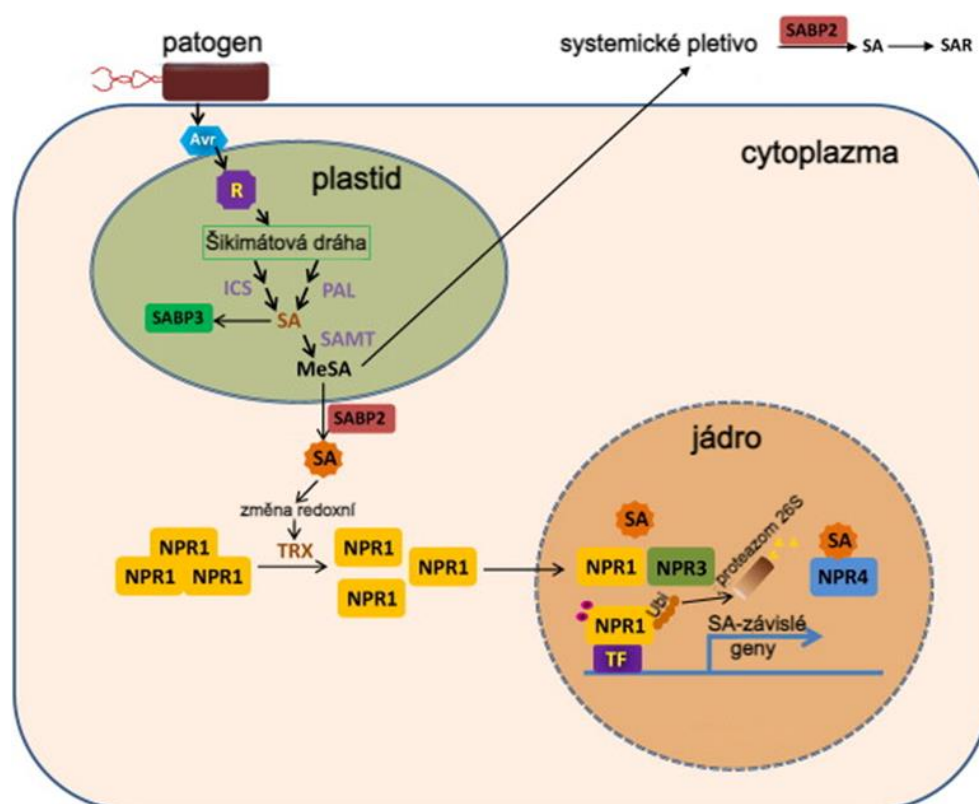
Doposud byly objasněné dvě možné biosyntetické dráhy SA v rostlinách. Patogenem indukovaná produkce SA je syntetizovaná dráhou isochorismátovou (IC) v chloroplastech (Wildermuth *et al.*, 2001) a druhou cestou je dráha fenylypropanoidová (PAL) (Lee *et al.*, 1995), přičemž obě dráhy vycházejí z chorismátu, produktu šikimátové dráhy (Obr. 6).

Majoritní dráhou při imunitě rostlin je IC dráha s hlavním enzymem isochorismátsyntasou (ICS) (EC 5.4.4.2), katalyzující přeměnu chorismátu na isochorismát (IC), který je dále přeměněn na SA za katalýzy enzymem BAHD acyltransferasou (EC 2.3.1.-), která je kódována genem *EPS1* (*enhanced pseudomonas susceptibility1*) (Wildermuth *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2009). Během aktivace SAR je SA, která se hromadí v listech naočkovaných patogenem přeměněna na MeSA pomocí SA-methyltransferasy (SAMT) (EC 2.1.1.274), MeSA je poté transportovaná do systemických pletiv. Zde je zpátky hydrolyzovaná na SA prostřednictvím esterasové aktivity methylsalicylát esterasy (EC 3.1.1.1) identifikované jako protein SABP2 (SA-binding protein 2), což vede k aktivaci SAR i v neinfikovaných částech rostliny (Park *et al.*, 2007). Attaran *et al.* (2009) neprokázali, že by MeSA nebo JA působili jako mobilní přenašeči SAR signálu u modelové rostliny *A. thaliana*. MeSA také difunduje do cytoplazmy, kde je proteinem SABP2 konvertována na SA. Zvýšená akumulace SA v cytoplazmě má za důsledek rozpad oligomerního *NPR1* (nonexpressor of pathogenesis-related genes1) lokalizovaného v cytosolu (Cao *et al.*, 1997).

2.5.1.1 Gen *NPR1*

NPR1 je klíčovým regulátorem SA-dependentní dráhy a jeho nadměrná exprese vede ke zvýšené odolnosti vůči chorobám u rostlinných druhů jako jsou např. rýže (Fitzgerald *et al.*, 2004), pšenice (Makandar *et al.*, 2006) či tabák (Srinivasan *et al.*, 2009). Oligomerní *NPR1* je spojen disulfidickými můstky a změnou redoxního potenciálu dochází k jejich redukci za katalýzy thioredoxiny, čímž vzniká monomerní *NPR1*, který je translokován do jádra prostřednictvím jaderného lokalizačního signálu NLS (nuclear localization signals) (Mou *et al.*, 2003). V jádře N-terminální BTB/POZ doména *NPR1* interaguje se základními transkripčními faktory leucinového zipu TGA (TGACG-binding factor). Interakce stimuluje vazbu TGA na SA-responzivní elementy v promotorech *PR* genů (konkrétně *PR-1* a *PR-5*), čímž je aktivuje a spouští tak SAR. Aktivace je zprostředkována pomocí oxidované formy Cys⁵²¹ a Cys⁵²⁹, které se nachází na C-terminální doméně *NPR1*

(Cao *et al.*, 1997; Kinkema *et al.*, 2000; Spoel & Dong, 2012). NPR1 je nejprve fosforylován na Ser⁵⁵ a Ser⁵⁹, následuje ubiquitinace, která je zprostředkována ubiquitin ligasou Cullin 3 (CUL3) (EC 2.3.2.27), což vede k degradaci v proteazomu 26S. Je důležité zmínit, že jakýkoliv fosforylovaný monomer NPR1, který je v jádře degradován aktivuje SAR, ale degradace nefosforylovaných NPR1 k aktivaci SAR a k indukci obranných genů nevede. Degradaci pomáhají usnadnit i další SA receptory jako jsou NPR3 a NPR4, které fungují jako substráty pro ubiquitin ligasu (Fu *et al.*, 2012).



Obř. 6 Model znázorňující aktivaci signalizace SA v rostlinné buňce. Napadení patogenem vede ke zvýšené biosyntéze SA buď prostřednictvím ICS nebo PAL dráhy u rostlin. SAMT katalyzuje přeměnu SA na MeSA, ta difunduje z plastidu do cytoplazmy, kde je konvertována zpět na SA za katalýzy SABP2. Zvýšená hladina SA v cytoplasmě vede k rozpadu oligomerní formy NPR1 na jeho monomery, které migrují do jádra. V jádře aktivují transkripci obranných genů, včetně PR genů, které reagují na SA. NPR1 je po interakci s transkripčními faktory fosforylován a poté ubiquitinylován a jeho degradace v proteazomu 26S spouští expresi genů citlivých na SA (Kumar, 2014, upraveno).

Bylo zjištěno, že nadměrná exprese *NPR1* v pšenici zvyšuje odolnost proti onemocnění růžovění klasů obilovin. Exprese *NPR1* byla zvýšena dvakrát až třikrát po infekci patogenem *F. asiaticum* (*Fa*) po ošetření SA ve srovnání s expresí *NPR1* ve zdravé, neinfikované rostlině (Gao *et al.*, 2013). Sandoya & de Oliveira Buanafina (2014) sledovaly expresi *NPR1* u citlivého a rezistentního genotypu *Bd* po inokulaci *S.*

homoecarpa. Prokázalo se, že exprese u citlivého genotypu byla po 24 h vyšší než u rezistentního, celkově byl tento gen, ale down-regulován. Příčinou by mohlo být, že *S. homoecarpa* je nekrotrofní patogen, který aktivuje JA/ET a aktivace jednoho hormonu může potlačit aktivaci druhého, tj. SA.

2.5.1.2 Gen *WRKY*

Do regulace reakce po napadení patogenem jsou mimo TGA zapojeny také transkripční faktory *WRKY*, jejichž geny jsou při infekci silně exprimovány. *WRKY* potřebují pro své navázání na cílový promotor genu specifickou sekvenci W-boxu (T)TGAC(C/T) (Maleck *et al.*, 2000). Ukázalo se, že samotnou expresi genu *NPRI* regulují *WRKY*, pravděpodobně působí jako pozitivní regulátory, ale přesný *WRKY* nebyl doposud identifikován (Yu *et al.*, 2001). Kromě genu *NPRI* obsahují W-boxy ve své promotorové oblasti také geny *ICS1* (Wildermuth *et al.*, 2001), *TL1-vazebný transkripční faktor (TBF1)* (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2012) a *PR-1* (Turck *et al.*, 2004).

Hladina exprese genů *WRKY* byla sledována u mnoha rostlinných druhů např. u rýže, která byla inokulována kmeny *M. oryzae* a poté ošetřena SA. Úspěšně se prokázalo, že geny *OsWRKY45*, 62 a 76 se podílí na spuštění imunitní reakce (Kawahara *et al.*, 2012). U *B. distachyon* byly nalezeny dva geny *WRKY45-1* a *WRKY45-2*, které vykazovaly podobnou proteinovou sekvenci jako *OsWRKY45*. Pomocí qRT-PCR analýzy byla sledována jejich exprese, která byla prokazatelně vyšší již po 24h od ošetření SA (Kouzai *et al.*, 2016). Kakei *et al.* (2015) sledovali zvýšenou expresi *WRKY* již po 3 hodinách po ošetření SA.

2.5.2 Biosyntéza a signalizace kyseliny jasmonové

Na rozdíl od SA, která indukuje SAR, JA společně s ET regulují další důležitý typ indukované rezistence, kterým je indukovaná systémová rezistence ISR. ISR je mechanismus rezistence, který je aktivován nepatogenními bakteriemi kolonizujícími kořeny, její účinek spočívá ve zvýšení chemické nebo fyzikální bariéry hostitelské rostliny (Heil & Bostock, 2002).

Biosyntéza JA je lokalizovaná v plastidech, peroxizomech a cytoplazmě. Působením fosfolipasy A1 (PLA1) (EC 3.1.1.32) se z galaktolipidů membrány chloroplastů uvolňuje kyselina α -linolenová (18:3) (α -LeA) (Ishiguro *et al.*, 2001). Ta je oxidovaná 13-lipoxygenasou (LOX 13) (EC 1.13.11.12) za vzniku 13-

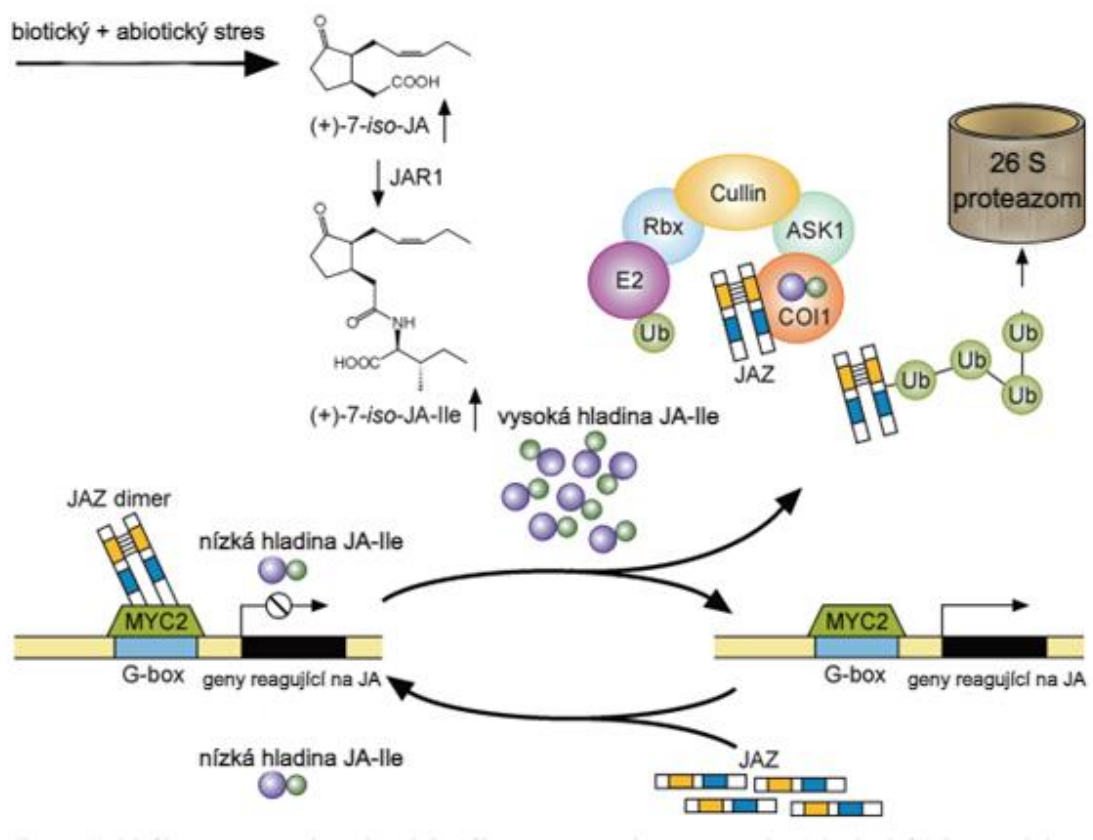
hydroperoxylinolenové kyseliny (13-HPOT). Vzniklá kyselina je dehydratovaná pomocí allenoxid syntasy (AOS) (EC 4.2.1.92), následně probíhá cyklizace katalyzovaná allenoxid cyklasou (AOC) (EC 5.3.99.6) za vzniku (9S, 13S)-12-oxo-fyodienové kyseliny (OPDA) (Brash *et al.*, 1988). OPDA je transportována pomocí JASSY proteinu do peroxizomu, kde dochází k její redukci OPDA reduktasou 3 (OPR3) (EC 1.3.1.42) na kyselinu 3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyklopentan-1-oktanovou (OPC-8). Poté dochází ke třem β -oxidační reakcím pomocí třech enzymů: acyl-Coa oxidasy (ACX) (EC 1.3.3.6), multifunkčních proteinů (MFP) a L-3-ketoacyl-CoA thiolasy (KAT) (EC 2.3.1.16). Vzniká (+)-7- *iso*-JA (JA), která je následně transportována do cytoplazmy, kde dochází ke konjugaci s izoleucinem (Ile) za vzniku (+)-7- *iso* -JA-Ile (JA-Ile), která se považuje za bioaktivní sloučeninu JA. Reakce je katalyzovaná enzymem JA-amidosyntetasou (JAR1) (EC 6.3.2.52) (Staswick & Tiryaki, 2004; Wasternack & Kombrink, 2010).

V rostlinných buňkách, které obsahují nízké hladiny JA je exprese genů reagujících na JA potlačena proteiny JAZ (jasmonate ZIM-domain), které blokují aktivitu TF jako jsou např. MYC2. MYC2 se vážou na specifickou sekvenci (G-box) v promotoru genů reagujících na JA, avšak navázáním JAZ na MYC2 je jejich aktivita potlačena a k expresi nedochází (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007) (Obr. 7).

Za stresových podmínek se JA-Ile v buňkách akumuluje a skrze JA transferové proteiny JAT1, lokalizovaných na jaderných a plazmatických membránách, je transportována do jádra, kde dochází k aktivaci signální dráhy. JA-Ile je rozpoznán F-boxem proteinu COI1 (coronatine insensitive1), který je součástí komplexu SCF^{COI1} (Skp-Cullin-F-box), ten funguje jako E3 ubikvitin ligasa (EC 2.3.2.27) (Xie *et al.*, 1998). Kromě COI1 je SCF^{COI1} komplex tvořen proteinovými složkami jako jsou ASK1 (*Arabidopsis* homology SKP1), CUL1, RBX1 (ring-box1) a E2 (enzym konjugující ubikvitin). Vazba Ja-Ile na COI1 podporuje interakci mezi komplexem COI1 a proteiny JAZ za vzniku COI1-ligand-JAZ. Tato interakce způsobí polyubikvitinaci a následnou degradaci proteinů JAZ v proteazomu 26S (Moon *et al.*, 2004; Thines *et al.*, 2007). Nedostatek JAZ má za příčinu uvolnění TF MYC2 a současnou aktivaci exprese genů citlivých na JA (Chini *et al.*, 2007). Další důležitou složkou signalizace je mediátor 25 (MED25), multiproteinový komplex, který spojuje TF s RNA polymerasou II, čímž moduluje genovou expresi (Chen *et al.*, 2012).

Kromě indukce exprese genů biosyntetické dráhy JA jako jsou *LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR3* a signalizační dráhy jako jsou *COI1*, *JAZ*, *MYC2* indukuje JA expresi genů kódujících inhibitory proteinas (*PIN*), které se podílí na inhibici aktivity trávících enzymů

hmyzu (Farmer & Ryan, 1992). MeJA aktivuje již dříve zmíněné *PR* geny, na rozdíl od SA, která aktivuje kyselé, MeJA aktivuje bazické *PR* geny, kódující antimikrobiální proteiny defensin (*PDF1.2*) a thionin (*THI2.1*). *PDF1.2* je široce využíván jako markerový gen pro sledování aktivace JA, ale také pro sledování vzájemného působení JA se signální dráhou SA (Penninckx *et al.*, 1996). MeJA aktivuje indukci genů jako jsou *VSPs* (*vegetative storage proteins*), které se podílí na ochraně rostlin proti herbivorům (Staswick *et al.*, 1991).



Obr. 7 Model znázorňující aktivaci signalizace JA v rostlinné buňce za nízké i vysoké hladiny JA-Ile. Při nízké hladině Ja-Ile (fialová a zelená kolečka) jsou TF MYC2 (zelená) navázány na specifickou sekvenci G-box (modrá), který se nachází v promotoru genů citlivých na JA. Pokud se na MYC2 naváže dimer JAZ je jejich exprese potlačena. Při biotickém či abiotickém stresu je (+)-7-*iso*-JA syntetizovaná *de novo* a konjugovaná s izoleucinem za katalýzy JAR1. Dochází tak k akumulaci JA-Ile a k její vazbě na receptor COI1 (oranžová), který je součástí komplexu SCF^{COI1}. JAZ proteiny se poté vážou na vzniklý komplex COI1-JA-Ile a jsou prostřednictvím enzymu E2 (fialová) ubikvitovány a následně degradovány v proteazomu 26S. MYC2 již neobsahuje navázané JAZ proteiny, čímž dochází k vazbě na G-box a aktivaci exprese genů reagujících na JA, včetně těch, které kódují JAZ proteiny. Exprese genů je ukončena syntézou nových JAZ represorů (Wasternack & Kombrink, 2010, upraveno).

2.5.2.1 Lipoxygenasy

Lipoxygenasy (LOX) se řadí mezi velkou rodinu oxidoreduktas, které neobsahují hem a jako kofaktor využívají železo nebo mangan. Nachází se v rostlinách, houbách, ale i u živočichů. Rostlinné LOX katalyzují přeměnu polynenasycených mastných kyselin na hydroperoxy, které bývají přeměněny na signální molekuly zvané oxylipiny (Siedow, 1991). Oxylipiny hrají při ochraně významnou roli, protože mají antifungální nebo antimikrobiální vlastnosti a podílí se na aktivaci různých drah spojených s peroxygenasou (POX) (EC 1.11.2.1), hydroperoxidlyasou (HPL) (EC 4.2.99.X) a AOS (Wang *et al.*, 2008).

LOX jsou klasifikovány do dvou tříd podle toho, zda oxidují α -LeA na uhlíku 9 (9-LOX) nebo 13 (13-LOX). Všechny LOX lokalizované v plastidech syntetizují 13 (S)-HPOT a řadí se do rodiny 13-LOX, zatímco 9-LOX syntetizující 9 (S)-HPOT se nacházejí v cytoplasmě (Feussner & Wasternack, 2002).

Do dnešního dne bylo identifikováno mnoho genů *LOX* v různých rostlinných druzích jako jsou *A. thaliana* (Vellosilo *et al.*, 2007), kukuřice (Maschietto *et al.*, 2015). *B. distachyon* (Sandoya & de Oliveira Buanafina, 2014) a dalších. Při patogenních infekcích u nich dochází ke zvýšení hladiny aktivity a také ke zvýšení exprese *LOX* genů, čímž se *LOX* podílí na obranných reakcích. Vellosillo *et al.* (2007) zkoumali 9-LOX u *A. thaliana*, která byla inokulována *Pseudomonas syringae*, přičemž bylo zjištěno že syntetizovaný 9 (S)-HPOT indukuje modifikaci buněčné stěny, aby se zabránilo invazi patogenů. Kukuřice byla infikovaná patogenem *Fusarium verticillioides*, který u kukuřice způsobuje hnilobu klasů. Pomocí qPCR bylo analyzováno 8 genů odvozených od 9-LOX a 13-LOX. Geny byly silně indukovány po inokulaci patogenem u rezistentních linií při 3 a 7 dpi a u citlivých linií byla indukce snížena při 14 dpi (Maschietto *et al.*, 2015).

U *B. distachyon* bylo nalezeno 10 genů *LOX*, které vykazovaly homologii s *OsLOX* geny nalezených u rýže. Po infekci houbovým patogenem *S. homoeocarpa* v rezistentním genotypu *B. distachyon* se prokázala up-regulace exprese *LOX3* po 24 h, po 48 h byla zpátky down-regulována (Sandoya & de Oliveira Buanafina, 2014). Kouzai *et al.* (2016) pozorovali zvýšenou hladinu exprese *LOX* po 24 i 48 h po ošetření JA u *B. distachyon*, čímž se znovu potvrdilo, že je *LOX* užitečný JA marker. Byla pozorována zvýšená hladina exprese *LOX* napříč rostlinnými druhy, podstatně méně publikací existuje o sledování exprese *LOX* u *B. distachyon*, proto je důležité provést další analýzy pro pochopení jeho významu.

2.5.3 Biosyntéza a signalizace ethylenu

Ethylen je plynný fytohormon a nejjednodušší alken, který se v přírodě nachází. Je známý především jako stimulant dozrávání plodů, avšak reguluje i různé vývojové a růstové procesy (Liu *et al.*, 2015). Stejně jako dříve zmíněné fytohormony funguje ethylen jako stresový hormon, který hraje důležitou roli v reakcích rostlin na biotický a abiotický stres, včetně patogenní infekce (Roman *et al.*, 1995).

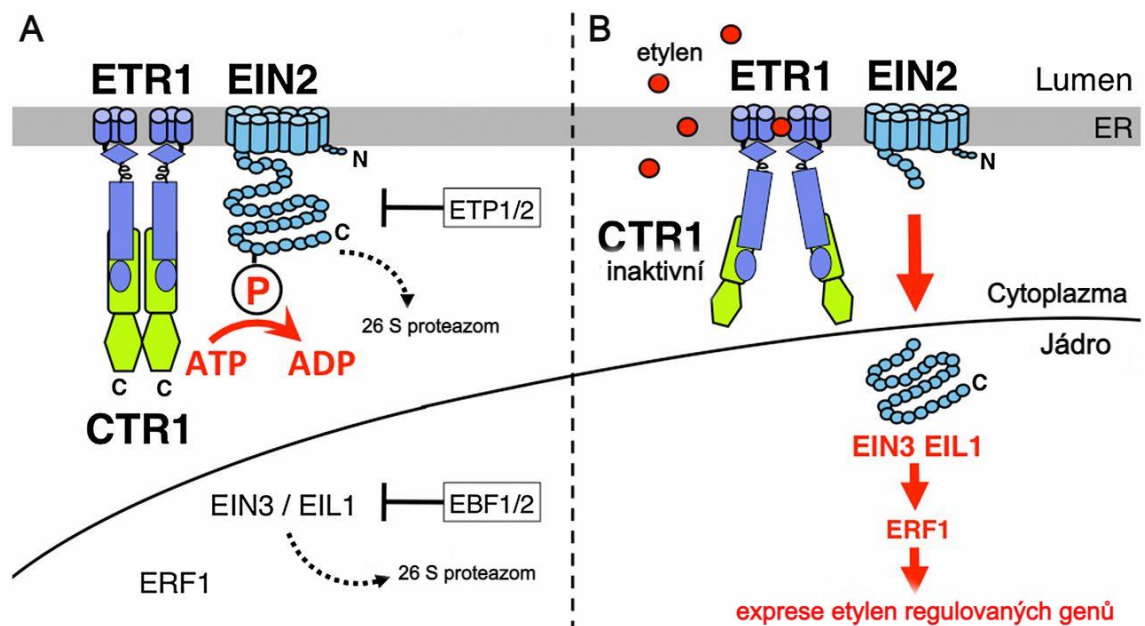
Výchozí sloučeninou biosyntézy ethylenu ve vyšších rostlinách je nepolární aminokyselina methionin. Za katalýzy enzymem S-adenosylmethionin syntetasou (MAT) (EC 2.5.1.6) a s využitím ATP, vzniká prekurzor biosyntézy S-adenosylmethionin (SAM). SAM je konvertován na kyselinu 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou (ACC) pomocí S-adenosyl-L-methionin methylthioadenosin-lyasy (ACC syntasa) (EC 4.4.1.14), exprese ACC je hlavním cílem regulace (Sato & Theologis, 1989). Kromě ACC dochází zároveň k produkci 5'-methylthioadenosinu (MTA), který je pomocí modifikovaného methioninového cyklu (Yangův cyklus) přeměněn zpátky na methionin, čímž může následovat další syntéza ethylenu. ACC podléhá oxidaci prostřednictvím ACC oxidasy (ACO) (EC 1.14.17.4) za vzniku hlavního produktu ethylenu a třech vedlejších produktů, tj. kyseliny kyanovodíkové, oxidu uhličitého a vody. Toxický kyanid je ihned detoxikován, aby se zabránilo jeho akumulaci (Hamilton *et al.*, 1991; Yang & Hoffman, 1984).

Jakmile je ethylen syntetizován difunduje po celé rostlině a váže se na ethylenové receptory. V *A. thaliana* bylo popsáno 5 izoform receptořů: ETR1 (ethylene response 1), ERS1 (ethylene response sensor 1), ETR2, ERS2 a EIN4 (ethylene insensitive 2). Zajímavostí je, že se nacházejí na membráně endoplazmatického retikula (ER), zatímco ostatní receptory fytohormonů jsou lokalizovány na plazmatické membráně. Receptory ethylenu jsou homologní s bakteriálními dvousložkovými receptory s histidin kinasovou aktivitou (Hua & Meyerowitz, 1998; Chen *et al.*, 2002).

V nepřítomnosti ethylenu ETR1 aktivuje serin/threonin proteinkinasu CTR1 (constitutive triple response 1) patřící do rodiny Raf, kinasová doména CTR1 následně fosforyluje C-terminální doménu EIN2. Fosforylace EIN2 působí jako signál pro degradaci EIN2 v proteozomu 26S (Ju *et al.*, 2012) (Obr. 8).

Zatímco v přítomnosti ethylenu jsou receptory i CTR1 neaktivní a k fosforylaci nedochází, C-konec EIN2 se odštěpí a je translokován do jádra, kde pozitivně aktivuje transkripční faktory EIN3 a proteiny podobné EIN3, tj. EIL1 (EIN3-like 1) a EIL2 (Li *et*

al., 2015). EIN3 se váže na promotor genu *ERF1* (*ethylene response factors*) a aktivuje transkripce. Transkripční faktory ERF1 mohou dále interagovat s GCC boxem, DNA motiv spojený s etylenem a patogenem indukovanou genovou expresí, který se nachází v promotoru cílových genů a aktivovat tak etylenovou odpověď (Solano *et al.*, 1998). Biosyntéza i signalizace ethyleny byla popsána bez větších detailů, z toho důvodu, že v experimentální části nebyl pro výzkum použit žádný gen zapojen do signalizace tohoto fytohormonu.



Obr. 8 Model signální dráhy etyleny. A) V nepřítomnosti etyleny, ETR1 na membráně ER aktivuje proteinkinazu CTR1 (dimer), která fosforyluje C-terminální doménu EIN2 a zabraňuje tak její jaderné lokalizaci. Bez etyleny podléhá fosforylovaný EIN2 degradaci v proteazomu 26S zprostředkovanou proteiny F-boxu ETP1/2. Transkripční faktory EIN3/EIL1 také podléhají degradaci v proteazomu 26S zprostředkovanou proteiny F-boxu EBF1/2. B) Pokud je etylen přítomen jsou receptory inaktivovány a proteinkinaza CTR1 není aktivní. EIN2 není fosforylovaný, čímž dochází k odštěpení jeho C-terminální domény, která je translokovaná do jádra, kde aktivuje ERF1 a dochází k expresi etylen regulovaných genů (Ju *et al.*, 2012, upraveno).

2.5.4 Geny spojené s patogenezí

PR geny obecně kódují malé antimikrobiální PR proteiny, které představují velkou skupinu různorodých rostlinných proteinů, které jsou indukované signálními molekulami souvisejícími s obranou nebo samotnými fytopatogeny. Některé kmeny endofytických a saprotrofních hub a bakterií také indukují *PR*, čímž zvyšují odolnost vůči onemocnění. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, po invazi patogenu dochází k aktivaci obranných signálních drah, tj. SA, JA a ET, což vede k akumulaci PR proteinů, jejichž cílem je potlačit negativní vlastnosti patogenů a mírnit tak nástup onemocnění v neinfikovaných částech rostliny (Ali *et al.*, 2018).

Poprvé byly identifikovány v listech tabáků (*Nicotiana tabacum*), který byl infikován virem tabákové mozaiky (TMV), posléze byly postupně identifikovány a izolovány z různých plodin (van Loon & van Kammen, 1970). Nacházejí se ve všech rostlinných orgánech, nejvyšší procento zastoupení je v listech, kde tvoří 5-10 % celkových proteinů, přičemž různé rostlinné orgány produkují různou sadu PR proteinů (van Loon *et al.*, 1994).

Do dnešního dne byla identifikovaná celá řada PR proteinů, které jsou klasifikovány do 17 tříd na základě své podobné aminokyselinové sekvence, molekulové hmotnosti a biologických vlastností, jak je uvedeno (Tab. 1) (Sinha *et al.*, 2014). Podle základních biochemických vlastností se jedná o proteiny s nízkou molekulovou hmotností (6-43 kDa), které jsou teplotně stabilní a odolné vůči proteasam (EC 3.4.-.-) (van Loon *et al.*, 1994). Na základě svých izoelektrických bodů se dále klasifikují do dvou podskupin na kyselé a bazické, přičemž syntéza kyselých forem je aktivovaná SA během SAR, jedná se o geny *PR-1*, *PR-2* a *PR-5*, které jsou sekretovány do extracelulárního prostoru. Naproti tomu JA/MeJA a ET indukují syntézu bazických forem *PR*, tj. *PR-3*, *PR-4* a *PR-12*, ty jsou transportovány do vakuoly (Thomma *et al.*, 1998; van Loon *et al.*, 1994).

Pozoruhodné je, že PR proteiny vykazují různé funkce. Mezi proteiny s antifungální aktivitou se řadí PR1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5 a PR-12. U některých byla popsána i antibakteriální, antivirová, insekticidní či nematocidní aktivita. β -1,3-glukanasa (PR-2) (EC 3.2.1.6), chitinasy (PR-3; PR-4; PR-8; PR-11) (EC 3.2.1.14) nebo peroxidasy (PR-9) (EC 1.11.1.7) navíc vykazují enzymatickou aktivitu (van Loon & van Strien, 1999). Různé transkripční studie ukázaly up-regulaci *PR* genů v mnoha plodinách, které byly

napadeny houbami (Ali *et al.*, 2018). Avšak o molekulárním mechanismu genové exprese *PR* genů je prozatím známo velmi málo.

Tab. 1 Seznam 17 tříd *PR* proteinů, jejich typ a hlavní vlastnost (přepřacováno podle Sinha *et al.*, 2014).

Třída	Typ proteinu	Vlastnosti
PR-1	PR-1a, PR-1b, PR-1c	antifungální
PR-2	β -1,3-glukanasy	štěpí β -1,3-glukany
PR-3	chitinasy typu I, II, IV, V, VI a VII	endochitinasy
PR-4	chitinasy typu I a II	antifungální a chitinasy
PR-5	thaumatin-like proteiny	antifungální
PR-6	proteasový inhibitor I (rajče)	proteasový inhibitor
PR-7	endoproteinasa P (rajče)	endoproteinasa
PR-8	chitinasa (okurka)	chitinasa III
PR-9	peroxidasa tvořící lignin (tabák)	Peroxidasa
PR-10	PR-1, MLP, CSBP, NCS (petržel)	podobná ribonukleasam
PR-11	chitinasa typu V (tabák)	Chitinasa
PR-12	Rs-AFP3 (ředkvička)	Defensin
PR-13	THI2.1 (Arabidopsis)	Thionin
PR-14	protein přenášející lipidy	přenašeč fosfolipidů a mastných kyselin
PR-15	OxOa (ječmen)	oxalát oxidasy
PR-16	OxOLP (ječmen)	podobná oxalát oxidasam
PR-17	PRp27 (tabák)	neznámá

2.5.4.1 Gen *PR-1*

Jako první byl objevený *PR-1*, který má antifungální aktivitu a působí jako molekulární marker SAR. Bylo zjištěno, že se váže na steroly a inhibuje tak růst patogenů (Gamir *et al.*, 2017). Pomocí proteinové sekvence *AtPR-1* bylo identifikováno celkem 11 genů *BdPR-1*, jejichž hladina exprese byla sledována po 24 a 48 h od ošetření SA, JA a ET. U 2 genů se prokázala zvýšená indukce po ošetření JA, 5 genů nevykazovalo zvýšenou expresi a u 4 genů se hladina exprese zvýšila u více jak 2 fytohormonů (Kouzai *et al.*, 2016).

Matušínský *et al.* (2022) sledovali expresi *PR-1* u *Bd* a pšenice po inokulaci *Mb* a infekci patogenem *Fc*. Exprese *PR-1* byla zvýšená po infekci *Fc* 1 dpi (den po infekci) a 2 dpi, zatímco endofyt neprokázal na expresi žádný významný vliv.

2.5.4.2 Gen *PR-2*

PR-2 představují skupinu β -1,3-glukanas, které štěpí β -1,3-glukosidické vazby v β -1,3-glukanu, což je hlavní složka buněčných stěn hub (van Loon & van Strien, 1999). Předpokládá se, že β -1,3-glukanasy a chitinasy přímo degradují stěnu hyf patogenů nebo nepřímo uvolňují krátké fragmenty glukanu z buněčných stěn hub, které jsou dále rozpoznány rostlinami, což vyvolá aktivaci jejich obranných reakcí (Wróbel-Kwiatkowska *et al.*, 2004).

Pasquet *et al.* (2014) zkoumali interakci *Bd*, který byl infikován dvěma kmeny *Fg*: kmenem, který produkoval DON (*Fg* DON⁺) a mutantním kmenem, který nebyl schopen mykotoxin produkovat (*Fg* DON⁻). Při srovnání obou kmenů, byla exprese *PR-2* významně vyšší u *Fg* DON⁺.

2.5.4.3 Gen *PR-6*

Inhibitory proteinas jsou zařazeny do skupiny *PR-6* proteinů, které mají antimikrobiální aktivitu. Jedná se o vysoce stabilní obranné proteiny, které jsou indukovány v reakci na útok hmyzu a patogenů (Glazebrook, 2005). *PR-6* mohou působit tak, že snižují schopnost patogenů využívat své lytické enzymy (Dunaevskii *et al.*, 2005).

2.5.4.4 Gen *PR-9*

PR-9 je skupina peroxidas (van Loon & van Strien, 1999), které mohou přispívat k odolnosti rostli vůči chorobám několika způsoby. Jednak posilují stěny rostlinných buněk ukládáním ligninu, což je obecný obranný mechanismus proti širokému spektru patogenů a jednak se podílí na produkci toxických volných radikálů, jako jsou H₂O₂ (Vance *et al.*, 1980; Way *et al.*, 2000).

Ve výše zmíněné studii Pasquet *et al.* (2014) bylo dosaženo podobných výsledků, jako při sledování exprese *PR-2*. Exprese *PR-9* byla významně vyšší u *Fg* DON⁺.

2.5.4.5 Gen *PR-10*

O proteinech zařazených do třídy *PR-10* je známo, že inaktivují ribozomy a inhibují tak translaci v houbách. Jedná se o malé intracelulární proteiny, kterým chybí signální peptid, proto se nachází v cytoplazmě (van Loon *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2004). U rýže je *PR-10* indukován ET nebo chitinem, u *Bd* bylo nalezeno 5 homologů genů *PR-10*. Kouzai *et al.* (2016) sledovali expresi genu *PR-10* po ošetření SA, JA a ET, která však nebyla těmito

fytohormony nijak ovlivněna. Podobné výsledky našli i Pasquet *et al.* (2014), kdy exprese *BdPR-10* byla vyšší u *Fg* DON⁻.

2.5.4.6 Rostlinné chitiny u *B. distachyon*

Polysacharid chitin (N-acetyl-glukosaminový polymer) je součástí exoskeletu hmyzu, tvoří schránky korýšů a buněčnou stěnu hub. Rostlinné chitiny katalyzují hydrolyzu β -1,4-glykosidických vazeb chitinu, čímž dochází k uvolnění malých chitinových fragmentů (Lin *et al.*, 1995). Chitinové oligomery se během pronikání patogenů uvolňují a jsou rostlinami rozpoznány, čímž dochází k aktivaci MTI. V souladu s tím vede nadměrná exprese chitiny v rostlinách ke zvýšené rezistenci vůči houbovým patogenům. Na základě jejich vlastností se řadí mezi PR proteiny a jsou klasifikovány jako PR-3, PR-4, PR-8 a PR-11 (Jach *et al.*, 1995; Shibuya & Minami, 2001).

Ve studiích s *Bd* po infekci *Fg* se prokázalo, že gen kódující chitinasu, vykazoval vyšší indukci po infekci kmenem *Fg* DON⁺, přičemž nejvyšší hladina exprese genu byla pozorována 96 hai (Pasquet *et al.*, 2014). Matušinský *et al.* (2022) sledovali expresi *BdChitinase1* po inokulaci *Mb* a infekci *Fc*. Exprese *BdChitinase1* byla po infekci *Fc* zvýšená, přičemž byl prokázán i vliv endofytu *Mb* na expresi genu. Při 1 dpi, byla exprese *BdChitinase1* up-regulována.

2.5.4.7 Rostlinné peroxidasy u *B. distachyon*

Peroxidasy (POX) jsou dobře známou třídou PR proteinů patřící do podrodiny PR-9, exprese genů kódujících POX je indukovaná houbami, bakteriemi a viry za účelem zamezení šíření infekce a posílení buněčných stěn, čímž se zvyšuje funkce stěny jako bariéry proti patogenům (van Loon *et al.*, 1994). Řadí se do velké multigenové rodiny, která je na základě strukturních rozdílů rozdělena do třech tříd (I, II a III), které se díky přítomnosti velkého množství izoform účastní řady fyziologických procesů v průběhu celého životního cyklu rostliny (Passardi *et al.*, 2005; Welinder, 1992).

POX třídy III jsou glykoproteiny, jejichž prostetickou skupinou je hem. Ve vyšších rostlinách jsou POX vysoce zastoupeny. Mohou se nacházet buď volně ve vakuolách, nebo mohou být vázány v buněčných stěnách (Passardi *et al.*, 2005). Jejich funkce úzce souvisí s procesem tvorby ligninu a suberinu. Účastní se také vývojových procesů především zesíťování vazeb mezi složkami buněčných stěn nebo metabolismu auxinu. Hrají roli při syntéze fytoalexinu a metabolismu ROS a RNS (Hiraga *et al.*, 2001).

Sandoya & de Oliveira Buanafina (2014) sledovaly expresi *POX2* u rezistentního a citlivého genotypu *Bd* po infekci *S. homoeocarpa*. Exprese genu byla u citlivého genotypu po 24 hpi zvýšena, ale ne významně. Ve srovnání s rezistentním genotypem byla však exprese *POX2* u citlivého genotypu vyšší. V další studii byla sledována exprese genů kódujících POX u *B. distachyon* po napadení muškou *Mayetiola destructor*, která je škůdcem pšenice. Bylo zjištěno, že několik genů kódujících POX bylo down-regulováno, avšak gen *Bradi5g27130* kódující POX byl up-regulován s velmi vysokou expresí (8-9krát ve všech třech časových bodech) a obdobné výsledky byly nalezeny při napadení pšenice stejným organismem (Subramanyam *et al.*, 2019).

2.5.5 Transkripční faktor TCP

Genová rodina *TCP* (*TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF*) je malá skupina rostlinných transkripčních faktorů sdílející TCP doménu, která obsahuje základní helix-loop-helix (bHLH) motiv pomocí něhož dochází k vazbě DNA a k interakci s proteiny (Kosugi & Ohashi, 1997).

Podle sekvence konzervované domény TCP jsou dále rozděleny do dvou tříd: třídy I a třídy II. Třída I. je známá jako PCF (PROLIFERATING CELL FACTOR); třída II známá jako CYC/TB1 (CYCLOIDEA/TEOSINTE BRANCHED 1) (Howarth & Donoghue, 2006). Bylo prokázáno, že členové této rodiny hrají významnou roli při regulaci vývoje a růstu rostlin (Martín-Trillo & Cubas, 2010). Kromě toho se u rostlinných druhů jako jsou *Arabidopsis*, rýže nebo rajčata ukázalo, že na TCP reagují patogenní efekторы, pravděpodobně tak hrají zásadní roli v rostlinné imunitě a toleranci vůči abiotickému stresu (Mukhopadhyay & Tyagi, 2015).

U modelové rostliny *B. distachyon* bylo identifikováno 24 genů kódujících TCP. Obdobný počet genů se nachází u rýže (21) a *Arabidopsis* (24). Transkripty rýže byly většinou exprimovány v pletivech květenství a pestíku, zatímco ortologní geny u *B. distachyon* byly exprimovány v pletivech semen (Francis *et al.*, 2016). Při interakci *B. distachyon* s muškou *Mayetiola destructor* bylo identifikováno 347 genů kódujících transkripční faktory z 26 různých rodin, které na mušku reagovaly. Přičemž transkripčních faktorů TCP u *B. distachyon* bylo identifikováno celkem 6 (Subramanyam *et al.*, 2019).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- kmeny *M. bolleyi* (UPOC-FUN-253–255) pocházejí ze sbírky fytopatogenních mikroorganismů UPOC (Česká republika), byly izolovány z kořenů pšenice, které byly odebrány v průběhu let 2018 a 2019
- kultura *F. culmorum* byla izolována z infikovaných listů *B. distachyon*, který byl pěstován ve skleníku během roku 2019
- písek
- proso (2x sterilizované v autoklávu 120 °C/20 min)
- semena *B. distachyon* (Bd21) byly získány z Joint Genome Institute (<https://jgi.doe.gov>)
- substrát Florcom SV (BB Com, Letohrad, Česká republika)

3.1.2 Chemikálie

- Nuclease-free voda (QIAGEN, Německo)
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika)
- qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, Česká republika)
- RNase AWAY™ Surface Decontaminant (Thermo Scientific, USA)
- RNase-free water (QIAGEN, Německo)
- tekutý dusík
- β-merkptoethanol

3.1.3 Média a roztoky

- 0,05% anilinová modř v laktoglycerolu
- 0,05% Tween 20
- 1% HCl
- 2,5% KOH
- 70% etanol
- Brambora-dextrózový agar (PDA)

3.1.4 Primery

Lyofilizovaný pelet primerů byl rozpuštěn v Nuclease-free vodě, tak aby výsledná zásobní koncentrace byla $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Tab. 2). Pracovní koncentrace primerů byla po dalším naředění $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tab. 2 Sekvence primerů použitých v experimentální části této práce.

Primer	Sekvence primeru od 5' po 3' konec	Publikace
<i>BdPR1-5_F</i>	TACTACACGCACGCCAACAA	Kouzai <i>et al.</i> (2016)
<i>BdPR1-5_R</i>	GTCGTAGAGGCAGAGCGTG	
<i>BdPR2_F</i>	ACATCATGGGCGTCTCCTAC	Pasquet <i>et al.</i> (2014)
<i>BdPR2_R</i>	ACGGGTAGCAGTTGATGAGG	
<i>BdPR6_F</i>	TACCCTCTCAAGCAGTTCA	Pasquet <i>et al.</i> (2014)
<i>BdPR6_R</i>	TAGCCAGTAAACCCCAAT	
<i>BdPR9_F</i>	TCCGACCAGGCTCTCTAC	Pasquet <i>et al.</i> (2014)
<i>BdPR9_R</i>	GGTATGTTCCCATCTTGAC	
<i>BdPR10_F</i>	CCAAGCTCACGGTGGAGTAT	Pasquet <i>et al.</i> (2014)
<i>BdPR10_R</i>	CCTCGACCTTCTTGAGCAAC	
<i>BdPOX2_F</i>	TTCAGCAGCGCCTTTGCTT	Sandoya <i>et al.</i> (2014)
<i>BdPOX2_R</i>	CGAGTTAACCTTGGAGCAGACG	
<i>BdLOX3_F</i>	TCAACTTGCCCTTTCCACATG	Sandoya <i>et al.</i> (2014)
<i>BdLOX3_R</i>	GCAAACCGGATTAACCTCCTGC	
<i>BdChitinase1_F</i>	CAGTGGGGCTACTGCTTCAA	Hong <i>et al.</i> (2008)
<i>BdChitinase1_R</i>	GCTGGTAGTTGGACTGCCCT	
<i>BdWRKY41_F</i>	TCTTCGTCCTCGCTACCATTG	Subramanyam <i>et al.</i> (2019)
<i>BdWRKY41_R</i>	TGACTTCATCTCCATTTCCATCTC	
<i>BdTCP_F</i>	GCGCGTGCATTGGTCTCT	Subramanyam <i>et al.</i> (2019)
<i>BdTCP_R</i>	CCAACAAATTAAGAACAGATCAAAGC	
<i>BdSamDC_F</i>	TGCTAATCTGCTCCAATGGC	Hong <i>et al.</i> (2008)
<i>BdSamDC_R</i>	GACGCAGCTGACCACCTAGA	

3.1.5 Použité soupravy

- RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Německo, Cat. No. 74904)

- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo, cat. No. 05081955001)
- RNase free DNase Set (QIAGEN, Německo)

3.1.6 Přístrojové vybavení a laboratorní pomůcky

- Analytické váhy AE 24 Q (Mettler-Toledo, Švýcarsko)
- Autokláv VX-55 (Systec, Německo)
- Automatické pipety (Thermo Scientific, USA)
- Centrifuga 5415D (Eppendorf, Německo)
- Cyklyer Real-Time PCR CFX Connect (BIO-RAD, USA)
- Flow-box (Merci, Česká republika)
- Homogenizátor MM301 (Retsch, Německo)
- Mikrocentrifuga MiniStar silverline (VWR, USA)
- Mikroskop DP73 WDR (Olympus, Japonsko)
- Qubit (Thermo Scientific, USA)
- Spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, USA)
- Stripy (BIO-RAD, USA)
- Termocyklyer Vapo.Protect Mastercycler® Pro (Eppendorf, Německo)
- Termostat Mixing Block MB-102 (BIOER, Čína)
- Vortex 1 Shaker (IKA, Německo)
- a další pomůcky oddělení Katedry botaniky

3.1.7 Software pro vyhodnocení výsledků

- CFX Manager 3.0 software (Bio-Rad)
- Microsoft Excel verze 2208
- Statistica 12

3.2 Metody

3.2.1.1 Příprava *M. bolleyi* k inokulaci obilí *B. distachyon*

Byly použity 3 izoláty ze sbírky fytopatogenních mikroorganismů UPOC. Izoláty *M. bolleyi* pocházejí z kořenů pšenice (*Triticum aestivum*), které byly odebrány na území České republiky. Izoláty byly odebrány v průběhu let 2018 a 2019. Jako médium pro napěstování inokula bylo využito prosa. Před kultivací *Mb* se semena prosa bylo nejprve 200 g semen vloženo do sterilizačních sáčků, do kterých se přidalo 100 ml destilované vody. Semena prosa byla dvakrát sterilizovaná vodní parou v autoklávu při 120 °C po dobu 20 minut. Následně bylo prosa rozděleno na 2 části. První část neobsahovala endofyt a byla označena jako „Mb0“, ke druhé části byl přidán agar, obsahující endofyt (3 izoláty *Mb* byly kultivovány odděleně), která byla označena jako „Mb1“. Kultivace na prosu probíhala 3 týdny při 20 °C ve tmě. Po třech týdnech byly 3 izoláty, které se nejprve kultivovaly odděleně, smíchány dohromady.

3.2.1.2 Příprava *F. culmorum* k infekci listů

Izolát *F. culmorum* byl získán z infikovaných listů *B. distachyon*, který byl pěstován ve skleníku během roku 2019. Kultura byla kultivována na Petriho miskách s bramboro – dextrozovým agarem (PDA) při 18 ± 2 °C ve tmě. Inokulum bylo kultivováno po dobu 2 týdnů pod UV-B světlem při 18 °C.

Následně se pomocí sterilní očkovací kličky setřely z povrchu agaru makrokonidie, které byly přeneseny do sterilní destilované vody. Finální roztok pro následnou infekci listů byl připraven pomocí Bürkerovy komůrky v koncentraci 5×10^5 konidií.ml⁻¹.

3.2.2 Založení experimentu ve skleníku

3.2.2.1 Výsev semen *B. distachyon* a jejich inokulace endofytickým organismem *M. bolleyi*

Semena *B. distachyon* linie Bd21 byla získána z Joint Genome Institute (<https://jgi.doe.gov/>). Celkem bylo připraveno 20 květináčů, které byly naplněny substrátem, na jehož povrch bylo vloženo vždy 10 obilek *B. distachyon* (Obr. 9).



Obr. 9 Založení experimentu ve skleníku. Zasetí 10 obilek *B. distachyon* do výsevního substrátu. Foto: Bc. Andrea Radková

Rostliny byly inokulovány endofytem *M. bolleyi* již během setí (Obr. 10). Do prvních 10 květináčů se semínky *B. distachyon* bylo přidáno cca 2,5 g prosa (na květináč), které neobsahovalo endofyt *Mb* a bylo označeno jako „BdMb0“. Do dalších 10 květináčů bylo přidáno stejné množství prosa, které endofyt *Mb* obsahovalo a bylo označeno jako „BdMb1“. Na povrch inokula se následně přidal substrát (cca 0,5 cm) a květináče byly zality vodou. Rostliny byly udržovány při skleníkové teplotě a každý týden byly zalévány dostatečným množstvím vody pro jejich růst.



Obr. 10 Inokulace semen *B. distachyon* endofytickým organismem *M. bolleyi* během setí. Do květináčů obsahující výsevni substrát bylo na povrch přidáno proso, které buď obsahovalo endofyt (Mb1) nebo neobsahovalo endofyt (Mb0). Foto: Bc. Andrea Radková

3.2.2.2 Infekce listů *B. distachyon* patogenním organismem

F. culmorum

Ve fázi druhé odnože u *B. distachyon* (41 dní od vysetí) byla provedena infekce druhého horního listu. Infikováno bylo vždy 5 květináčů varianty „BdMb0“ (bez endofytu) a 5 květináčů varianty „BdMb1“ (s endofytem). Tato metoda je modifikací metody, kterou používali Peraldi *et al.* (2011).

Na svrchních stranách listů stlačením Pasterovy pipety došlo k poranění ve dvou polohách. Na poraněnou část, která měla tvar kružnice se nanoslo 5 μ l suspenze konidií *F. culmorum* (5×10^5 konidií.ml⁻¹) společně s 0,05% Tween 20. 5 květináčů varianty „BdMb0“ bylo následně označeno jako „BdMb0F1“ a dalších 5 infikovaných květináčů varianty „BdMb1“ byly po infekci označeny jako „BdMb1F1“.

Kontrolní inokulace zbylých 5 květináčů varianty „BdMb0“ a 5 květináčů varianty „BdMb1“ byla provedena stejným způsobem za použití 5 μ l sterilní destilované vody a 0,05% Tween 20. Varianty byly následně označeny jako „BdMb0F0“ a „BdMb1F0“ (tedy bez *F. culmorum*). Následně byly všechny varianty rostlin (BdMb0F0; BdMb0F1;

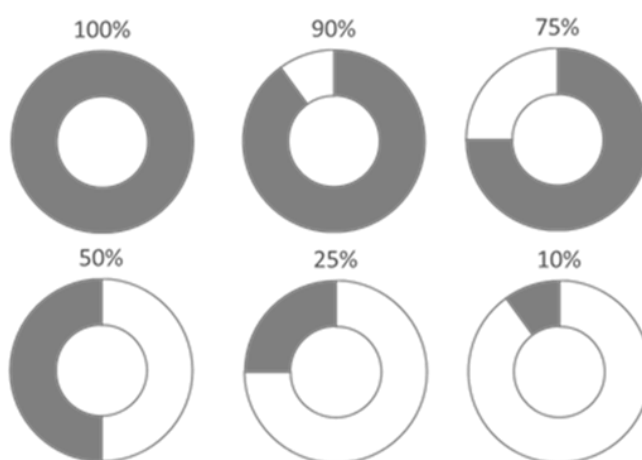
BdMb1F0 a BdMb1F1) vloženy pod plastový obal, aby se zvýšila relativní vlhkost a vytvořily se vhodné podmínky pro rozvoj onemocnění. Plastový obal byl odstraněn 2 dpi (2. den po infekci).

3.2.2.2.1 Odběr listů *B. distachyon* pro izolaci RNA

První den po infekci (1 dpi) byly odebrány vzorky listů a vloženy do tekutého dusíku pro následnou extrakci RNA. Za 48 hodin od infikování (2 dpi) byl odebrán další vzorek listu, který byl opět vložen do tekutého dusíku pro extrakci RNA. Poslední odběr byl uskutečněn 8 dpi stejným způsobem jako u předchozích odběrů, kdy už byly na listech *B. distachyon* pozorovány první symptomy onemocnění. Odebírány byly vždy 3 vzorky listů ze všech variant, tj. BdMb0F0; BdMb0F1; BdMb1F0 a BdMb1F1, v konečném výsledku jsme měli tedy 12 vzorků při každém odběru. Z tekutého dusíku byly všechny vzorky vloženy do mrazáku a udržovány při teplotě -80 °C.

3.2.2.2.2 Odběr listů *B. distachyon* pro vyhodnocení symptomů onemocnění

Po 8 dpi byly odebrány vzorky listů *B. distachyon* ze všech variant, pro vizuální vyhodnocení symptomů onemocnění. Procento napadení pletiv bylo hodnoceno na svrchní straně infikovaných listů podle schématu (Obr. 11) (Matušínský *et al.*, 2022), následně byla data zaznamenána a zpracována pomocí MS Excel verze 2208. Statistické vyhodnocení dat bylo zpracováno analýzou rozptylu (ANOVA) ve spojení s Tukeyho post hoc testem ($P < 0,05$) pomocí softwaru Statistica 12.



Obr. 11 Schéma pro vyhodnocení procenta nekrotizace na listech u variant BdMb0F1 a BdMb1F1 (hodnota udává procento nekrotizované části kruhového poranění).

3.2.2.2.3 Odběr vzorků *B. distachyon*

Po měsíci od setí byl proveden 1. odběr rostlin a odběr kořenů pro světelnou mikroskopii (Obr. 12). Odběr kořenů se provádí z důvodu potvrzení endofytu *Mb* v podzemní části rostliny a také pro zjištění, zda má přítomnost endofytu vliv na růstovou fázi rostliny. K popisu vývojového a růstového stádia obou variant (BdMb0 a BdMb1) byla použita fenologická stupnice BBCH (Biologische Bundesantalt, Bundessortenamt a Chemische Industrie). Využita byla metodika adaptovaná pro *B. distachyon* podle Hong *et al.*, (2011).

Při každém odběru (celkem 5 odběrů) bylo odebráno 6 rostlin varianty BdMb0 a 6 rostlin varianty BdMb1, u kterých byla zaznamenána růstová fáze. Následně byly kořeny důkladně očištěny vodou a byla změřena délka prýtlů a délka kořenů.

U třech rostlin varianty BdMb0 a třech rostlin varianty BdMb1 se ustříhly kořeny a část stébla (cca 1,5 cm nad kořenovým krčkem), které byly vloženy a fixovány v 70 % ethanolu. Tyto kořeny byly dále použity pro světelnou mikroskopii. Zbývající tři rostliny varianty BdMb0 a tři rostliny varianty BdMb1 byly vloženy do papírového sáčku pro izolaci DNA. Další odběry (č. 2, 3, 4, 5) byly provedeny vždy po měsíci stejným způsobem.



Obr. 12 První odběr vzorků rostlin *B. distachyon* varianty BdMb1. První tři rostliny k izolaci DNA, u zbylých třech byly ustříženy kořeny, které byly mikroskopovány pro ověření přítomnosti endofytického organismu *M. bolleyi*. Foto: Bc. Andrea Radková

3.2.2.3 Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie byla provedena za účelem potvrzení kolonizace kořenů rostlin *B. distachyon* endofytickým organismem *M. bolleyi*. Vždy byly použity tři kořeny rostlin varianty BdMb0 (abychom si potvrdili nepřítomnost *Mb*) a tři kořeny rostlin varianty BdMb1 z odběrů č. 1, 2, 3, 4, a 5, které byly před mikroskopováním fixovány v 70 % ethanolu.

Následně byly přečištěny v 2,5% KOH po dobu 3 dnů a okyseleny v 1% HCl. Poté byly obarveny 0,05% anilínovou modří a vloženy do laktoglycerolu (Bleša *et al.*, 2021). Kořeny byly nastříhány na výslednou délku cca 1 cm. Preparát byl připraven vložením kořenů na podložní sklíčko, ke kterému bylo přidáno pár kapek vody a následně přikryto krycím sklíčkem. Mikroskopování bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu při zvětšení 200×.

3.2.2.4 Izolace RNA pomocí RNeasy Plant Mini Kitu

RNA byla izolována pomocí RNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN, Německo) podle pokynů výrobce. Nejprve byl ve flowboxu připraven RLT pufr smícháním 450 μ l RLT pufru s 4,5 μ l β -merkaptoetanolem (na 1 vzorek) a DNasa.

DNasa je důležitá pro odstranění zbytkové genomové DNA, která by mohla způsobit nespecifickou PCR amplifikaci. Byla připravena následujícím způsobem: do zkumavky s DNAsou (nachází se v RNase free DNase setu) bylo napipetováno 500 μ l RNase free vody (přiložená v kitu). Poté se nádoba zavřela a pomalu protřepala, aby se lyofilizovaná DNasa úplně rozpustila. Následně se objem nádobky přepipetoval do 200 μ l zkumavek po 20 μ l a vložil do mrazáku při -20°C. K 20 μ l DNasy se přidalo 140 μ l RDD pufru, obsah byl špičkou opatrně promýchán a vložen opět do chladu.

Před izolací RNA byla pracovní plocha nejdříve ošetřena pomocí RNase AWAY™ Surface Decontaminant, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků RNAsami. Vzorky obsahující listy *B. distachyon* byly vyjmuty z mrazničky a vloženy do tekutého dusíku. Do každé zkumavky byla přidána skleněná kulička a 450 μ l předem připraveného RLT pufru. Vzorky byly zvortexovány a vloženy do homogenzátoru při frekvenci 4 M/S po dobu 1 min. Inkubace v termostatu při 56 °C po dobu 2 min.

Po inkubaci se celý obsah zkumavek přemístil do fialových zkumavek pomocí špiček s odstříhnutými konci. Následovala centrifugace 10 min při 13 200 rpm. Supernatant byl po 100 μ l přepipetován do 1,5ml zkumavek na výsledný objem 300 μ l. Do zkumavky

bylo přidáno poloviční množství objemu (150 μ l) 96% ethanolu a obsah byl pomocí špičky promýchán. Homogenní roztok byl přepipetován do růžové kolonky. Centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Po centrifugaci se kolonka přenesla na 2ml sběrnou zkumavku a přidalo se 350 μ l RW1 pufru. Opět následovala centrifugace 1 min při 13 000 rpm.

Na absorpční membránu bylo napipetováno 78 μ l předem připravené DNasy. Inkubace při pokojové teplotě po dobu 15 min. Po inkubaci byl znovu přidán RW1 pufr o objemu 350 μ l, následovala centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Po skončení centrifugace byla kolonka přemístěna na novou 2ml zkumavku a k roztoku se přidalo 500 μ l RPE pufru. Centrifugace 1 min při 13 000 rpm. Kolonka byla poté znovu přemístěna na novou zkumavku a centrifugovaná 1 min při maximální rychlosti, aby se odstranil zbytek ethanolu.

Poté byla kolonka přemístěna na 1,5ml zkumavku, přidalo se 60 μ l RNase free vody a následovala centrifugace 1 min při 10 000 rpm. Po skončení byla zkumavka obsahující RNA přemístěna na led, byla změřena výsledná koncentrace na Nanodropu a poté byla uložena do mrazáku na -70 °C.

3.2.2.5 Příprava cDNA z vyizolované RNA

Zkumavky s vyizolovanou RNA byly vyjmuty z mrazáku a vloženy na led, aby se částečně rozmrazily. cDNA byla nasyntetizována pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo) podle pokynů výrobce.

Do každé zkumavky byl napipetován 1 μ l Anchored oligo (dT) primeru (50 pmol. ml^{-1}) a 2,4 μ l destilované vody (na jeden vzorek). Roztok byl zvortexován a zcentrifugován na stolní centrifuze. Poté bylo do každé zkumavky napipetováno 25 μ l izolované RNA a opatrně špičkou promýcháno. Zkumavky byly vloženy do cykleru nastaveného na program RNA1, kde byly inkubovány 10 min při teplotě 65 °C. V tomto kroku dochází k denaturaci sekundárních struktur RNA a navázání primeru.

Po skončení inkubace byly zkumavky vloženy opět na led a postupně k nim byly přidávány další složky pro reverzní transkripci. Reakční směs obsahovala Protector RNase inhibitor (20 U), Deoxynucleotide Mix (1 mmol. l^{-1} každý), DTT (5 mmol. l^{-1}), Transcriptor High Fidelity reverzní transkriptasu (22 U) a 5x Transcriptor High Fidelity reakčního pufru pro reverzní transkriptasu (1x 8 mmol. l^{-1} MgCl_2) (Tab. 4). Po přidání poslední reakční složky byl obsah pomocí špičky opatrně promýchán a zkumavky byly

vloženy do cykleru, kde byly inkubovány 30 min při teplotě 45 °C a následně 5 min při 85 °C, kdy došlo k deaktivaci reverzní transkriptasy. Program byl nastaven na RNA2.

Koncentrace byla změřena pomocí Qubit fluorometrické kvantifikace. Vzorky cDNA byly ředěny samostatně na výslednou koncentraci 5 ng.μl⁻¹. Získaná cDNA byla následně vložena do mrazáku při -20 °C.

Tab. 3 Přehled reakčních složek pro přípravu cDNA z RNA.

Složka	Objem [μl]
RNA	25
Anchored-oligo (dT) 18 primer (50 pmol.ml ⁻¹)	1
Destilovaná voda	2,4
Celkový objem	28,4 μl

Tab. 4 Přehled reakčních složek použitých pro reverzní transkripci.

Složka	Objem [μl]
Protector RNase inhibitor (20 U)	0,5
Deoxynucleotide Mix (1 mmol.l ⁻¹)	2
DTT (5 mmol.l ⁻¹)	1
Transcriptor High Fidelity reverzní transkriptasa (22 U)	1,1
5x Transcriptor High Fidelity reakční pufr pro reverzní transkriptasu (1x 8mmol.l ⁻¹ MgCl ₂)	4
Celkový objem (na jeden vzorek)	8,6 μl

3.2.2.6 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Genová exprese 10 genů fytohormonových markerů (Tab. 2) byla analyzovaná kvantitativní real-time PCR (qPCR) s kvantifikací amplifikovaných DNA fragmentů pomocí fluorescenčního DNA barviva SYBR Green (Ponchel *et al.*, 2003).

Použité primery byly nejprve naředěny Nuclease-free vodou na výslednou koncentraci 10 μmol.l⁻¹. Poté byl připraven premix podle Tab. 5 smícháním 5,1 μl Nuclease-free vody s 7,5 μl 2x SYBR Green Master Mix (na jeden vzorek), vzniklý roztok byl zvortexován a centrifugován na stolní centrifuze. Objem premixu byl rozpipetován stejným dílem do dvou zkumavek, do kterých bylo přidáno 0,2 μl příslušného forward (fw) (10 μmol.l⁻¹) a 0,2 μl reverse primeru (rev) (10 μmol.l⁻¹). Jako referenční gen byl použit *BdSamDC* (S-adenosylmethionin dekarboxylasa) (Hong *et al.*, 2008). Zkumavky byly zvortexovány a centrifugovány.

Poté se připravila PCR destička, na kterou se vložily stripy, do každé mikrozukumavky bylo aplikováno 13 μl připraveného premixu a 2 μl cDNA vzorků

(5 ng.μl⁻¹) každé varianty (tj. BdMb0F0; BdMb0F1; BdMb1F0 a BdMb1F1) ve třech opakováních. Do kontrolních vzorků se místo cDNA přidaly 2 μl vody.

Vzorky byly centrifugovány a vloženy do PCR cyklieru. Program pro qPCR byl nastaven dle Tab. 6. Vzhledem k tomu, že byla použita metoda založená na SYBR Green, bylo nutné ověřit specifčnost primerů a přítomnost primer dimerů byla ověřena analýzou křivky tání. Po provedení qPCR byla získaná data analyzovaná pomocí metody $2^{-\Delta\Delta C_q}$ se softwarem CFX Manager 3.0. Reakce byla provedena v triplicátech ve dvou biologických opakováních. Rozdíly v hladinách exprese analyzovaných genů byly vyhodnoceny Tukeyho testem ($P < 0,05$).

Tab. 5 Přehled reakčních složek použitých pro qPCR reakci.

Složka	Objem [μl]
Nuclease-free voda	5,1
2x SYBR Green Master Mix	7,5
Fw primer (10 μmol.l ⁻¹)	0,2
Rev primer (10 μmol.l ⁻¹)	0,2
cDNA (5 ng.μl ⁻¹)	2
Celkový objem	15 μl

Tab. 6 Nastavení podmínek qPCR reakce a analýzy křivek tání.

Fáze	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Úvodní denaturace	95	180
2. Denaturace	95	10
3. Annealing	60	30
4. Elongace	72	20
5. Analýza křivek tání	95	10
	65	0,05
	95	0,5

Fáze 2-4 byla opakována 39x.

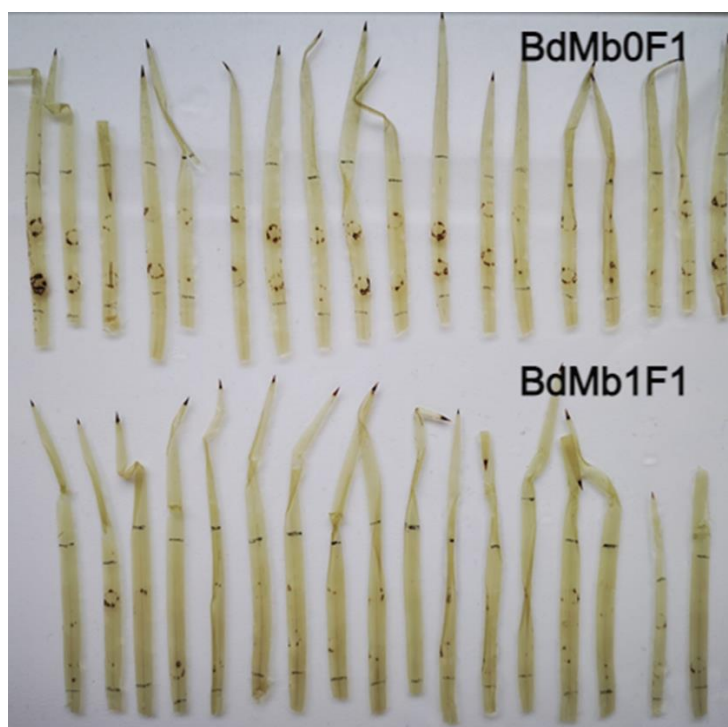
4 VÝSLEDKY

4.1 Vliv endofytu *M. bolleyi* na mírnění symptomů onemocnění

Obilky *B. distachyon* byly při setí do květináčů inokulovány endofytickým organismem *M. bolleyi* (3.2.2.1), následně proběhla infekce patogenní houbou *F. culmorum* (3.2.2.2) Další den (1 dpi) byly odebrány vzorky listů pro izolaci RNA (3.2.2.4), další odběry byly provedeny 2 dpi a 8 dpi (3.2.2.2.1).

Při 8 dpi byly rovněž odebrány infikované listy (3.2.2.2.2). Experiment byl proveden z důvodu potvrzení vlivu endofytu *Mb* na zpomalení nástupu onemocnění a celkového mírnění symptomů. Intenzita napadení byla hodnocena vizuálně podle schématu (viz obr. 11; 3.2.2.2.2).

Rozdíl mezi variantami BdMb0F1 a BdMb1F1 byl viditelný pouhým okem (Obr. 13). Bylo zaznamenáno procento nekrotizace na jednotlivých listech variant BdMb0F1 a BdMb1F1. Zatímco u varianty BdMb0F1 byly pozorovány značně poškozené listy, pletiva byla tmavá a postupně docházelo k nekrotizaci. U listů varianty BdMb1F1 byl potvrzen příznivý vliv endofytu *M. bolleyi*. Nástup onemocnění značně zpomalil, symptomy onemocnění byly mírnější a ke ztmavnutí pletiv docházelo jen velmi zřídka.



Obr. 13 Sledování vlivu endofytu *M. bolleyi* na rozvoji symptomů onemocnění po infekci listů *B. distachyon* patogenní houbou *F. culmorum*. Varianta BdMb0F1 – bez endofytu *M. bolleyi*; varianta BdMb1F1 – za přítomnosti endofytu *M. bolleyi*. Foto: Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.

4.1.1 Statistické vyhodnocení symptomů onemocnění na listech *B. distachyon*

Po vizuálním hodnocení napadení infikovaných listů byla získaná data statisticky zpracována pomocí testů ANOVA ve spojení s Tukeyho post hoc testem ($P < 0,05$) pomocí softwaru Statistica 12 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, USA).

Z tab. 8 je patrné, že procento nekrózy se statisticky významně lišilo v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti endofytu *M. bolleyi* ($F = 32,3872$; $P = 0,000$). V přítomnosti endofytu byla p-hodnota menší než zvolená hladina významnosti 0,05, jedná se o statisticky vysoce významný rozdíl (neplatí nulová hypotéza). U varianty BdMb0F1 činila nekrotizace 39,30 %, zatímco u varianty BdMb1F1 byly listy zasaženy nekrotizací pouze z 5,58 % (Tab. 7). Výsledky potvrdily význam endofytu při mírnění symptomů onemocnění, jelikož rostliny bez endofytu, tj. varianta BdMb0F1 byly významně vážněji infikované než rostliny, které byly endofytem inokulovány, tj. varianta BdMb1F1.

Tab. 7 Získané výsledky vizuálního vyhodnocení příznaků na listech.

Varianta	Počet vzorků	Napadení [%]	Směrodatná chyba	Interval spolehlivosti - 0,95	Interval spolehlivosti + 0,95
BdMb0F1	36	39,30	4,1517	31,2321	47,8304
BdMb1F1	34	5,58	4,2655	-2,8703	14,1828

Tab. 8 Získané výsledky testu ANOVA.

Zdroj variability	SS	Stupeň volnosti	MS	F	P
Endofyt	19848,9200	1	19848,9200	32,3872	0,0000
Opakování	787,0300	3	262,3400	0,4281	0,7336
Celkem	37997,5000	62	612,8600		

Nulová hypotéza byla zamítnuta z toho důvodu byla provedena post hoc analýza, kdy byl použit Tukey-HSD test. Při porovnání obou variant (BdMb1F1 a BdMb0F1) byl evidován statisticky signifikantní rozdíl (Tab. 9).

Při porovnání procenta napadení napříč jednotlivými opakováními (1, 2, 3 a 4) nebyl podle Tukey-HSD testu evidován statisticky významný rozdíl (Tab. 10), i když se procento napadení lišilo.

Tab. 9 Získané výsledky Tukey-HSD testu pro varianty BdMb1F1 a BdMb0F1.

Varianta	Napadení [%]	Tukey-HSD test; $\alpha = 0,05$
BdMb1F1	5,58	a
BdMb0F1	39,30	b

Tab. 10 Získané výsledky Tukey-HSD testu pro jednotlivé květináče.

Květináč	Napadení [%]	Tukey-HSD test; $\alpha = 0,05$
1	22,25	a
2	23,05	a
3	28,12	a
4	18,43	a

4.2 Vliv endofytu *M. bolleyi* na růstovou fázi *B. distachyon*

Po měsíci od setí proběhl první odběr vzorků *B. distachyon* pro vyhodnocení růstové fáze a odběr kořenů (3.2.2.2.3) pro světelnou mikroskopii (3.2.2.3). K popisu růstových fází variant BdMb0 (6 rostlin) a BdMb1 (6 rostlin) byla použita stupnice BBCH podle Hong *et al.*, 2011. Byla zaznamenána délka prýtů a délka kořenů obou variant při pěti odběrech (březen-červenec 2022). Určení růstové fáze bylo provedeno za účelem zjištění, zda má přítomnost endofytu *M. bolleyi* vliv na vývoj či rychlost růstu *B. distachyon*.

Z tab. 11 je patrné, že přítomnost endofytu *M. bolleyi* v kořenových pletivech *B. distachyon* urychluje jeho růst a celkový vývoj. Rostliny varianty BdMb1 se při většině odběrech nacházely v pozdější růstové fázi, než byla pozorována u rostlin varianty BdMb0. Co se týká celkového růstu rostliny, ve většině případů měly varianty BdMb1 delší jak nadzemní, tak podzemní část, ale rozdíly v porovnání s variantou BdMb0 nebyly nijak velké. Při 4. odběru se již u obou variant vyskytovaly klásky, kdy vyšší počet klásků se nacházel u varianty BdMb1.

Tab. 11 Odběry vzorků variant BdMb0 a BdMb1 pro porovnání průměrné délky prýtů, kořenů a růstové fáze, ve které se nacházely.

Varianta	Odběr	Ø Délka prýtů [cm]	Ø Délka kořenů [cm]	Růstová fáze
BdMb0	1.	14,23	12,21	1.-2. odnož
	2.	22,00	15,70	3.-5. kolénko
	3.	31,08	11,41	7.-9. kolénko
	4.	43,41	9,33	zrání
	5.	48,33	12,33	zralost
BdMb1	1.	15,16	14,08	2.-3. odnož
	2.	19,50	13,75	3.-5. kolénko
	3.	31,08	9,91	8.-9. kolénko
	4.	48,33	11,00	zrání
	5.	55,16	12,16	zralost

4.3 Ověření úspěšné inokulace *M. bolleyi* pomocí mikroskopování

Úspěšná inokulace *B. distachyon* endofytickou houbou *M. bolleyi* byla ověřena pomocí světelné mikroskopie (3.2.2.3) byla potvrzena přítomnost chlamydospor *M. bolleyi* v kořenových pletivech *B. distachyon* u variant BdMb1 (Obr. 14). Naopak u variant BdMb0 bylo ověřeno, že se chlamydospory *M. bolleyi* v pletivech kořene *B. distachyon* nenachází. V tab. 8 jsou zaznamenány výsledky mikroskopování vždy kořenů třech rostlin varianty BdMb0F0 a kořenů třech rostlin varianty BdMb1F0. Mikroskopický rozbor byl proveden celkem 5x, vždy v rozmezí 1 měsíce.



Obr. 14 Mikroskopický snímek znázorňující kořen *B. distachyon*, ve kterém jsou přítomny chlamydospory *M. bolleyi*. Měřítko 100 μm (3. odběr, květen 2022). Foto: Mgr. Pavel Matušinský Ph.D.

Tab. 12 Mikroskopický rozbor (počet mikroskopovaných rostlin/počet pozitivních na přítomnost Mb)

	BdMb0F0	BdMb1F0
1. odběr	3/0	3/3
2. odběr	3/0	3/3
3. odběr	3/0	3/3
4. odběr	3/0	3/3
5. odběr	3/0	3/3

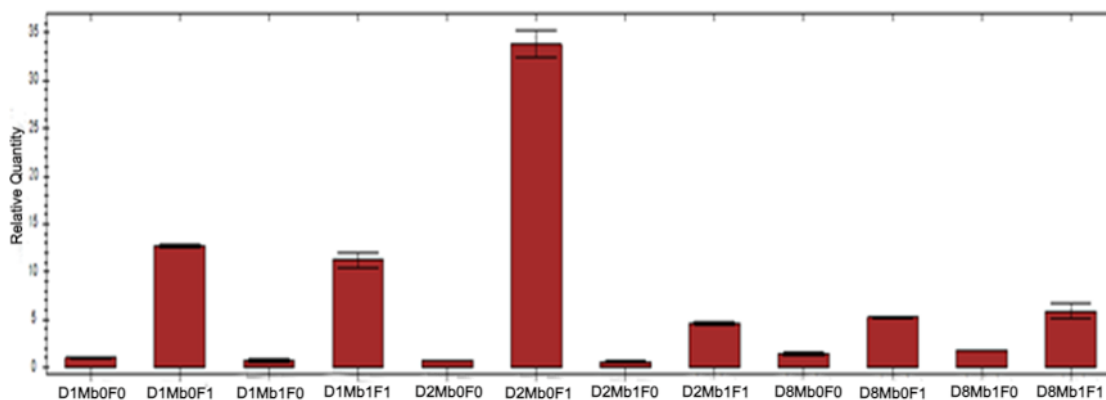
4.4 Analýza exprese markerových genů zapojených do obrany rostlin

RNA byla z rostlin izolovaná 1 dpi, 2 dpi a 8 dpi (3.2.2.4), následně byla přeřpsaná do cDNA (3.2.2.5) a pomocí analýzy qPCR (3.2.2.6) byla sledována genová exprese

vybraných 10 genů (Tab. 2), jejichž exprese byla vztažena k referenčnímu genu *BdSamDC*. U analyzovaných genů bylo na základě literatury zjištěno, že jsou zapojeny do obrany *B. distachyon* před patogeny (3.2.2.2). Cílem bylo otestovat hladinu exprese po inokulaci endofytickou houbou *M. bolleyi* (3.2.2.1). Bylo sledováno několik parametrů, jednak jak expresi ovlivňuje samotný patogen *F. culmorum* (1 dpi; 2 dpi; 8 dpi) (varianta BdMb0F1) oproti kontrole (varianta BdMb0F0); jak expresi ovlivňuje přítomnost endofytu *M. bolleyi* v kořenových pletivech *B. distachyon* (1 dpi; 2 dpi; 8 dpi) (varianta BdMb1F0) oproti kontrole (varianta BdMb0F0) a jaký vliv má na expresi kombinace patogenu *F. culmorum* za přítomnosti endofytu *M. bolleyi* (1 dpi; 2 dpi; 8 dpi) (varianta BdMb1F1) oproti variantě pouze s patogenem bez endofytu (BdMb0F1). Statistické vyhodnocení genové exprese bylo provedeno pomocí CFX Manager 3.0 software.

4.4.1 Expresa genu *BdPRI-5*

BdPRI-5 se řadí do rodiny genů spojených s patogenezí, které jsou nejčastěji indukovány SA. Za statisticky významný rozdíl bylo považováno $P < 0,05$, čehož bylo dosaženo v přítomnosti patogenu *Fc* (porovnáním variant BdMb0F0 vs. BdMb0F1). Expresa *BdPRI-5* byla up-regulovaná při 1 dpi ($P = 0,0026$) a 2 dpi ($P = 0,0065$) (Obr. 15). V druhém případě byl sledován vliv *Mb* na expresi genu *BdPRI-5*, kdy jsme sledovali varianty bez patogenu *Fc*, tj. BdMb0F0 vs. BdMb1F0. V ani jednom časovém intervalu nebyla změna exprese statisticky významná ($P = 0,0803$). Ve třetím případě byl sledován vliv *Mb* na expresi genu *BdPRI-5* v přítomnosti patogenu *Fc* porovnáním variant BdMb0F1 vs. BdMb1F1. I v tomto případě neměla přítomnost *Mb* na expresi statisticky významný vliv ($P = 0,6982$). Průměrná hodnota FD (*fold difference* neboli relativní rozdíl v expresi) byla nejvyšší při zkoumání vlivu patogenu *Fc* na expresi (FD = 11,73) (Tab. 13). Expresa genu *BdPRI-5* v přítomnosti *Fc* byla 11,73x vyšší oproti kontrole (BdMb0F0). Další hodnoty FD nebyly statisticky významné.



Obr. 15 Relativní genová exprese *BdPRI-5*. Expresse byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant BdMb0F0; BdMb0F1; BdMb1F0 a BdMb1F1. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

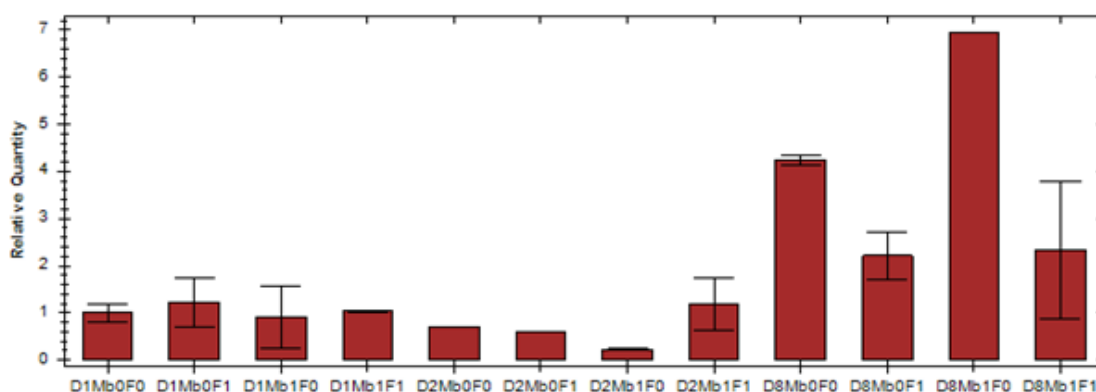
Tab. 13 Statistická analýza genové exprese *BdPRI-5*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	12,70	0,0026	42,28	0,0065	3,54	0,8776	11,73	0,0081
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	0,83	0,0803
Mb0F1 vs. Mb1F1	0,88	0,2734	0,14	0,7258	1,14	0,3182	0,52	0,6982

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první, druhý a osmý den po infekci patogenem; BdMb0F0 - kontrola bez endofytu a bez patogenu, BdMb0F1 - varianta bez endofytu s patogenem, BdMb1F0 - varianta s endofytem bez patogenu, BdMb1F1 - varianta s endofytem i patogenem

4.4.2 Expresse genu *BdPR2*

Výsledky qPCR analýzy pro gen *BdPR2*, který je rovněž indukovaný SA, ukázaly zvýšenou expresi při 8 dpi u všech variant (Obr. 16). Prvním sledovaným parametrem byl vliv *Fc* na expresi *BdPR2* porováním variant BdMb0F0 vs. BdMb0F1. V přítomnosti patogenu *Fc* byla exprese up-regulovaná při 1 dpi ($P = 0,9119$), v žádném časovém intervalu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ($P = 0,8267$). V přítomnosti endofytu *Mb* při porovnání variant bez patogenu *Fc*, tj. BdMb0F0 vs. BdMb1F0 nebyl rovněž prokázán statisticky významný rozdíl ($P = 0,6963$). Vliv endofytu *Mb* byl pozorován i ve třetím případě porovnáním variant s patogenem (BdMb0F1 vs. BdMb1F1). Stejně jako u předchozích kombinací neměl endofyt statisticky významný vliv na expresi genu *BdPR2* ($P = 0,4063$). Nejvyšší průměrná hodnota FD byla při porovnání variant BdMb0F1 vs. BdMb1F1 (FD = 1,06) (Tab. 14).



Obr. 16 Relativní genová exprese *BdPR2*. Exprese byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant BdMb0F0; BdMb0F1; BdMb1F0 a BdMb1F1. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

Tab. 14 Statistická analýza genové exprese *BdPR2*.

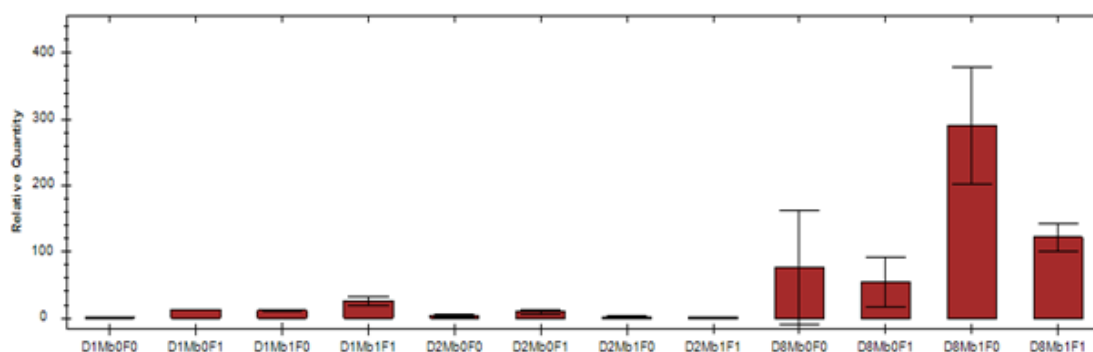
Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	1,22	0,9119	0,83	0,7032	0,52	0,8779	0,80	0,8267
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	0,46	0,6963
Mb0F1 vs. Mb1F1	0,85	0,6635	2,01	0,6157	1,05	0,3019	1,06	0,4063

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; BdMb0F0 - kontrola bez endofytu a bez patogenu, BdMb0F1 - varianta bez endofytu s patogenem, BdMb1F0 - varianta s endofytem bez patogenu, BdMb1F1 - varianta s endofytem i patogenem

4.4.3 Exprese genu *BdPR6*

BdPR6 je zařazen do rodiny genů spojených s patogenezí. V první sledované kombinaci (BdMb0F0 vs. BdMb0F1) byla hladina exprese up-regulovaná při 1 dpi ($P = 0,6841$); 2 dpi ($P = 0,4694$) a při 8 dpi ($P = 0,1107$) (Obr. 17). Výsledky však nebyly statisticky významné ani v jednom časovém intervalu ($P = 0,9518$). Vliv *Fc* na expresi genu *BdPR6* se nepotvrdil. V druhém případě jsme sledovali vliv *Mb* na expresi *BdPR6* bez přítomnosti patogenu *Fc* (BdMb0F0 vs. BdMb1F0), zde rovněž nebyl prokázán statisticky významný výsledek ($P = 0,6997$). V posledním případě byl sledován vliv *Mb* na expresi v přítomnosti patogenu *Fc* (porovnání variant BdMb0F1 vs. BdMb1F1). Stejně jako v předchozích případech v žádném časovém intervalu nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ($P = 0,7399$).

Nejvyšší průměrná hodnota FD byla u první sledované kombinace (BdMb0F0 vs. BdMb0F1), které byly infikovány pouze *Fc* (FD = 2,74). Exprese genu *BdPR6* v přítomnosti *Fc* byla 2,74x vyšší oproti kontrolám (BdMb0F0) (Tab. 15). Hladiny exprese pro *BdPR2* nevykazovaly žádnou statisticky významnou změnu ($P < 0,05$).



Obr. 17 Relativní genová exprese *BdPR6*. Expres byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant *BdMb0F0*; *BdMb0F1*; *BdMb1F0* a *BdMb1F1*. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

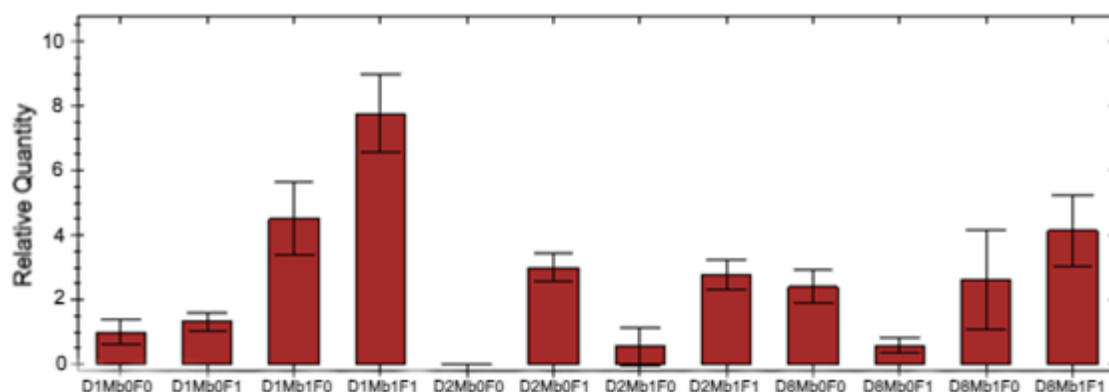
Tab. 15 Statistická analýza genové exprese *BdPR6*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	12,77	0,6841	2,27	0,4694	0,71	0,1107	2,74	0,9518
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	2,59	0,6997
Mb0F1 vs. Mb1F1	2,00	0,7684	0,18	0,4604	2,25	0,6589	0,94	0,7399

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); *1dpi, 2dpi a 8dpi* – první druhý a osmý den po infekci patogenem; *BdMb0F0* - kontrola bez endofytu a bez patogenu, *BdMb0F1* - varianta bez endofytu s patogenem, *BdMb1F0* - varianta s endofytem bez patogenu, *BdMb1F1* - varianta s endofytem i patogenem

4.4.4 Expres genu *BdPR9*

Výsledky qPCR analýzy pro gen *BdPR9* ukázaly zvýšenou expresi v přítomnosti *Fc* (porovnání variant *BdMb0F0* vs. *BdMb0F1*) (Obr. 18). Byl prokázán statisticky významný vliv patogenu *Fc* na expresi genu *BdPR9* ($P = 0,0003$); při 2 dpi byla změna exprese také statisticky významná ($P = 0,0293$). V druhém případě byl sledován vliv endofytu *Mb* (bez přítomnosti patogenu *Fc*) na expresi porovnáním variant *BdMb0F0* vs. *BdMb0F1*. V přítomnosti endofytu *Mb* byla exprese genu *BdPR9* up-regulovaná při 1 dpi, 2 dpi i 8 dpi, jedná se o statisticky významný rozdíl ($P = 0,0107$). V posledním případě byl sledován rovněž vliv endofytu *Mb*, ale v přítomnosti patogenu *Fc* (varianty *BdMb0F1* vs. *BdMb1F1*). I tady byl prokázán statisticky významný vliv ($P = 0,0023$), přítomnost endofytu ovlivňuje hladinu exprese genu *BdPR9*. Nejvyšší průměrná hodnota FD byla u variant v přítomnosti endofytu *Mb* (*BdMb0F0* vs. *BdMb1F0*), činila 6,06 (Tab. 16).



Obr. 18 Relativní genová exprese *BdPR9*. Expresse byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant *BdMb0F0*; *BdMb0F1*; *BdMb1F0* a *BdMb1F1*. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

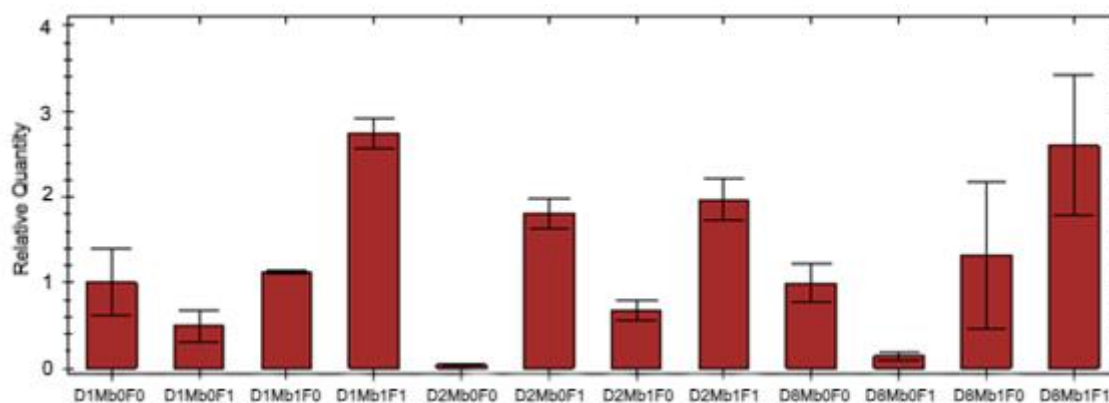
Tab. 16 Statistická analýza genové exprese *BdPR9*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	1,33	0,8230	54,30	0,0293	0,24	0,1129	4,34	0,0003
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	6,06	0,0107
Mb0F1 vs. Mb1F1	5,83	0,1053	0,93	0,1628	6,95	0,2389	3,35	0,0023

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; *BdMb0F0* - kontrola bez endofytu a bez patogenu, *BdMb0F1* - varianta bez endofytu s patogenem, *BdMb1F0* - varianta s endofytem bez patogenu, *BdMb1F1* - varianta s endofytem i patogenem

4.4.5 Expresse genu *BdPR10*

BdPR10 je zařazen do velké skupiny genů spojených s patogenezí. V prvním případě jsme sledovali vliv patogenu *Fc* na změnu exprese, kdy při 1 dpi přítomnost *Fc* expresi down-regulovalo ($P = 0,0858$), naopak při 2 dpi byla hladina exprese up-regulovaná ($P = 0,0487$) (Obr. 19). V přítomnosti patogenu *Fc* byl prokázán statisticky významný rozdíl na změnu exprese ($P = 0,0462$). Druhým sledovaným parametrem byl vliv *Mb* na expresi, kdy jsme porovnávali varianty *BdMb0F0* vs. *BdMb1F0* (baz patogenu). Expresse genu *BdPR10* byla up-regulovaná při 1 dpi, 2 dpi i 8 dpi ($P = 0,2001$). Nejednalo se o statisticky významný rozdíl, samotný endofyt *Mb* neměl na expresi významný vliv. Ve třetím případě jsme sledovali také vliv endofytu *Mb*, ale v přítomnosti patogenu *Fc*, tj. varianty *BdMb0F1* vs. *BdMb1F1*. Byl prokázán vliv endofytu na expresi *BdPR10*, jednalo se o statisticky významný rozdíl ($P = 0,0189$). Průměrná hodnota FD byla nejvyšší u poslední sledované kombinace (*BdMb0F1* vs. *BdMb1F1*) (FD = 17,83) (Tab. 17).



Obr. 19 Relativní genová exprese *BdPR10*. Exprese byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant *BdMb0F0*; *BdMb0F1*; *BdMb1F0* a *BdMb1F1*. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

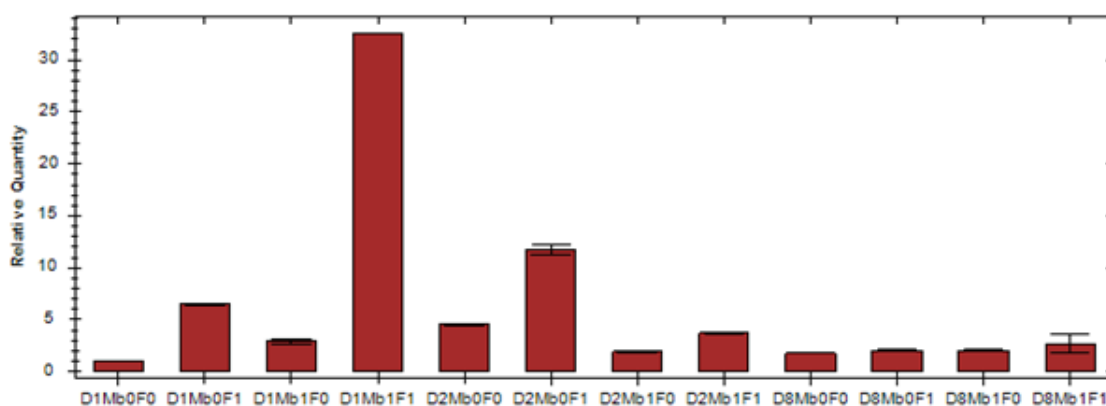
Tab. 17 Statistická analýza genové exprese *BdPR10*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	0,49	0,0858	40,4 3	0,0487	0,15	0,5825	1,67	0,0462
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	2,97	0,2001
Mb0F1 vs. Mb1F1	5,56	0,7201	1,09	0,1880	17,83	0,0893	4,07	0,0189

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; *BdMb0F0* - kontrola bez endofytu a bez patogenu, *BdMb0F1* - varianta bez endofytu s patogenem, *BdMb1F0* - varianta s endofytem bez patogenu, *BdMb1F1* - varianta s endofytem i patogenem

4.4.6 Exprese genu *BdPOX2*

Exprese genu *BdPOX2* je indukována houbami, bakteriemi a viry. Při sledování vlivu patogenu *Fc* na expresi, byl prokázán statisticky významný rozdíl při 1 dpi, kdy byla exprese up-regulovaná ($P = 0,0279$) (Obr. 20). Další časové intervaly 2 dpi ($P = 0,7006$) a 8 dpi ($P = 0,6162$) nejsou za statisticky významné považovány. Po infekci *Fc* byla exprese genu 2,30x vyšší oproti kontrole (Tab. 18). Dalším sledovaným parametrem byl vliv *Mb* na expresi *BdPOX2* porovnáním variant *BdMb0F0* vs. *BdMb1F0*. Samotný endofyt *Mb* neměl na expresi genu statisticky významný vliv ($P = 0,0923$). V posledním případě byl sledován vliv endofytu *Mb* v přítomnosti patogenu *Fc* porovnáním variant *BdMb0F1* vs. *BdMb1F1*, kdy statisticky významný rozdíl byl prokázán pouze při 1 dpi ($P = 0,0000$).



Obr. 20 Relativní genová exprese *BdPOX2*. Expresse byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant BdMb0F0; BdMb0F1; BdMb1F0 a BdMb1F1. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

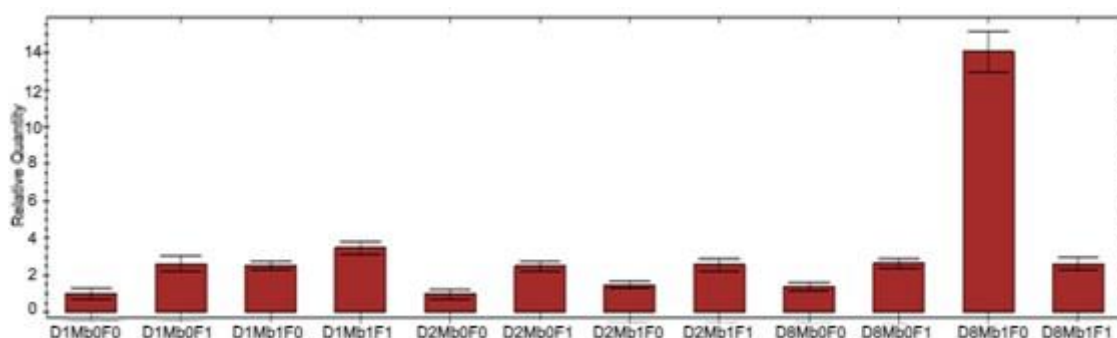
Tab. 18 Statistická analýza genové exprese *BdPOX2*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	6,50	0,0279	2,50	0,7006	1,11	0,6162	2,30	0,2245
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	0,97	0,0923
Mb0F1 vs. Mb1F1	5,00	0,0000	0,32	0,6834	1,35	0,6408	0,95	0,0832

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; BdMb0F0 - kontrola bez endofytu a bez patogenu, BdMb0F1 - varianta bez endofytu s patogenem, BdMb1F0 - varianta s endofytem bez patogenu, BdMb1F1 - varianta s endofytem i patogenem

4.4.7 Expresse genu *BdLOX3*

BdLOX3 se účastní biosyntézy JA, výsledky qPCR analýzy ukázaly nejvyšší hladinu exprese u varianty BdMb1F0 při 8 dpi (Obr. 21). Jako první parametr byl sledován vliv patogenu *Fc* na expresi genu *BdLOX3* (porovnání variant BdMb0F0 vs. BdMb0F1). V přítomnosti *Fc* byla hladina exprese up-regulovaná u všech variant, kromě varianty BdMb1F1 při 8 dpi ($P = 0,0049$). Patogen *Fc* měl na genovou expresi statisticky významný vliv ($P = 0,0000$). V dalším případě byl sledován vliv *Mb* bez přítomnosti patogenu na expresi (BdMb0F0 vs. BdMb1F0). Hladina exprese byla up-regulovaná u všech variant ve všech časových bodech ($P = 0,0297$). Samotný endofyt *Mb* měl statisticky významný vliv na expresi genu *BdLOX3*. Nakonec byl sledován také vliv endofytu *Mb*, ale za současné přítomnosti patogenu *Fc* (porovnání variant BdMb0F1 vs. BdMb1F1). I zde byl potvrzen statisticky významný vliv ($P = 0,0004$). Nejvyšší průměrná hodnota FD byla u variant BdMb0F0 vs. BdMb1F0 (Tab. 19). Expresse genu *BdLOX3* byla 5,35 vyšší oproti kontrole. Za statisticky významný rozdíl bylo považováno $P < 0,05$, čehož bylo dosaženo u všech testovaných variant.



Obr. 21 Relativní genová exprese *BdLOX3*. Expres byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant *BdMb0F0*; *BdMb0F1*; *BdMb1F0* a *BdMb1F1*. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují msěrodatné odchylky.

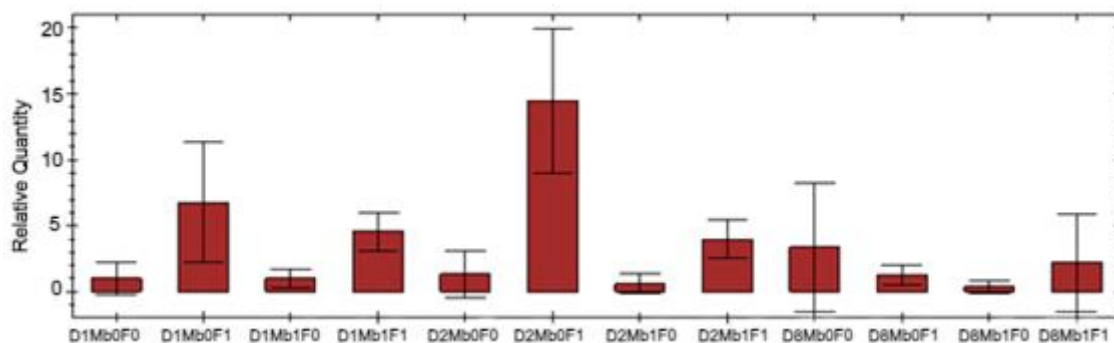
Tab. 19 Statistická analýza genové exprese *BdLOX3*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	2,62	0,1487	2,52	0,0949	1,91	0,0049	2,30	0,0000
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	5,35	0,0297
Mb0F1 vs. Mb1F1	1,33	0,1144	1,03	0,0002	0,98	0,1249	1,11	0,0004

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; *BdMb0F0* – kontrola bez endofytu a bez patogenu, *BdMb0F1* - varianta bez endofytu s patogenem, *BdMb1F0* – varianta s endofytem bez patogenu, *BdMb1F1* varianta s endofytem i patogenem

4.4.8 Expres genů *BdChitinase1*

Výsledky qPCR analýzy pro gen *BdChitinase1* ukázaly statisticky významný vliv patogena *Fc* na expresi *BdChitinase1* ($P = 0,0265$) (Obr. 22). Při porovnání variant *BdMb0F0* vs. *BdMb0F1* byla hladina exprese up-regulována při 1 dpi ($P = 0,6249$) a 2 dpi ($P = 0,0000$). Dále byla sledovaná genová exprese v přítomnosti endofytu *Mb* (varianty *BdMb0F0* vs. *BdMb1F0*), kdy byla exprese down-regulována při 1 a 2 dpi. Výsledky nebyly statisticky významné ($P = 0,3663$). Třetím sledovaným parametrem byl vliv endofytu *Mb* společně s patogenem *Fc* na genovou expresi (varianty *BdMb0F1* vs. *BdMb1F1*). Ani v tomto případě nebyl potvrzen statisticky významný výsledek ($P = 0,2178$). Nejvyšší průměrná hodnota FD byla u variant s patogenem *Fc* (*BdMb0F0* vs. *BdMb0F1*) (FD = 3,95) (Tab. 20).



Obr. 22 Relativní genová exprese *BdChitinase1*. Exprese byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant BdMb0F0; BdMb0F1; BdMb1F0 a BdMb1F1. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

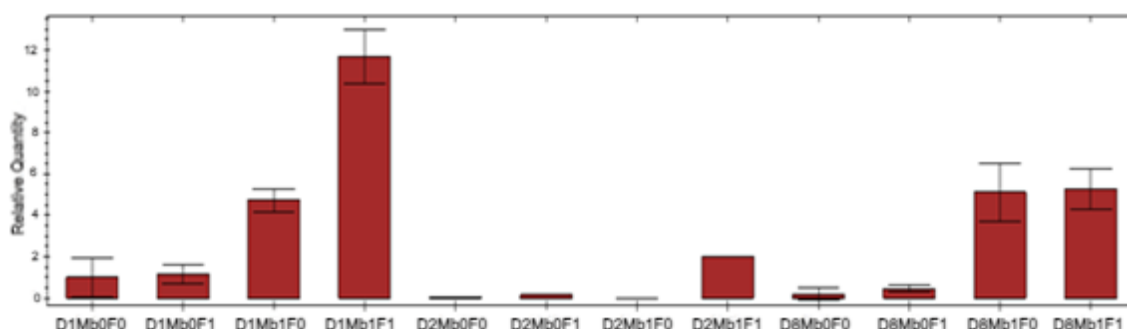
Tab. 20 Statistická analýza genové exprese *BdChitinase1*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	6,79	0,6249	10,86	0,0000	0,37	0,2801	3,95	0,0265
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	0,35	0,3663
Mb0F1 vs. Mb1F1	0,67	0,9408	0,27	0,4281	1,76	0,5081	0,48	0,2178

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, p - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu (P < 0,05); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; BdMb0F0 - kontrola bez endofytu a bez patogenu, BdMb0F1 - varianta bez endofytu s patogenem, BdMb1F0 - varianta s endofytem bez patogenu, BdMb1F1 - varianta s endofytem i patogenem

4.4.9 Exprese genu *BdWRKY41*

Gen *BdWRKY41* je indukován SA. Byl sledován vliv patogena *Fc* na relativní změnu exprese porovnáním variant BdMb0F0 vs. BdMb0F1. V přítomnosti *Fc* byla exprese up-regulovaná při 1 dpi (P = 0,7013), 2 dpi (P = 0,1006) i 8 dpi (P = 0,0142) (Obr. 23). Výsledky ukázaly statisticky významný vliv *Fc* na expresi genu *BdWRKY41* (P = 0,0000). V druhém případě byl sledován vliv endofytu *Mb* (BdMb0F0 vs. BdMb1F0), kdy byla exprese up-regulovaná při 1 dpi a 8 dpi. I v tomto případě byly výsledky statisticky významné (P = 0,0004). V posledním případě jsme sledovali rovněž vliv endofytu *Mb* v přítomnosti patogenu *Fc* (varianty BdMb0F1 vs. BdMb1F1), kdy byl statisticky potvrzen významný vliv endofytu na expresi genu *BdWRKY41* (P = 0,0465). V tomto případě byla zjištěna i nejvyšší průměrná hodnota relativního rozdílu v expresi (FD = 9,27).



Obr. 23 Relativní genová exprese *BdWRKY41*. Exprese byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant BdMb0F0; BdMb0F1; BdMb1F0 a BdMb1F1. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

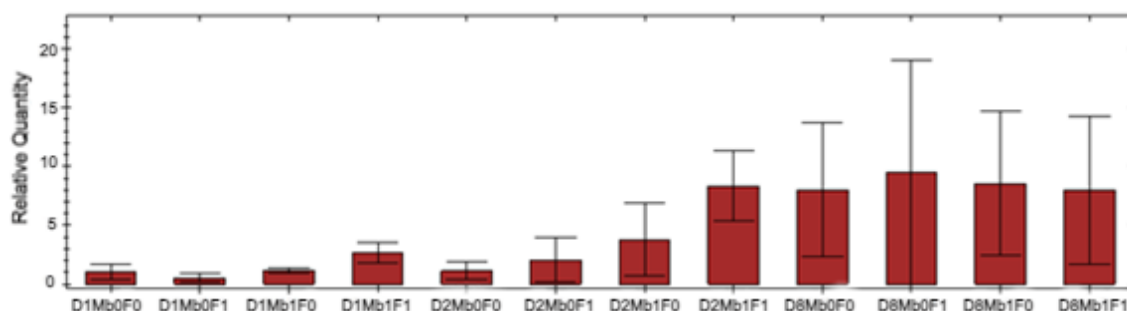
Tab. 21 Statistická analýza genové exprese *BdWRKY41*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	1,17	0,7013	6,49	0,1006	2,13	0,0142	1,49	0,0000
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	7,19	0,0004
Mb0F1 vs. Mb1F1	9,30	0,0638	9,96	0,4851	8,97	0,3872	9,27	0,0465

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; BdMb0F0 - kontrola bez endofytu a bez patogenu, BdMb0F1 - varianta bez endofytu s patogenem, BdMb1F0 - varianta s endofytem bez patogenu, BdMb1F1 - varianta s endofytem i patogenem

4.4.10 Exprese genu *BdTCP*

Výsledky qPCR pro gen *BdTCP* ukázaly, že v přítomnosti patogenu *Fc* (porovnání variant BdMb0F0 vs. BdMb0F1) byla exprese up-regulovaná při 1 dpi ($P = 0,3711$) i 2 dpi ($P = 0,5239$) jak je vidět na obr. 24. Vliv patogena na genovou expresi nebyl statisticky významný ($P = 0,7422$). V druhém případě byl sledován vliv endofytu *Mb* (porovnání variant BdMb0F0 vs. BdMb1F0), kdy byla hladina exprese down-regulovaná při 8 dpi, v ostatních časových bodech byla up-regulovaná, ale nejednalo se o statisticky významný rozdíl. ($P = 0,7881$). Dalším sledovaným parametrem byla kombinace endofytu *Mb* společně v přítomnosti patogenu *Fc* (varianty BdMb1F0 vs. BdMb1F1). Ani tato kombinace nebyla statisticky významná ($P = 0,7223$). Nejvyšší průměrná hodnota FD byla u variant BdMb1F0 vs. BdMb1F1 ($FD = 2,45$) (Tab. 22).



Obr. 24 Relativní genová exprese *BdTCP*. Expres byla sledována ve třech časových obdobích 1 dpi; 2 dpi a 8 dpi u všech variant *BdMb0F0*; *BdMb0F1*; *BdMb1F0* a *BdMb1F1*. Data byla normalizována referenčním genem *BdSamDC*. Jednotlivé sloupce znázorňují průměr relativní exprese ze dvou biologických opakování, chybové úsečky představují směrodatné odchylky.

Tab. 22 Statistická analýza genové exprese *BdTCP*.

Srovnávané varianty	1 dpi		2 dpi		8 dpi		Ø dpi	
	FD	p	FD	p	FD	p	FD	p
Mb0F0 vs. Mb0F1	0,54	0,3711	1,81	0,5239	1,18	0,2723	1,05	0,7422
Mb0F0 vs. Mb1F0	-	-	-	-	-	-	1,60	0,7881
Mb0F1 vs. Mb1F1	4,96	0,2153	4,09	0,1312	0,84	0,4314	2,45	0,7223

FD - fold difference, tj. relativní rozdíl v expresi, *p* - hodnota průkaznosti Tukeyho post hoc testu ($P < 0,05$); 1dpi, 2dpi a 8dpi – první druhý a osmý den po infekci patogenem; *BdMb0F0* - kontrola bez endofytu a bez patogenu, *BdMb0F1* - varianta bez endofytu s patogenem, *BdMb1F0* - varianta s endofytem bez patogenu, *BdMb1F1* - varianta s endofytem i patogenem

5 DISKUSE

V současné době je jedním z diskutovaných témat, jak chránit rostliny před různými houbovými patogeny bez současného zvyšování spotřeby fungicidů. Ač je imunitní systém rostlin velice rozvinutý, nedokáže vždy rostlinu zcela ochránit, čímž dochází k propuknutí onemocnění a k výraznému snižování produkce (Oerke, 2006). Navíc používání chemických fungicidů, jednak zatěžuje půdu, ale také se ve zbytkovém množství může dostat do spodních vod a potravin, jež konzumuje člověk či zvířata (Hazel & Patel, 2004; Comby *et al.*, 2017). Řešením by mohla být nová alternativní biologická ochrana, která zvyšuje obranyschopnost rostlin, ale přináší i příznivý vliv na její okolí (Fitzgerald *et al.*, 2015; Comby *et al.*, 2017). Takový potenciál přináší endofytické houby, u kterých bylo zjištěno, že mohou nabídnout jak zvýšenou rezistenci proti patogenům, tak podporu celkového růstu a vývoje (Rodriquez *et al.*, 2009).

V této práci byla využita modelová rostlina *B. distachyon*, která byla již v řadě studií vyhodnocena jako vhodný model pro studium interakce hostitel-patogen (Fitzgerald *et al.*, 2015). Kawahara *et al.* (2012) sledovali jeho interakci s *M. oryzae*, která způsobuje onemocnění rýže, Sandoya & de Oliveira Buanafina (2014) sledovaly interakci s dalšími patogeny, kterými jsou např. *R. solani* či *S. homoecarpa*. Pro tuto práci byl zvolen významný patogen obilovin *F. culmorum*, který se řadí do skupiny vláknitých hub způsobující např. růžovění klasů u pšenice a ječmene (Parry *et al.*, 1995). Stejná interakce již byla zkoumána Peraldim *et al.* (2011), kteří kompatibilní interakci mezi *B. distachyon* a *F. culmorum* potvrdili.

Na rozdíl od předchozích studií jsme již při setí *B. distachyon* inokulovali endofytickým organismem *M. bolleyi*. Tato houba se řadí mezi kořenové endofyty kolonizující zejména trávy a obiloviny, která nemá patogenní účinek na svého hostitele (Mandyam *et al.*, 2010; Hernández-Restrepo *et al.*, 2016). Naopak byl prokázán její eliminační účinek vůči vysoce virulentním patogenům, kterými jsou např. *G. graminis* var. *tritici* (Kirk & Deacon, 1987), či právě námi zkoumaný *F. culmorum* (Comby *et al.*, 2017). Ve studii Comby *et al.* (2017) došlo k inhibici růstu *F. culmorum* na pšenici až o 24,4-33 %, proto jsme se rozhodli sledovat právě tuto interakci.

První interakce mezi *B. distachyon* a *F. culmorum* s předchozí inokulací *M. bolleyi* byla zkoumaná teprve nedávno ve studii Matušinský *et al.* (2022). Zda je inokulace endofytem úspěšná, bylo nutné ověřit přítomnost *Mb* v kořenovém systému *Bd* pomocí

mikroskopování (Obr. 14). Kořeny byly mikroskopovány při každém z pěti odběrů a přítomnost chlamydospor *Mb* v kořenech *Bd* byla pokaždé potvrzena (Tab. 12).

Příznaky napadení *F. culmorum* se projevují nejen poškozením klasů ale také jako hnědé nekrotické léze, které se postupně rozšiřují na kořenovém krčku, a nakonec infikují i stébla (Parry *et al.*, 1995). V naší práci se první známky napadení *Fc* projevily 8 dpi (dní po infekci), procento nekrózy na listech *Bd* bylo hodnoceno vizuálně (Obr. 13) a poté statisticky analyzováno. Statistická analýza potvrdila velmi výrazné rozdíly mezi variantami inokulovanými endofytem (BdMb1F1) a bez endofytu (BdMb0F1). U varianty BdMb1F1 bylo poškození způsobené patogenem *Fc* pouze 5,59 % (počet vzorků = 34), zatímco u variant BdMb0F1 tvořila nekróza 39,31 % (počet vzorků = 36) (Tab. 7). Obdobné výsledky přináší studie Matušinský *et al.* (2022). Procento nekrózy u variant BdMb1F1 tvořilo 14,33 % (počet vzorků = 30). Naproti tomu u variant bez endofytu, tj. BdMb0F1 bylo procento značně vyšší a to až 51,83 % (počet vzorků = 30). Výsledky tak naznačují slibný potenciál *M. bolleyi* jako biologické ochrany proti *F. culmorum*.

Interakce s endofytickými houbami vede ke zvýšené akvizici živin a množství fytohormonů v rostlinách, což souvisí se zvýšením produkce biomasy, zvýšeným výnosem, vývojem kořenového systému a celkové výšky rostliny (Bamisile *et al.*, 2018). Tuto hypotézu jsme si chtěli ověřit a z toho důvodu jsme sledovali také účinek *Mb* na růstovou fázi *B. distachyon*. Z našich výsledků bylo zjištěno, že varianty BdMb1, tedy ty, které byly inokulovány endofytem, se nacházely v pozdější vývojové fázi oproti variantám bez endofytu (BdMb0). Varianty s endofytem měly ve většině případů vyvinutější kořenový systém a celkovou výšku rostliny (Tab. 11).

Při infekci patogenní houbou rostlina spouští své obranné imunitní reakce, které mimo jiné zahrnují aktivaci signálních drah jednotlivých fytohormonů. Hladina fytohormonů se během infekce může zvyšovat nebo snižovat, čehož může být využito při sledování exprese markerových genů, které jsou jednotlivými fytohormony aktivovány (Kakei *et al.*, 2015). Endofyty poskytují rostlinám vyšší obranyschopnost z důvodu aktivace ISR prostřednictvím dvou fytohormonů, tj. JA a ET. Některé endofyty jsou schopny vyvolat také SAR, která je závislá na SA a rovněž vede k obraně hostitele (Fadiji & Babalola, 2020). V této práci byla pomocí metody qPCR sledovaná genová exprese 10 genů fytohormonových markerů, tj. *BdPR1-5*; *BdPR2*; *BdPR6*; *BdPR9* a *BdPR10* (geny spojené s patogenezí), *BdLOX3*, *BdPOX2*, *BdChitinase1*, *BdWRKY41* a *BdTCP*, u kterých bylo na základě literatury zjištěno, že se účastní aktivní obrany u *B. distachyon* (Hong *et al.*, 2008; Pasquet *et al.*, 2014; Sandoya & de Oliveira Buanafina, 2014; Hong

et al., 2008; Kouzai *et al.*, 2016; Subramanyam *et al.*, 2019), ale studií je stále málo proto je důležité je testovat i nadále. Cílem práce bylo zkoumat jednak jaký vliv na expresi genů má samotná infekce patogenní houbou *F. culmorum* (porovnáním variant BdMb0F0 vs. BdMb0F1), jak expresi ovlivňuje samotný endofyt *M. bolleyi* (porovnáním variant BdMb0F0 vs. BdMb1F0) a jestli popřípadě jak expresi ovlivňuje přítomnost endofytního organismismu *Mb* společně s infekcí *Fc* (porovnáním variant BdMb0F1 vs. BdMb1F1).

PR1 se používá jako marker pro aktivaci signální dráhy SA, která je spojena s obranou rostlin proti biotrofním patogenům (Ali *et al.*, 2018). Stejně jako v předchozí studii Matušinský *et al.* (2022) byla exprese *BdPR1-5* v naší práci up-regulovaná v přítomnosti patogena *Fc*, inokulace endofytem *Mb* neměla na expresi statisticky významný vliv (Obr. 15; Tab. 13). U dalších dvou genů, které jsou rovněž indukované SA, *BdPR2* a *BdPR6* neměla na genovou expresi žádný významný účinek jak infekce *Fc* tak inokulace *Mb* (Obr. 16, 17; Tab. 14,15). PR9 proteiny jsou peroxidasy, které se podílí na lignifikaci rostlinné buněčné stěny (Way *et al.*, 2000). Výsledky qPCR analýzy pro gen *BdPR9* ukázaly významnou změnu v genové expresi po infekci patogenem *Fc*, exprese byla up-regulovaná ve všech časových bodech (1dpi; 2 dpi; 8 dpi). Statistický významný vliv na expresi *BdPR9* měla i inokulace *Mb*. Endofyt expresi up-reguloval oproti kontrolám (Obr. 18; Tab. 16). Poslední ze zkoumaných genů souvisejících s patogenezi byl *BdPR10*, který je u rýže indukován ET nebo chitinem (Kouzai *et al.*, 2016). Předchozí výsledky informují o tom, že *PR-10* nereagoval na žádný z testovaných fytohormonů SA, JA ani ET (Kouzai *et al.*, 2016). V naší práci byla exprese *BdPR10* ovlivněna jak samotnou infekcí *Fc*, tak při porovnání variant BdMb0F1 vs. BdMb1F1 byla exprese *BdPR10* v přítomnosti *Mb* up-regulovaná oproti kontrolní variantě (BdMb0F1) (Obr. 19; Tab. 17). Na základě literatury byly potvrzeny příznivé reakce na expresi *BdPOX2* u *B. distachyon* (Sandoya & de Oliveira Buanafina). Změna relativní genové exprese v této práci byla statisticky významná pouze 1 dpi v případě zkoumání vlivu *Fc* na expresi (porovnáním variant BdMb0F0 vs BdMb0F1) a 1 dpi při sledování vlivu *Mb* (porovnáním variant BdMb0F1 a BdMb1F1). Další časové období nepřinesly významný rozdíl (Obr. 20; Tab. 18). Předpokládá se, že *LOX* je nezbytný pro biosyntézu JA, která se podílí na obranných reakcích rostlin proti nekrotrofním patogenům (Bari & Jones, 2009). Ve studii Sandoya & de Oliveira Buanafina (2014) byla exprese *LOX3* up-regulovaná u rezistentního genotypu 24 hodin po infekci *S. homoeocarpa*, pokles nastal po 48 hodinách od infekce. V této práci byla exprese *BdLOX3* indukovaná jak infekcí *Fc*, tak samotným *Mb*. Příznivé výsledky přinesla i třetí testovaná kombinace, kdy jsme

sledovali vliv *Mb* společně s *Fc* (Obr. 21; Tab. 19). Pro porovnání ve studii Matušinský *et al.* (2022) byl pozorován statisticky významný výsledek pouze v případě infekce patogenem *Fc* 2 dpi. Rostlinné chitinasy katalyzují hydrolýzu chitinu, který je hlavní složkou buněčných stěn u hub (Lin *et al.*, 1995). Infekce *Fc* indukovala expresi genu *BdChitinase1*, ale inokulace *Mb*, neměla na expresi statisticky významný vliv (Obr. 22; Tab. 20). Zatímco ve studii Matušinský *et al.* (2022) byla exprese *BdChitinase1* významně ovlivněna endofytickou houbou *Mb* 1 dpi. Transkripční faktory WRKY regulují expresi řady genů, jsou dostupné informace o zvýšené hladině relativní genové exprese po ošetření SA (Kakei *et al.*, 2015; Kouzai *et al.*, 2016). Podle výsledků qPCR analýzy měl na indukci exprese genu *BdWRKY41* vliv jednak patogen *Fc*, tak samotný endofyt *Mb* (Obr. 23; Tab. 21). Pravděpodobně důležitou roli v imunitním systému rostlin hrají transkripční faktory TCP (Mukhopadhyay & Tyagi, 2015). V naší práci nedošlo ke změnám relativní genové exprese *BdTCP*. Výsledek nebyl statisticky významný ani u jedné testované kombinace (Obr. 24; Tab. 22).

6 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla vypracovaná literární rešerše se zameřením na modelový organismus *Brachypodium distachyon*, patogenní druh *Fusarium culmorum* a endofytický organismus *Microdochium bolleyi*. V dalších kapitolách byl popsán imunitní systém rostlin se zameřením na úlohu jednotlivých rostlinných hormonů (kyselina salicylová, kyselina jasmonová a ethylen) a geny, které se účastní jejich biosyntézy či signalizačních drah.

V rámci experimentální části byla pěstována modelová rostlina *Brachypodium distachyon*, která již při setí byla inokulovaná endofytickým organismem *Microdochium bolleyi*, následně byly listy infikovány patogenní houbou *Fusarium culmorum*. Pomocí vizuálního hodnocení byl sledován vliv *M. bolleyi* na mírnění patogenních účinků *F. culmorum* na listech *B. distachyon*. V tomto případě se endofytický účinek *M. bolleyi* potvrdil a varianty bez endofytu, tj. BdMb0F1 vykazovaly vyšší procento nekrotizace než varianty s endofytem, tj. BdMb1F1.

Pomocí metody qPCR byla změřena genová exprese 10 genů fytohormonových markerů, které se podílí na obraně rostlin u *B. distachyon*. Byl sledován vliv samotného *F. culmorum* na změnu exprese, který byl významný u skupiny genů, tj. *BdPR1-5*; *BdPR9*; *BdPR10*; *BdLOX3*; *BdChitinase1* a *BdWRKY41*. Dalším zkoumaným parametrem bylo sledování vlivu samotného endofytu *M. bolleyi* na změnu exprese, která byla významně ovlivněná v případě genů *BdPR9*; *BdLOX3* a *BdWRKY41*. Posledním sledovaným parametrem byl vliv endofytu *M. bolleyi*, v případě že byly varianty zároveň infikované *F. culmorum*. Statisticky významný vliv *M. bolleyi* se potvrdil u skupiny genů *BdPR9*; *BdPR10*; *BdLOX3* a *BdWRKY41*. Ze zkoumaných 10 genů jsme zjistili, že u 4 z nich, tj. *BdPR2*; *BdPR6*; *BdPOX2* a *BdTCP* nebyla změna relativní genové exprese nijak ovlivněna žádným ze zkoumaných organismů.

Získané výsledky přinesly potvrzení endofytických vlastností *M. bolleyi* na mírnění symptomů *F. culmorum* u *B. distachyon*. Naše výsledky by v budoucnu mohly posloužit jako nástroj při hledání alternativní biologické ochrany obilovin a trav vůči patogennímu druh *F. culmorum*.

7 LITERATURA

- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., & Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Amatulli, M. T., Spadaro, D., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2010). Molecular identification of *Fusarium spp.* associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity. *Plant Pathology*, 59(5), 839-844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02319.x>.
- Attaran, E., Zeier, T. E., Griebel, T., & Zeier, J. (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(3), 954-971. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063164>
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, 6(10), 973-979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>.
- Backhouse, D., Abubakar, A. A., Burgess, L. W., Dennisc, J. I., Hollaway, G. J., Wildermuth, G. B., Henry, F. J. (2004). Survey of *Fusarium* species associated with crown rot of wheat and barley in eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33(2), 255-261. <https://doi.org/10.1071/AP04010>.
- Bacon, C. W., & White, J. F. (2016). Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, 68(1), 87-98. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0350-2>.
- Bamisile, B. S., Dash, C. K., Akutse, K. S., Keppanan, R., & Wang, L. (2018). Fungal endophytes: beyond herbivore management. *Frontiers in Microbiology*, 9, 544. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00544>.
- Bari, R., & Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473-488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>.
- Bleša, D., Matušinský, P., Sedmíková, R., & Baláž, M. (2021). The potential of Rhizoctonia-like fungi for the biological protection of cereals against fungal pathogens. *Plants*, 10(2), 349. <https://doi.org/10.3390/plants10020349>.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of Microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>.
- Brash, A. R., Baertschi, S. W., Ingram, C. D., & Harris, T. M. (1988). Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(10), 3382-3386. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3382>.
- Brown, N. A., Urban, M., Van de Meene, A. M., & Hammond-Kosack, K. E. (2010). The infection biology of *Fusarium graminearum*: defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology*, 114(7), 555-571. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.04.006>.
- Burgess, L. W. (1981). *General ecology of the Fusaria* (Fusarium Disease, Biology and Taxonomy). The Pennsylvania State University Press. 457 stran.
- Campbell, W. P., & Griffiths, D. A. (1974). Development of endoconidial chlamydospores in *Fusarium culmorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 63(2), 221-IN7. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(74\)80166-X](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(74)80166-X).
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., & Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1), 57-63. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81858-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81858-9).
- Catalán, P., Kellogg, E. A., & Olmstead, R. G. (1997). Phylogeny of *Poaceae* subfamily pooideae based on chloroplastndhf gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(2), 150-166. <https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0416>.
- Comby, M., Gacoin, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S., Dupont, J., & Baillieul, F. (2017). Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head

- blight using two different in vitro tests. *Microbiological Research*, 202, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.014>.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826-833. <https://doi.org/10.1038/35081161>.
- De Hoog G. S., Hermanides-Nijhof E. J. (1977): Survey of the black yeasts and allied fungi. *Studies in Mycology* 15, 178-223. <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim15/fulltext.htm>
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., & Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 266(5188), 1247-1250. <https://doi.org/10.1126/science.266.5188.1247>.
- Desmond, O. J., Manners, J. M., Stephens, A. E., Maclean, D. J., Schenk, P. M., Gardiner, D. M., & Kazan, K. (2008). The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 435-445. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00475.x>.
- Draper, J., Mur, L. A., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G. C., Bablak, P., Hasterok, R., & Routledge, A. P. (2001). *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology*, 127(4), 1539-1555. <https://doi.org/10.1104/pp.010196>.
- Dunaevskii, Y. E., Tsybina, T. A., Belyakova, G. A., Domash, V. I., Sharpio, T. P., Zabreiko, S. A., & Belozerskii, M. A. (2005). Proteinase inhibitors as antistress proteins in higher plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(4), 344-348. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0058-9>.
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 467. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00467>.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*, 4(2), 129-134. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.2.129>.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18(3), 265-276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x>.
- Fernando, W. G. D., Paulitz, T. C., Seaman, W. L., Dutilleul, P., & Miller, J. D. (1997). Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots. *Phytopathology*, 87(4), 414-421. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.414>.
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 275. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>.
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>.
- Fike, J. H., Parrish, D. J., Wolf, D. D., Balasko, J. A., Green Jr, J. T., Rasnake, M., & Reynolds, J. H. (2006). Long-term yield potential of switchgrass-for-biofuel systems. *Biomass and Bioenergy*, 30(3), 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.10.006>.
- Fitzgerald, H. A., Chern, M. S., Navarre, R., & Ronald, P. C. (2004). Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH-and environment-induced lesion-mimic/cell death phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(2), 140-151. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.2.140>
- Fitzgerald, T. L., Powell, J. J., Schneebeli, K., Hsia, M. M., Gardiner, D. M., Bragg, J. N., & Kazan, K. (2015). *Brachypodium* as an emerging model for cereal-pathogen interactions. *Annals of Botany*, 115(5), 717-731. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv010>.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>.
- Francis, A., Dhaka, N., Bakshi, M., Jung, K. H., Sharma, M. K., & Sharma, R. (2016). Comparative phylogenomic analysis provides insights into TCP gene functions in Sorghum. *Scientific Reports*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep38488>.

- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228-232. <https://doi.org/10.1038/nature11162>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/tpj.13398>.
- Gao, C. S., Kou, X. J., Li, H. P., Zhang, J. B., Saad, A. S. I., & Liao, Y. C. (2013). Inverse effects of *Arabidopsis NPR1* gene on *Fusarium* seedling blight and *Fusarium* head blight in transgenic wheat. *Plant Pathology*, 62(2), 383-392. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02656.x>.
- Garvin, D. F., Gu, Y. Q., Hasterok, R., Hazen, S. P., Jenkins, G., Mockler, T. C., & 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. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.06.0332tpg>.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, 43, 205. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>.
- Gunatilaka, A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69(3), 509-526. <https://doi.org/10.1021/np058128n>.
- Hamilton, A. J., Bouzayen, M., & Grierson, D. (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7434-7437. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7434>.
- Hazel, C. M., & Patel, S. (2004). Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicology Letters*, 153(1), 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.040>.
- Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*, 89(5), 503-512. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf076>.
- Henry, E., Yadeta, K. A., & Coaker, G. (2013). Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytologist*, 199(4), 908-915. <https://doi.org/10.1111/nph.12214>.
- 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. <https://doi.org/10.3767/003158516X688676>.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>.
- Hong, S. Y., Park, J. H., Cho, S. H., Yang, M. S., & Park, C. M. (2011). Phenological growth stages of *Brachypodium distachyon*: codification and description. *Weed Research*, 51(6), 612-620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2011.00877.x>.
- Hong, S. Y., Seo, P. J., Yang, M. S., Xiang, F., & Park, C. M. (2008). Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-112>.
- Howarth, D. G., & Donoghue, M. J. (2006). Phylogenetic analysis of the "ECE"(CYC/TB1) clade reveals duplications predating the core eudicots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9101-9106. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602827103>. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1991Articles/phyto81n09_1048.pdf.
- Hua, J., & Meyerowitz, E. M. (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 94(2), 261-271. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81425-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81425-7).
- Chakraborty, S., Obanor, F., Westecott, R., & Abeywickrama, K. (2010). Wheat crown rot pathogens *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* lack specialization. *Phytopathology*, 100(10), 1057-1065. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-10-0007>.

- Chala, A., Weinert, J., & Wolf, G. A. (2003). An integrated approach to the evaluation of the efficacy of fungicides against *Fusarium culmorum*, the cause of head blight of wheat. *Journal of Phytopathology*, 151(11-12), 673-678. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00787.x>.
- Chanda, B., Xia, Y. E., Mandal, M. K., Yu, K., Sekine, K. T., Gao, Q. M., & Kachroo, P. (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics*, 43(5), 421-427. <https://doi.org/10.1038/ng.798>.
- Chaturvedi, R., Venables, B., Petros, R. A., Nalam, V., Li, M., Wang, X., & Shah, J. (2012). An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *The Plant Journal*, 71(1), 161-172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04981.x>.
- Chen, M. S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Science*, 15(2), 101-114. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00190.x>.
- Chen, R., Jiang, H., Li, L., Zhai, Q., Qi, L., Zhou, W., & Li, C. (2012). The *Arabidopsis* mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *The Plant Cell*, 24(7), 2898-2916. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.098277>.
- Chen, Y. F., Randlett, M. D., Findell, J. L., & Schaller, G. E. (2002). Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19861-19866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201286200>.
- Chini, A., Fonseca, S. G. D. C., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., & Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. (2001). The DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13(10), 2191-2209. <https://doi.org/10.1105/tpc.010192>.
- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., & Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 8(1), 97-109. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.08010097.x>.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., & Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19486-19491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214848109>.
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>.
- 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), 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep14476>.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., & Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 11086-11091. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508882103>.
- Kawahara, Y., Oono, Y., Kanamori, H., Matsumoto, T., Itoh, T., & Minami, E. (2012). Simultaneous RNA-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. *PloS One*, 7(11), e49423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049423>.
- Kellogg, E. A. (2001). Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology*, 125(3), 1198-1205. <https://doi.org/10.1104/pp.125.3.1198>.
- Khan, M. A., & Stace, C. A. (1999). Breeding relationships in the genus *Brachypodium* (Poaceae: Pooideae). *Nordic Journal of Botany*, 19(3), 257-269. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1999.tb01108.x>.

- Kheiri, A., Moosawi Jorf, S. A., & Malhipour, A. (2019). Infection process and wheat response to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 153(2), 489-502. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1576-7>.
- Kind, S., Schurack, S., Hinsch, J., & Tudzynski, P. (2018). *Brachypodium distachyon* as alternative model host system for the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 1005-1011. <https://doi.org/10.1111/mpp.12563>.
- Kinkema, M., Fan, W., & Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*, 12(12), 2339-2350. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.12.2339>.
- Kirk, J. J., & Deacon, J. W. (1987). Invasion of naturally senescing root cortices of cereal and grass seedlings by *Microdochium bolleyi*. *Plant and Soil*, 98(2), 239-246. <https://doi.org/10.1007/BF02374827>.
- Kollers, S., Rodemann, B., Ling, J., Korzun, V., Ebmeyer, E., Argillier, O., & Röder, M. S. (2013). Whole genome association mapping of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One*, 8(2), e57500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057500>.
- Kosugi, S., & Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *The Plant Cell*, 9(9), 1607-1619. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.9.1607>.
- Kouzai, Y., Kimura, M., Yamanaka, Y., Watanabe, M., Matsui, H., Yamamoto, M., & Noutoshi, Y. (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), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0749-9>.
- Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.014>.
- Lacey, J., Bateman, G. L., & Mirocha, C. J. (1999). Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology*, 134(3), 277-283. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1999.tb05265.x>.
- Langevin, F., Eudes, F., & Comeau, A. (2004). Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during *Fusarium* head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology*, 110(7), 735-746. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000041568.31778.ad>.
- Lee, H. I., Leon, J., & Raskin, I. (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4076-4079. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4076>.
- Lemmens, M., Scholz, U., Berthiller, F., Dall'Asta, C., Koutnik, A., Schuhmacher, R., ... & Ruckebauer, P. (2005). The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 18(12), 1318-1324. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1318>.
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S., & Pieterse, C. M. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta*, 232(6), 1423-1432. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1265-z>.
- Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., & Steinberg, C. (2013). Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of *Fusarium* head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(1), 97-111. <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0098-5>.
- Li, W., Ma, M., Feng, Y., Li, H., Wang, Y., Ma, Y., & Guo, H. (2015). EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell*, 163(3), 670-683. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.037>.
- Lin, W., Anuratha, C. S., Datta, K., Potrykus, I., Muthukrishnan, S., & Datta, S. K. (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio/technology*, 13(7), 686-691. <https://doi.org/10.1038/nbt0795-686>.
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J. P., & Bouzayen, M. (2015). Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiology*, 169(4), 2380-2390. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01361>.

- Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick, H. N., & Shah, J. (2006). Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(2), 123-129. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0123>.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., & Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250(4983), 1002-1004. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1002>.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., & Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics*, 26(4), 403-410. <https://doi.org/10.1038/82521>.
- Mandadi, K. K., Pyle, J. D., & Scholthof, K. B. G. (2014). Comparative analysis of antiviral responses in *Brachypodium distachyon* and *Setaria viridis* reveals conserved and unique outcomes among C3 and C4 plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(11), 1277-1290. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-14-0152-R>.
- Mandyam, K., Loughin, T., & Jumpponen, A. (2010). Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia*, 102(4), 813-821. <https://doi.org/10.3852/09-212>.
- Martín-Trillo, M., & Cubas, P. (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science*, 15(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.003>.
- Maschietto, V., Marocco, A., Malachova, A., & Lanubile, A. (2015). Resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in maize inbred lines involves an earlier and enhanced expression of lipoxygenase (LOX) genes. *Journal of Plant Physiology*, 188, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.003>.
- Matušinsky, P., Sedláková, B., & Bleša, D. (2022). Compatible interaction of *Brachypodium distachyon* and endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *PLoS ONE*, 17(3), e0265357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265357>.
- McMullen, M., Jones, R., & Gallenberg, D. (1997). Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81(12), 1340-1348. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1340>.
- Mentewab, A., Rezanoor, H. N., Gosman, N., Worland, A. J., & Nicholson, P. (2000). Chromosomal location of *Fusarium* head blight resistance genes and analysis of the relationship between resistance to head blight and brown foot rot. *Plant Breeding*, 119(1), 15-20. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00439.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x>.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., & Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19613-19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>.
- Mochida, K., & Shinozaki, K. (2013). Unlocking *Triticeae* genomics to sustainably feed the future. *Plant and Cell Physiology*, 54(12), 1931-1950. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct163>.
- Mochida, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Takahashi, F., Yoshida, T., Sakurai, T., & Shinozaki, K. (2013). Large-scale collection and analysis of full-length cDNAs from *Brachypodium distachyon* and integration with *Pooideae* sequence resources. *PLoS One*, 8(10), e75265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075265>.
- Moon, J., Parry, G., & Estelle, M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *The Plant Cell*, 16(12), 3181-3195. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.161220>.
- Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935-944. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00429-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00429-X).
- Mukhopadhyay, P., & Tyagi, A. K. (2015). OsTCP19 influences developmental and abiotic stress signaling by modulating ABI4-mediated pathways. *Scientific Reports*, 5(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep09998>.

- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A. C., & Zeier, J. (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell*, 24(12), 5123-5141. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103564>
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium Species. In: An Illustrated Manual for Identification*, Pennsylvania State University Press, University Park, 193. URN:ISBN:0-271-00349-9
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B. F., & Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 579-609. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.142628>.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C., & Aoki, T. (2004). Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41(6), 600-623. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.03.003>.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583-595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>.
- Pajeroska-Mukhtar, K. M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C. L., Fonseca, J. P., & Dong, X. (2012). The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Current Biology*, 22(2), 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.015>.
- Park, C. J., Kim, K. J., Shin, R., Park, J. M., Shin, Y. C., & Paek, K. H. (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal*, 37(2), 186-198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01951.x>.
- Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-116. <https://doi.org/10.1126/science.1147113>.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., & McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals a review. *Plant Pathology*, 44(2), 207-238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x>.
- Pasquet, J. C., Chaouch, S., Macadré, C., Balzergue, S., Huguet, S., Martin-Magniette, M. L., & 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), 1-17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-629>.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>.
- Penninckx, I. A., Eggermont, K., Terras, F. R., Thomma, B. P., De Samblanx, G. W., Buchala, A., & Broekaert, W. F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell*, 8(12), 2309-2323. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.12.2309>.
- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-100>.
- Placinta, C. M., D'Mello, J. F., & Macdonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78(1-2), 21-37. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00278-8).
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., & Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>

- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314-330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J. J., Rothenberg, M., & Ecker, J. R. (1995). Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*, 139(3), 1393-1409. <https://doi.org/10.1093/genetics/139.3.1393>.
- Ross, A. F. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, 14(3), 340-358. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(61\)90319-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(61)90319-1).
- 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. <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n2.20574>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2014.01.001>.
- Sato, T., & Theologis, A. (1989). Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(17), 6621-6625. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6621>.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., & Métraux, J. P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 274. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00274>.
- Shibuya, N., & Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 223-233. <https://doi.org/10.1006/pmp.2001.0364>.
- 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00083>.
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., André, N., & Schobert, M. (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*, 39-45. <https://www.jstor.org/stable/24905689>.
- Sieber, T., Riesen, T. K., Müller, E., & Fried, P. M. (1988). Endophytic Fungi in Four Winter Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L.) Differing in Resistance Against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. = *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of Phytopathology*, 122(4), 289-306. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1988.tb01021.x>.
- Siedow, J. N. (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 145-188. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001045>.
- Sinha, M., Singh, R. P., Kushwaha, G. S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S., & Singh, T. P. (2014). Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/543195>.
- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3703>.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89-100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., & Pieterse, C. M. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760-770. <https://doi.org/10.1105/tpc.009159>.
- Srinivasan, T., Kumar, K., Meur, G., & Kirti, P. B. (2009). Heterologous expression of *Arabidopsis* NPR1 (AtNPR1) enhances oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Biotechnology Letters*, 31(9), 1343-1351. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0022-5>.

- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>.
- Staswick, P. E., Huang, J. F., & Rhee, Y. (1991). Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. *Plant Physiology*, 96(1), 130-136. <https://doi.org/10.1104/pp.96.1.130>.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., & Métraux, A. J. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1), 235-270. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.235>.
- 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*, 9(1), 2596. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39615-2>.
- The International Brachypodium Initiative. (2010). Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 463, 763-768. <https://doi.org/10.1038/nature08747>.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., & Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>.
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 15107-15111. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15107>.
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 459-465. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>.
- Turck, F., Zhou, A., & Somssich, I. E. (2004). Stimulus-dependent, promoter-specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene *PcPRI-1* in parsley. *The Plant Cell*, 16(10), 2573-2585. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024810>.
- Urban, M., Daniels, S., Mott, E., & Hammond-Kosack, K. (2002). *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *The Plant Journal*, 32(6), 961-973. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01480.x>.
- Van Dam, J. V., Faaij, A. P. C., Lewandowski, I., & Fischer, G. (2007). Biomass production potentials in Central and Eastern Europe under different scenarios. *Biomass and Bioenergy*, 31(6), 345-366. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.10.001>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90395-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90395-8).
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85-97. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213>.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. H., & Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245-264. <https://doi.org/10.1007/BF02668748>.
- Vance, C. P., Kirk, T. K., & Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18(1), 259-288. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.090180.001355>.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., & Castresana, C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *The Plant Cell*, 19(3), 831-846. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046052>.
- Vogel, J., Bragg J. (2009). Genetics and Genomics of the Triticeae (*Brachypodium distachyon*, a new model for the Triticeae). Springer, New York, NY, pp 427-449.

- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2007). *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26(7), 877-885. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.09.003>.
- Wang, R., Shen, W., Liu, L., Jiang, L., Liu, Y., Su, N., & Wan, J. (2008). A novel lipoxygenase gene from developing rice seeds confers dual position specificity and responds to wounding and insect attack. *Plant Molecular Biology*, 66(4), 401-414. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9278-0>.
- Wasternack, C., & Kombrink, E. (2010). Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology*, 5(1), 63-77. <https://doi.org/10.1021/cb900269u>.
- Way, H. M., Kazan, K., Goulter, K. C., Birch, R. G., & Manners, J. M. (2000). Expression of the Shpx2 peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. *Molecular Plant Pathology*, 1(4), 223-232. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00027.x>.
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388-393. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(92\)90230-5](https://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90230-5).
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-565. <https://doi.org/10.1038/35107108>.
- Windels, C. E. (1991). Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology*, 81(9), 1048-1051.
- Wróbel-Kwiatkowska, M., Lorenc-Kukula, K., Starzycki, M., Oszmiański, J., Kepczyńska, E., & Szopa, J. (2004). Expression of β -1, 3-glucanase in flax causes increased resistance to fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(5), 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.02.008>.
- Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., & Turner, J. G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280(5366), 1091-1094. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1091>.
- Xu, X. M., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Cooke, B. M., Doohan, F. M., & Edwards, S. G. (2008). Relationship between the fungal complex causing *Fusarium* head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, 98(1), 69-78. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-1-0069>.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M., Kleier, D. A., & Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *The Plant Cell*, 3(8), 809-818. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.8.809>.
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 155-189. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001103>.
- Yu, D., Chen, C., & Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *The Plant Cell*, 13(7), 1527-1540. <https://doi.org/10.1105/TPC.010115>.
- Zambell, C. B., & White, J. F. (2015). In the forest vine *Smilax rotundifolia*, fungal epiphytes show site-wide spatial correlation, while endophytes show evidence of niche partitioning. *Fungal Diversity*, 75(1), 279-297. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0316-3>.
- Zheng, Z., Qualley, A., Fan, B., Dudareva, N., & Chen, Z. (2009). An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity. *The Plant Journal*, 57(6), 1040-1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03747.x>.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T., & Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-760. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

13-HPOT	13-hydroperoxylinolenová kyselina
ABA	kyselina abscisová
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ACO	ACC oxidasa
ACX	acyl-CoA oxidasa
AOC	allenoxid cyklasa
AOS	allenoxid syntasa
ASK1	<i>Arabidopsis</i> homolog SKP1
AzA	kyselina azaleová
AZI1	transferový protein
<i>Bd</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
BR	brassinosteroidy
BRCA2	z angl. breast cancer susceptibility 2
CDPK	kalcium dependentní proteinkinasy
CK	cytokininy
COI1	z angl. coronatine insensitive 1
CUL3	ubikvitin ligasa Cullin 3
CYC/TB1	z angl. CYCLOIDEA/TEOSINTE BRANCHED 1
DA	dehydroabietinal
DAMPs	vlastní poškozené molekulární vzory
DIR1	protein přenášející lipidy
DON	deoxynivalenol
Dpi	den po inokulaci
DSE	z angl. dark septate endophytes
EIL	z angl. EIN3-like 1
EIN	z angl. ethylene insensitive
EPS1	gen kodující BAHD acyltransferasu
ERF1	z angl. ethylene response factors
ERS	z angl. ethylene response sensor
ET	ethylen
ETI	imunita aktivovaná efektozem
ETR	z angl. ethylene response

ETS	efektorem spuštěná citlivost
<i>Fa</i>	<i>Fusarium asiaticum</i>
<i>Fc</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
FCR	krčková hniloba
<i>Fg</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
FHB	růžovění klasů obilovin
FLS	z angl. flagellin sensitive 2; bičíkový receptor
<i>Fp</i>	<i>Fusarium pseudograminearum</i>
FRR	hniloba kořenů
G3P	glycerol-3-fosfát
GA	gibereliny
Hai	hodin po infekci
HPL	hydroperoxidlyasa
HR	hypersenzitivní reakce
IC	isochorismát
ICS	isochorismátsyntasa
ISR	indukovaná systémová rezistence
JA	jasmonáty
JAR1	JA-amidosyntetasa
JAZ	z angl. jamonate ZIM-domain
KAT	L-3-ketoacyl-CoA thiolasa
LOX 13	13-lipoxygenasa
LOX	lipoxygenasy
LRR	repetice bohaté na leucin
MAMPs	molekulární vzory typické pro mikroby
MAPK	MAP kinasy
MAT	S-adenosylmethionin syntetasa
<i>Mb</i>	<i>Microdochium bolleyi</i>
MED26	mediátor 25
MeSA	methylsalicylát
MFP	multifunkční protein
MTA	5'-methylthioadenosin
MTI	imunita aktivovaná pomocí MAMP
NB	místo, na které se váže nukleotid

NIV	nivalenol
NLR	NOD-like receptory
NPR1	nonexpressor of pathogenesis-related genes1
OPC-8	3-oxo-2-(cis-2'-pentenyl)-cyklopentan-1-oktanová kyselina
OPDA	(9S, 13S)-12-oxo-fyodienové kyselina
OPR3	OPDA reduktasa 3
PAL	fenylpropanoidová dráha
PAMPs	molekulární vzory typické pro patogeny
PCF	z angl. PROLIFERATING CELL FACTOR
PDF1.2	defensin
PIN	geny kodující inhibitory proteinas
Pip	kyselina pipekolová
PLA1	fosfolipasa A1
POX	peroxidasy
PR	proteiny související s patogenezí
PRR	receptory rozeznávající patogeny
PTI	imunita aktivovaná pomocí PAMP
RBX1	z angl. ring-box1
RK	doména kinas
RLK	receptor podobný kinasam
SA	kyselina salicylová
SABP2	z angl. SA-binding protein 2
SAM	S-adenosylmethionin
SAMT	SA-methyltransferasa
SAR	systemově získaná rezistence
SCF ^{COI1}	Skp-Cullin-F-box
TBF1	TL1- vazebný transkripční faktor
TCP	z angl. TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF
THI2.1	thionin
TMV	virus tabákové mozaiky
VSPs	z angl. vegetative storage proteins
ZEA	zearalenon
α -LeA	kyselina α -linolenová