

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2022**

**Bára Starošítková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Optimalizace diagnostiky houby *Microdochium  
bolleyi* v rostlinném hostiteli pomocí  
molekulárních metod**

**Bakalářská práce**

**Bára Starošíková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2022**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bára STAROŠTÍKOVÁ**  
Osobní číslo: **R19857**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Optimalizace diagnostiky houby *Microdochium bolleyi* v rostlinném hostiteli pomocí molekulárních metod**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

1. Zpracování literární rešerše k danému tématu.
2. Charakterizace organismu *Microdochium bolleyi*
3. Podrobný popis endofytismu
4. Charakterizace organismu *B. distachyon* a popis současných znalostí o využití *B. distachyon* ve výzkumu obecně
5. Charakterizace pšenice z hlediska interakcí s endofytickými houbami
6. Založení a vedení experimentů ve skleníku popř. fytostronu
7. Inokulace rostlin (pšenice a *B. distachyon*) endofytickou houbou
8. Odběr rostlin, izolace DNA, vlastní analýza pomocí PCR a qPCR
9. Vyhodnocení a zpracování dat.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Damm U, Brune A, Mendgen K. In vivo observation of conidial germination at the oxic-anoxic interface and infection of submerged reed roots by *Microdochium bolleyi*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003 Aug 1;45(3):293-9. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00161-2.
- Knapp DG, Németh JB, Barry K, Hainaut M, Henrissat B, Johnson J, Kuo A, Lim JHP, Lipzen A, Nolan M, Ohm RA, Tamás L, Grigoriev IV, Spatafora JW, Nagy LG, Kovács GM. Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Sci Rep.* 2018 Apr 20;8(1):6321. doi: 10.1038/s41598-018-24686-4.
- David AS, Haridas S, LaButti K, Lim J, Lipzen A, Wang M, Barry K, Grigoriev IV, Spatafora JW, May G. Draft Genome Sequence of *Microdochium bolleyi*, a Dark Septate Fungal Endophyte of Beach Grass. *Genome Announc.* 2016 Apr 28;4(2):e00270-16. doi: 10.1128/genomeA.00270-16.
- Murray, D.I.L.Gadd, G.M. 1981 Preliminary studies on *Microdochium bolleyi* with special reference to colonization of barley *Transactions of the British Mycological Society.* VOL- 76, (3), 397-403, doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80065-4
- Peraldi Antoine, Giovanni Beccari, Andrew Steed and Paul Nicholson. *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study Fusarium head blight and other Fusarium diseases of wheat. *BMC Plant Biology* (2011), 11:100
- Zhong, S., Ali, S., Leng, Y., Wang, R., and Garvin, D. F. 2015. *Brachypodium distachyon*: *Cochliobolus sativus* pathosystem is a new model for studying plant – fungal interactions in cereal crops. *Phytopathology* 105:482-489.
- Fitzgerald Timothy L., Jonathan J. Powell, Katharina Schneebeli, M. Mandy Hsia, Donald M. Gardiner, Jennifer N. Bragg, C. Lynne McIntyre, John M.

Manners, Mick Ayliffe, Michelle Watt, John P. Vogel, Robert J. Henry and Kemal Kazan. *Brachypodium* as an emerging model for cereal – pathogen interactions. *Annals of Botany* 115: 717-731. 2015 doi:10.1093/aob/mcv010nl

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

Datum zadání bakalářské práce: **15. března 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2022**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Hlávčice  
tel.: +420 585 634 901  
-2-

L.S.



16-03-2021

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 16. března 2021

## **Bibliografické údaje**

Jméno a příjmení autora: Bára Starošítková

Název práce: Optimalizace diagnostiky houby *Microdochium bolleyi* v rostlinném hostiteli pomocí molekulárních metod

Typ práce: bakalářská

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

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

Rok obhajoby práce: 2022

Klíčová slova: endofyt, *Microdochium bolleyi*, hostitel, kvantitativní Real-time PCR, biologická ochrana rostlin, ITS oblast

Počet stran: 56

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

## **SOUHRN**

Endofytické houby, včetně *Microdochium bolleyi*, významně ovlivňují některé své rostlinné hostitele a pro řadu z nich mají pozitivní přínos. Mohou se podílet na zvýšení odolnosti rostlin vůči abiotickému i biotickému stresu a tím zajistit jejich přežití zejména v nepříznivých podmínkách. Pro detekci endofytů se v současnosti čím dál více uplatňují molekulární metody, a to hlavně různé typy PCR.

Teoretická část této práce se věnuje charakterizaci organismu *Microdochium bolleyi* a podrobnému popisu endofytismu, včetně významu endofytů, jejich přínosu pro dané rostlinné hostitele a také možnosti využití molekulárních metod pro jejich detekci. Dále je zde uvedena charakteristika organismu *Brachypodium distachyon* a interakce pšenice s endofytickými houbami.

Cílem praktické části byla optimalizace diagnostiky endofytické houby *Microdochium bolleyi* v pšenici (*Triticum aestivum*) a rostlině *Brachypodium distachyon* pomocí kvantitativní Real-time PCR (qPCR). Pro detekci *M. bolleyi* byly použity druhově specifické primery navržené pro amplifikaci ITS oblasti rDNA. Pomocí kvantitativní Real-time PCR byla endofytická houba úspěšně detekována v obou rostlinných hostitelích a stejně tak bylo stanoveno relativní množství endofytu v jednotlivých částech rostlin. Přítomnost endofytu ve formě chlamydospor byla v jednotlivých kořenech pozorována i pomocí světelného mikroskopu. Přestože houba *Microdochium bolleyi* patří mezi tzv. kořenové endofyty, její přítomnost byla prokázána i v bázi stébla.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Bára Starošítková

Title: Optimization of diagnostics of the fungus *Microdochium bolleyi* in a plant host using molecular methods

Type of thesis: bachelor

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

Supervisor: Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Keywords: endophyte, *Microdochium bolleyi*, host, quantitative Real-time PCR, biological control, ITS region

Number of pages: 56

Number of appendices: 0

Language: Czech

## **SUMMARY**

Endophytic fungi including *Microdochium bolleyi* can offer many benefits to some of their plant hosts such as improved tolerance to abiotic and biotic stress. Therefore, endophytes play an important role in plant's survival especially in harsh conditions. Nowadays, the presence of endophytes is very often detected by molecular methods, mostly by different types of PCR.

The aim of theoretical part was to characterize the endophytic organism *Microdochium bolleyi* and to provide readers with detailed information about endophytes including their importance in plant biology and molecular techniques used for their detection. It also focuses on description of model organism *Brachypodium distachyon* and interaction of wheat with endophytic fungi.

The aim of experimental part was to optimize the diagnostics of the endophytic fungus *Microdochium bolleyi* in wheat (*Triticum aestivum*) and *Brachypodium distachyon* using quantitative Real-time PCR (qPCR). *M. bolleyi* was detected with the help of species-specific primers designed for amplification of the ITS region of rDNA. This method successfully detected the endophyte *M. bolleyi* in both plant hosts and determined its relative quantity in different parts of plants. Clusters of chlamydospores indicating the presence of *M. bolleyi* in root tissue were also observed using the light microscope. Even though *M. bolleyi* primarily colonizes plant roots, in this experiment it was found in stem bases as well.

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

V Olomouci dne.....

Podpis.....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Pavlu Matušinskému, Ph.D. za jeho odborný dohled a vedení, pomoc, cenné rady, ochotu, přátelský přístup a v neposlední řadě čas a trpělivost, který mi během této práce věnoval.



## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CÍLE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
3.1	Charakterizace organismu <i>Microdochium bolleyi</i> .....	3
3.1.1	Základní charakteristika .....	3
3.1.2	Taxonomická klasifikace a morfologie .....	3
3.1.3	Význam a vztah k různým hostitelům .....	4
3.1.4	Praktické využití .....	5
3.2	Endofytismus .....	5
3.2.1	Představení endofytismu .....	5
3.2.2	Původ endofytů .....	7
3.2.3	Rozdělení endofytických hub .....	7
3.2.4	Produkce sekundárních metabolitů .....	9
3.2.5	Endofyty a indukovaná rezistence rostlin .....	10
3.3	Molekulární metody detekce a identifikace endofytů .....	12
3.3.1	Příklady molekulární detekce endofytických hub .....	14
3.3.2	Kvantifikace endofytů pomocí kvantitativní Real-time PCR .....	15
3.4	Mikroskopické metody používané ke kvantifikaci endofytů .....	18
3.5	Charakterizace organismu <i>Brachypodium distachyon</i> a popis současných znalostí o využití <i>B. distachyon</i> ve výzkumu obecně .....	19
3.5.1	Základní charakteristika .....	19
3.5.2	Využití a význam .....	19
3.6	Charakterizace pšenice z hlediska interakcí s endofytickými houbami .....	20
3.6.1	Endofyty v semenech pšenice .....	21
3.6.2	Význam endofytů pro udržitelnější produkci pšenice .....	22
4	MATERIÁL A METODY .....	23
4.1	Biologický materiál .....	23
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky .....	23
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení .....	23

4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy .....	24
4.4.1	Založení experimentu ve skleníku.....	24
4.4.1.1	Příprava inokula.....	24
4.4.1.2	Setí a odběr vzorků.....	24
4.4.2	Mikroskopování kořenů.....	25
4.4.3	Izolace DNA.....	25
4.4.4	Kvantitativní Real-time PCR (qPCR).....	26
4.4.4.1	Testování specifity primerů (MbRT_ITS a MbqPCR).....	27
4.4.4.2	Efektivita reakce.....	28
4.4.4.3	Kvantifikace v hostiteli.....	28
4.4.4.4	Distribuce v rostlině .....	30
5	VÝSLEDKY .....	31
5.1	Odběr vzorků.....	31
5.2	Mikroskopování.....	32
5.3	Výsledky qPCR .....	34
5.3.1	Testování specifity primerů (MbRT_ITS a MbqPCR).....	34
5.3.2	Efektivita reakce.....	36
5.3.3	Kvantifikace v hostiteli.....	38
5.3.3.1	Kvantifikace <i>Microdochium bolleyi</i> v rostlině <i>Brachypodium distachyon</i> (stanovení dynamiky).....	38
5.3.3.2	Kvantifikace <i>Microdochium bolleyi</i> v rostlinách pšenice (stanovení dynamiky).....	39
5.3.4	Distribuce v rostlině .....	39
6	DISKUZE.....	41
7	ZÁVĚR.....	44
8	LITERATURA .....	45

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Fylogenetický strom <i>Microdochium</i> spp. a dalších druhů hub sestrojený pomocí neighbor-joining metody na základě sekvencí ITS oblasti rDNA .....	4
<b>Obrázek 2:</b> Schématické znázornění houbové rDNA s ITS1 a ITS2 oblastmi oddělující geny kódující 18S, 5.8S, 28S rRNA.....	14
<b>Obrázek 3:</b> Fáze amplifikační křivky.....	16
<b>Obrázek 4:</b> Klastry chlamydospor <i>M. bolleyi</i> v kořenech rostlin <i>B. distachyon</i> třetího odběru, Z: 400× .....	33
<b>Obrázek 5:</b> Klastry chlamydospor <i>M. bolleyi</i> v kořenech rostlin <i>B. distachyon</i> pátého odběru, Z: 400× .....	33

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Složení reakční směsi pro qPCR.....	27
<b>Tabulka 2:</b> Teplotní program qPCR reakce a analýzy křivek tání.....	27
<b>Tabulka 3:</b> Testované primery pro detekci ITS oblasti rDNA <i>M. bolleyi</i> .....	28
<b>Tabulka 4:</b> Primery pro kvantifikaci <i>M. bolleyi</i> v rostlině <i>B. distachyon</i> .....	29
<b>Tabulka 5:</b> Použité vzorky DNA izolované z kořenů <i>B. distachyon</i> pro kvantifikaci <i>M. bolleyi</i> .....	29
<b>Tabulka 6:</b> Primery pro kvantifikaci <i>M. bolleyi</i> v pšenici.....	29
<b>Tabulka 7:</b> Použité vzorky DNA izolované z kořenů pšenice pro kvantifikaci <i>M. bolleyi</i> .....	30
<b>Tabulka 8:</b> Použité vzorky DNA izolované z různých částí rostlin pro stanovení distribuce <i>M. bolleyi</i> .....	30
<b>Tabulka 9:</b> Průměrné délky rostlin a převládající fáze růstu jednotlivých odběrů .....	31
<b>Tabulka 10:</b> Průměrný počet klásků na 1 rostlin u <i>B. distachyon</i> varianty Mb0 a Mb1 .....	32
<b>Tabulka 11:</b> Mikroskopická detekce <i>M. bolleyi</i> v kořenech pšenice a <i>B. distachyon</i> .....	33
<b>Tabulka 12:</b> C <sub>q</sub> hodnoty pro Mb a Mm získané při testování primerů MqPCR a MbRT_ITS .....	34
<b>Tabulka 13:</b> C <sub>q</sub> hodnoty pro jednotlivé roztoky ředící řady (efektivita reakce).....	36

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Amplifikační křivka pro vzorky DNA <i>M. bolleyi</i> a <i>M. majus</i> získaná při testování specifity primerů MbqPCR .....	34
<b>Graf 2:</b> Křivka tání pro jednotlivé PCR produkty získané při testování specifity primerů MbqPCR ..	35
<b>Graf 3:</b> Amplifikační křivka pro vzorek DNA <i>M. bolleyi</i> získaná při testování specifity primerů MbRT_ITS .....	35
<b>Graf 4:</b> Křivka tání pro jednotlivé PCR produkty získané při testování specifity primerů MbRT_ITS .....	36
<b>Graf 5:</b> Standardní křivka pro zjištění efektivity reakce .....	37
<b>Graf 6:</b> Amplifikační křivky pro vzorky DNA izolátů <i>M. bolleyi</i> ředící řady.....	37
<b>Graf 7:</b> Křivky tání pro jednotlivé PCR produkty získané při zjišťování efektivity reakce .....	38
<b>Graf 8:</b> Relativní množství DNA <i>M. bolleyi</i> v rostlinách <i>B. distachyon</i> (varianty Bd Mb0, Bd Mb1) jednotlivých odběrů.....	38
<b>Graf 9:</b> Relativní množství DNA <i>M. bolleyi</i> v rostlinách pšenice (varianty Whe Mb0, Mb1) jednotlivých odběrů.....	39
<b>Graf 10:</b> Distribuce endofytu <i>M. bolleyi</i> v rostlinách <i>B. distachyon</i> (varianty Bd Mb0, Mb1; 4. odběr) .....	40
<b>Graf 11:</b> Distribuce endofytu <i>M. bolleyi</i> v rostlinách pšenice (varianty Whe Mb0, Mb1; 4. odběr) ...	40

## 1 ÚVOD

Endofyty představují rozsáhlou skupinu mikroorganismů, zejména hub a bakterií, vyskytující se po většinu svého životního cyklu uvnitř rostlinného hostitele a zpravidla nezpůsobují žádné viditelné příznaky onemocnění. Jejich význam spočívá především ve schopnosti poskytnout rostlinám ochranu proti řadě patogenům, což je obzvláště výhodné v případě patogenních organismů s devastujícím dopadem na produkci hospodářsky významných rostlin. Ukazuje se také, že přítomnost endofytů je zásadní pro přežití určitých druhů rostlin, zejména v prostředí, kde jsou vystaveny abiotickému a biotickému stresu. U řady endofytů byla rovněž zaznamenána schopnost produkovat sekundární metabolity s příznivými účinky na dané rostlinné hostitele.

Houba *Microdochium bolleyi* se řadí do specifické skupiny kořenových endofytů označovaných jako 'dark septate endophytes' a nachází se hlavně v kořenech obilovin a různých druhů trav. Vliv *Microdochium bolleyi* na svého hostitele se liší především v závislosti na rostlinném druhu. Nicméně prospěšnými vlastnostmi se vyznačuje zejména v souvislosti s důležitými zástupci obilovin, a to pšenice a ječmene. Potenciální uplatnění by tato houba mohla nalézt v biologické ochraně pšenice před škodlivými organismy, jako jsou například zástupci z rodu *Fusarium*. Pro využití *M. bolleyi* například v ekologickém zemědělství je nutná její správná a přesná diagnostika a vybrané metody detekce optimalizovat. Jako nejspolehlivější a zároveň poměrně jednoduchý a rychlý způsob detekce této houby se jeví využití molekulárních metod, a to především konvenční PCR nebo kvantitativní Real-time PCR, umožňující nejen její detekci, ale také kvantifikaci.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce je vypracování literární rešerše se zaměřením na charakterizaci organismu *Microdochium bolleyi*, podrobný popis endofytů včetně molekulárních metod jejich detekce, dále pak na modelový organismus *Brachypodium distachyon* a popis interakce pšenice s endofytickými houbami.

Cílem praktické části je optimalizace diagnostiky endofytu *Microdochium bolleyi* pomocí metody kvantitativní Real-time PCR v pletivech hostitele a analýza distribuce endofytu v rostlině a dynamiky kolonizace hostitele endofytem v čase.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Charakterizace organismu *Microdochium bolleyi*

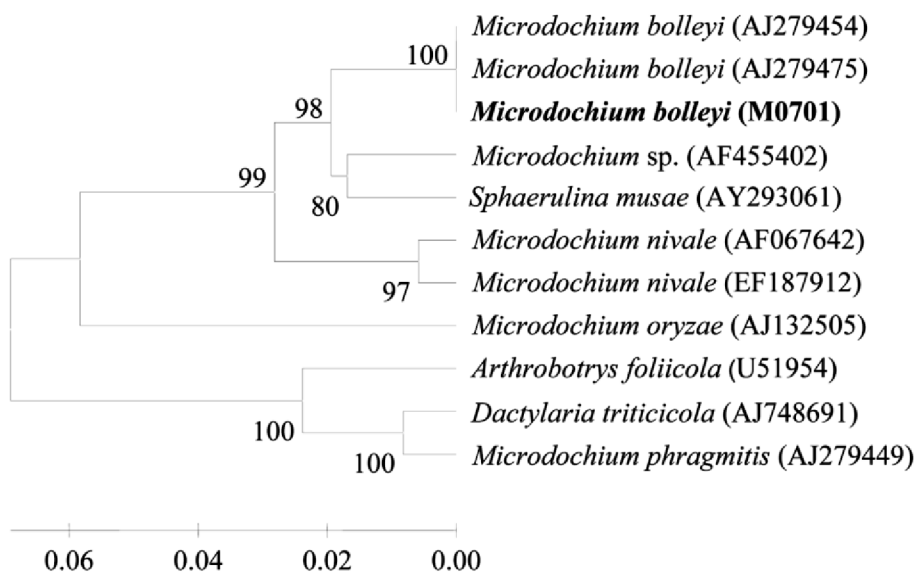
##### 3.1.1 Základní charakteristika

*Microdochium bolleyi* (Sprague) de Hoog and Hermanides-Nijhof je endofytická houba žijící především v kořenech daného rostlinného hostitele a byla izolována zejména z kořenů či báze stébla některých obilovin, například pšenice a různých druhů trav (Reinecke, 1978; Salt, 1977). *Microdochium bolleyi* je obecně považována za nepatogenní houbu, avšak v některých případech může vykazovat slabou patogenitu (Kirk *et* Deacon, 1987). Společně s dalšími zástupci z oddělení *Ascomycota* (převážně z řádů *Helotiales*, *Xylariales* a *Pleosporales*) (Andrade-Linares *et* Franken, 2013; Knapp *et al.*, 2012; Newsham, 2011; Addy *et al.*, 2005; Jumpponen *et* Trappe, 1998) se řadí k tzv. ‘dark septate endophytes’ (DSE), vyznačující se tmavě zbarvenými hyfami s přepážkami, mikrosklerocii a chlamydosporami (Rothen *et al.*, 2018). Vliv endofytů ze skupiny DSE na své hostitele je podmíněn řadou faktorů jako je dostupnost živin, podmínky životního prostředí či experimentální podmínky, ale také samotné fyziologické postavení hostitele (Knapp *et al.*, 2018). Zástupci této skupiny kořenových endofytů včetně *Microdochium bolleyi* mohou kolonizovat intra nebo intercelulárně parenchym kořenů (Jumpponen *et* Trappe, 1998) bez toho, aby způsobovaly příznaky onemocnění u dané rostliny (Jumpponen, 2001). Skutečnost, že *M. bolleyi* se ve svém hostiteli nachází převážně ve formě chlamydospor, které jsou rezistentní a metabolicky inaktivní, a navíc kolonizuje pouze buňky primární kůry kořenů a nedostává se až do oblasti cévních svazků, je jednou z hypotéz, proč tento endofyt u mnohých rostlin asymptomaticky kolonizuje kořeny, které zůstávají zdravé (Murray *et* Gadd, 1981).

##### 3.1.2 Taxonomická klasifikace a morfologie

*Microdochium bolleyi* se řadí do čeledi *Microdochiaceae*, řádu *Xylariales*, třídy *Sordariomycetes*, pododdělení *Pezizomycotina* a oddělení *Ascomycota* (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016). Čeleď *Microdochiaceae* zahrnuje tři rody *Idriella*, *Microdochium* a *Selenodriella* (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016). Zástupci rodu *Microdochium* se vyznačují zanořeným myceliem, septy dělenými přepážkami a přeslenovitě větvenými konidiofory, barva hyf je hyalinní až hnědá (Hernández-Restrepo, 2016). Pro *Microdochium bolleyi* jsou typické konidie ve tvaru půlměsíce (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016), *in vitro* tvoří hyfy tmavě hnědé barvy, které mohou produkovat oranžový pigment (de Hoog *et* Hermanides-Nijhof, 1977). V kořenech rostlin vytváří *M. bolleyi* tmavě hnědé chlamydospory uspořádané do klastrů (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016). U daných kmenů *M. bolleyi* byla prokázána slabá amylázová aktivita (Rothen *et al.*, 2018). Příbuzné druhy jako je *Microdochium nivale* a *Microdochium majus* jsou na rozdíl od *M. bolleyi* vysoce patogenní a způsobují závažná onemocnění obilovin (Hernández-Restrepo, 2016). David *et al.*, 2016a v roce 2016 osekvenovali genom *M. bolleyi*, sestavený genom byl velký 38,84 Mbp a skládal se z 13 177 předpovězených genů.





**Obrázek 1:** Fylogenetický strom *Microdochium* spp. a dalších druhů hub sestrojený pomocí neighbor-joining metody na základě sekvencí ITS oblasti rDNA (Hong, 2008)

### 3.1.3 Význam a vztah k různým hostitelům

Význam *Microdochium bolleyi* a vliv na hostitele se liší v závislosti na rostlinném druhu. Jako endofyt poskytuje rostlinám odolnost vůči různým patogenním organismům a hraje důležitou roli v jejich ochraně před suchem a nepříznivými teplotami. Pozitivní vliv *Microdochium bolleyi* může být pozorován například v případě pšenice, u které nezpůsobuje žádné příznaky onemocnění a chrání ji před širokou škálou houbových patogenů jako je *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Shadmani *et al.*, 2018) způsobující černání báze stébel a kořenů, a také před patogeny *Fusarium culmorum* a *Bipolaris sorokiniana* (Duczek, 1997; Knudsen *et al.*, 1995). Houba *M. bolleyi* by se tedy mohla potenciálně uplatnit v biologické ochraně pšenice proti *G. graminis* (Jadubansa *et al.*, 1994) a nahradit některé fungicidy (Shadmani *et al.*, 2018). Hlavním hostitelem houby *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* je pšenice, ale vyskytuje se také na ječmenu (Shadmani *et al.*, 2018). *M. bolleyi* potlačuje šíření tohoto patogenu jak u pšenice, tak u ječmene (Shadmani *et al.*, 2018; Kirk *et Deacon*, 1987). Jedním z možných mechanismů, jakým *M. bolleyi* potlačuje růst patogenních organismů, je kompetice o prostor, konkrétně kompetice o odumírající buňky primární kůry kořenů u obilovin (Kirk *et Deacon*, 1987). Tímto způsobem zabrání ostatním patogenům přijímat živiny z těchto pletiv (Lascaris *et Deacon*, 1991; Kirk *et Deacon*, 1987). Mezi další faktory se řadí produkce metabolitů s antifungálními účinky (Zhang *et al.*, 2008).

Houba *Microdochium bolleyi* byla izolována i z kořenů rákosu obecného (*Phragmites australis*) (Damm *et al.*, 2003). Rákos roste převážně na březích vodních ploch, a tudíž se podzemní části rostliny nachází pod vodou. Rákos je proto velmi dobře adaptován na růst v podmínkách bez kyslíku, docíluje tím zejména pomocí transportu kyslíku aerenchymatickým pletivem (Jackson *et Armstrong*, 1999). Kyslík, který je takto rostlinami dodáván, podporuje mikrobiální procesy, jako je oxidace organického substrátu v jinak bezkyslíkatém prostředí (Liesack *et al.*, 2000). Bylo prokázáno,

že tento zdroj kyslíku využívají ke svému růstu aerobní houby v rhizosféře (Wirsel *et al.*, 2001), jako je právě *Microdochium bolleyi*. Houba tudíž penetruje kořeny rákosu nejen pro získání živin, ale hlavně kvůli přítomnému kyslíku, jehož přítomnost je zásadní pro aerobní metabolismus (Damm *et al.*, 2003). V prostředí bez kyslíku není tato houba schopna využívat saprofytický způsob výživy, přežít však může uvnitř kořene rákosu, kde přijímá organické živiny od hostitele a chová se tedy jako biotrof (Damm *et al.*, 2003).

V některých případech může houba *Microdochium bolleyi* působit jako slabý patogen či parazit. Její patogenita byla zjištěna například u druhu trávy psineček výběžkatý (*Agrostis stolonifera*) (Hong *et al.*, 2008), který je využíván a šlechtěn zejména pro trávnickové účely pro osetí golfových hřišť, či některých typů trávníků z důvodu jeho tolerance k nízkému kosení (Cibulka, 2013). Dále je tento druh trávy vyséván na pastvinách, jelikož je schopný odolávat narušení půdy dobyt看em (Cibulka, 2013). U psinečku způsobuje *M. bolleyi* hnilobu bazálních částí stébel (Hong *et al.*, 2008), což má negativní ekonomický dopad.

Podle některých studií se určitý kmen *M. bolleyi* může chovat jako oportunistický kolonizátor trav rostoucích na pobřežních písčinych dunách, a to v důsledku relativně rychlého růstu a produkce velkého množství spor (David *et al.*, 2016b). V pobřežních oblastech musí rostliny čelit drsným podmínkám jako jsou především půdy s minimální vlhkostí a nízkým obsahem živin, silné povětrnostní podmínky a kontakt s mořskou vodou (David *et al.*, 2016a). Předpokládá se, že jsou to právě endofytické houby, které rostlinám umožňují v těchto podmínkách přežít (Martin *et Dombrowski*, 2015).

#### **3.1.4 Praktické využití**

Jelikož endofytická houba *M. bolleyi* působí pozitivně na řadu rostlin a převážně na ekonomicky významné obiloviny, mohla by být potenciálně využita pro biologickou ochranu rostlin. Fungicidy jsou často neúčinné, a především nebezpečné a nevhodné pro životní prostředí, proto je důležité hledat alternativní metody (biologický způsob potlačení škůdců) ochrany rostlin před různými patogeny (Shadmani, *et al.*, 2018). Některým obilovinám, jako je pšenice a ječmen, poskytuje *M. bolleyi* ochranu před závažnými patogeny a celkově má pozitivní vliv na vývoj rostlin a podporuje jejich růst. Na druhou stranu může v ojedinělých případech vyvolat příznaky onemocnění. Proto je nutné optimalizovat diagnostiku tohoto organismu, aby byla v případě potřeby provedena jeho správná identifikace a izolace z daného rostlinného materiálu.

### **3.2 Endofytismus**

#### **3.2.1 Představení endofytismu**

Termínem endofyt se označuje endosymbiotický mikroorganismus, nejčastěji bakterie nebo houba (Gouda *et al.*, 2016), která kolonizuje inter a/nebo intracelulárně rozličné části rostlin (Pimentel *et al.*, 2011). Jedná se o všudypřítomné organismy, které jsou v přírodě hojně zastoupeny (Nair *et Padmavathy*, 2014; Sieber, 1988). Pro tyto organismy je typické, že buď část nebo celý jejich životní

cyklus se odehrává uvnitř svých hostitelů, aniž by je poškozovaly či způsobovaly zjevné symptomy onemocnění (Gouda *et al.*, 2016). Termín endofyt poprvé použil německý mykolog Anton de Bary v roce 1866 v souvislosti s potřebou odlišit endofyty od jednotlivých epifytů žijících na povrchu rostlin (Arora *et Ramawat*, 2017). Obecně je vztah hostitel-endofyt považován převážně za mutualistický (Arora *et Ramawat*, 2017), výjimku představují endofytické houby, které se mohou chovat jako latentní patogen či saprofág (Knapp *et al.*, 2018). Typ interakce mezi endofytem a hostitelskou rostlinou se totiž může měnit v závislosti na daných podmínkách prostředí, zejména v případě, že je hostitel vystaven biotickému a abiotickému stresu (Hardoim *et al.*, 2015). To znamená, že daný druh endofytu může být patogenní pro jednu hostitelskou rostlinu, zatímco na jiné nemusí mít žádný vliv (Błaszczyk *et al.*, 2021). Nicméně komenzální endofyty, které nemají viditelný vliv na své hostitele, patří mezi nejčtetnější skupinu endofytů (Hardoim *et al.*, 2015).

Endofytické houby se mohou řadit k tzv. obligátním endofytům, v případě, že pro dokončení svého životního cyklu potřebují hostitelskou rostlinu (např. *Epichloë*) (Błaszczyk *et al.*, 2021). Naopak endofytické houby, které žijí převážně mimo vnitřní prostředí rostlin a pouze ojediněle se vyskytují uvnitř rostlinného těla, se nazývají oportunističtí endofyty (Hardoim *et al.*, 2015). Většina endofytů se však řadí k tzv. fakultativním endofytům, které představují jakýsi přechod mezi obligátními a oportunistickými endofyty (Saikkonen *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2009), to znamená, že mohou žít nezávisle nebo část jejich životního cyklu strávit uvnitř daného hostitele. Endofytické houby se dostávají do hostitelské rostliny z půdy prasklinami na kořenech či prostřednictvím ran způsobených mechanickým poškozením nebo fytopatogeny (Chi *et al.*, 2005). Možný je také vstup kořenovými vlásky a prostory mezi buňkami epidermis (Hardoim *et al.*, 2015). Stejně tak mohou být některé endofyty přenášeny semeny (Berg *et Raaijmakers*, 2018; Nelson, 2018).

Hostitelské rostliny poskytují endofytům ochranu a výživu, zatímco endofyty zprostředkovávají rostlinám příjem živin a chrání je před abiotickým stresem a různými škůdci (Arora *et Ramawat*, 2017). Narůstá množství důkazů o tom, že endofyty interagují s daným rostlinným patogenem různým způsobem v závislosti na druhu rostliny (Arora *et Ramawat*, 2017). V důsledku toho se pozmění fyziologie rostliny, která je pak schopna potlačit šíření patogenu, změnit rovnováhu živin ve prospěch endofytu a stimulovat rostlinné obranné mechanismy (např. indukovaná rezistence). Dále endofyty produkují specifické metabolity, v případě bakterií se může jednat o antibiotika, u hub to mohou být analogy fungicidů (Arora *et Ramawat*, 2017).

Předpokládá se, že přítomnost endofytů uvnitř hostitelských rostlin neovlivňuje pouze jejich růst, vývoj, fitness a diverzitu, ale také dynamiku jednotlivých populací a fungování ekosystému (Hardoim *et al.*, 2015; Saikkonen *et al.*, 1999). Jeden druh endofytu je schopný kolonizovat mnoho rostlinných druhů, a naopak několik druhů endofytů může být přítomno ve stejném druhu rostliny (Arora *et Ramawat*, 2017). Na druhou stranu si endofyty vyvinuly specifické mechanismy, které jim umožňují bránit se obranným reakcím rostlin (Arora *et Ramawat*, 2017). Příkladem může být alterace vazebného místa topoizomerázy u houby *Fusarium solani*, čímž je houba chráněna před účinky látky

(camptothecin) produkované rostlinou zvanou kamptoteka ostrolistá (*Camptotheca acuminata*), která by jinak vazbou na topoizomerázu zastavila buněčný cyklus houby (Kusari *et al.*, 2011).

### 3.2.2 Původ endofytů

Fosilní záznamy ukazují, že endofytické houby kolonizující rostliny se na Zemi vyskytovaly již před více než 400 miliony lety (Krings *et al.*, 2007). Během svého vývoje se rostliny postupně přemístily z vodního prostředí (oceánů) na souš, kde musely čelit mnoha překážkám (Arora *et Ramawat*, 2017). Jednalo se především o špatnou kvalitu půdy s nízkým obsahem živin, teplotní fluktuace, příliš vysoká koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře či nestálá dostupnost vody (Arora *et Ramawat*, 2017). Za těchto okolností to byly právě endofytické houby, jež rostlinám poskytly odolnost vůči těmto podmínkám, které nebyly zdaleka optimální a pomohly jim adaptovat se na život na souši (Bonfante *et Selse*, 2010; Selse *et Tacon*, 1998). Zároveň docházelo i k postupné adaptaci samotných endofytů na život v mikroprostředí rostliny (Germaine *et al.*, 2004).

### 3.2.3 Rozdělení endofytických hub

Endofytické houby byly původně rozděleny do dvou hlavních skupin, a to na základě toho, do kterého taxonu patří, příbuznosti a dle taxonomické příslušnosti samotného rostlinného hostitele (Rodriguez *et al.*, 2009). Endofytické houby první skupiny se označují jako C-endofyty (z angl. Clavicipitaceous) kolonizující některé druhy trav a druhá skupina pak zahrnuje tzv. NC-endofyty (z angl. Nonclavicipitaceous). NC-endofyty se mohou vyskytovat v pletivech nižších rostlin (kapradiny), nahosemenných a krytosemenných rostlin. Nicméně skupina NC-endofytů představuje vysoce rozmanitou skupinu hub a lze ji rozdělit do dalších alespoň tří skupin, a to podle způsobu přenosu, kolonizace hostitele a ekologické funkce. V současnosti se tedy endofyty řadí do čtyř různých skupin/tříd (Rodriguez *et al.*, 2009):

#### Třída 1 (C-endofyty)

Patří sem malá skupina endofytických hub, jež jsou příbuzné s druhy z čeledi *Clavicipitaceae* (paličkovcovité) (Bischoff *et White*, 2005). Vyskytují se téměř výhradně v trávách, přičemž kolonizují zejména mladé výhony a jsou náročné na kultivaci *in vitro* (Bischoff *et White*, 2005). Endofytické houby třídy 1, které asymptomaticky kolonizují daného rostlinného hostitele (Clay *et Schardl*, 2002), se přenášejí především vertikálně, tedy semeny (Saikkonen *et al.*, 2002). Je však možný i horizontální přenos (Rodriguez *et al.*, 2009). Zvyšují toleranci rostlin k suchu a produkují řadu látek, které jsou toxické pro býložravá zvířata (Clay, 1990). Nicméně to, zda endofyty této třídy poskytnou svému hostiteli výhody, je s velkou pravděpodobností podmíněno podmínkami životního prostředí, druhem a genotypem hostitele (Faeth *et al.*, 2006; Faeth *et Sullivan*, 2003; Saikkonen *et al.*, 1999).

#### Třída 2

Endofytické houby třídy 2 se mohou vyskytovat v nadzemních a podzemních pletivech rostlin a stejně jako endofyty třídy 4 jsou schopny rozsáhlé kolonizace pletiv (Rodriguez *et al.*, 2009). Je pro ně typický vertikální (přenos semennými obaly a oddenky) i horizontální přenos (Rodriguez *et al.*, 2009). Významnou vlastností endofytů třídy 2 je jejich schopnost umožnit svým hostitelům žít ve

stresových podmínkách (Rodriguez *et al.*, 2008). Většina zástupců této třídy patří do oddělení *Ascomycota*, malá část patří do oddělení *Basidiomycota* (Rodriguez *et al.*, 2009).

### **Třída 3**

Zástupci třídy 3 se převážně (některé druhy výhradně) nachází v nadzemních částech rostlin a přenáší se horizontálně (Rodriguez *et al.*, 2009). Tato skupina je oproti třídě 2 vysoce diverzifikovaná, především zastoupení těchto endofytů v jednom daném hostiteli je velmi rozmanité a jednotlivé druhy zde vytváří velké množství nezávislých menších kolonií (Rodriguez *et al.*, 2009). Stejně jako zástupci třídy 2 patří většina endofytů třídy 3 do oddělení *Ascomycota* nebo *Basidiomycota* (Rodriguez *et al.*, 2009).

### **Třída 4**

Do této skupiny se řadí tzv. ‘dark septate endofytes’ (DSE) (Rodriguez *et al.*, 2009) a jak již bylo zmíněno, mezi tyto endofyty patří i *Microdochium bolleyi*. Zástupci skupiny ‘dark septate endofytes’ kolonizují výhradně kořeny rostlin, přičemž nevyvolávají příznaky onemocnění (Rodriguez *et al.*, 2009) a typickým morfologickým znakem jsou tmavě pigmentované (melanizované) hyfy s přehrádkami (Rodriguez *et al.*, 2009; Jumpponen *et Trappe*, 1998). Stupeň pigmentace se však může u jednotlivých zástupců lišit a některé tyto houby vytváří pouze bezbarvé, hyalinní vlákna (Barrow, 2003). DSE zpravidla nevykazují hostitelskou specifitu, přenáší se horizontálně (Rodriguez *et al.*, 2009) a rozmnožují se tedy nepohlavně prostřednictvím disperze konidií a fragmentací mycelia (Jumpponen *et Trappe*, 1998). Během kolonizace rostlinných hostitelů vytváří tyto endofytické houby na povrchu kořenů síť hyf a následně se hyfy mohou rozrůstat až mezi kortikální buňky (O’Dell *et al.*, 1993). Někteří zástupci vytváří uvnitř kortikálních buněk kořenů shluky tlustostěnných buněk zvaných sklerocia či mikrosklerocia (Jumpponen *et Trappe*, 1998; Wang *et Wilcox*, 1985) nebo chlamydospory (O’Dell *et al.*, 1993), jež jsou typické pro *M. bolleyi*.

Endofyty této skupiny se vyskytují po celém světě, nejčastěji však kolonizují kořeny rostlin v aridních a semi-aridních oblastech (Sieber *et Grüning*, 2013; Mandyam *et Jumpponen*, 2005; Kovács *et Szigetvári*, 2002). Tyto oblasti se vyznačují nedostatkem živin a rostliny jsou zde vystaveny silnému abiotickému stresu (Knapp *et al.*, 2012). Jednou z hypotéz je, že zastoupení ‘dark septate endofytes’ a jejich význam pro rostlinného hostitele je tím větší, čím více jsou rostliny vystaveny abiotickému stresu v daném prostředí (Knapp *et al.*, 2012). Stejně tak i stupeň pigmentace souvisí s abiotickým stresem, především suchem (Bell *et Wheeler*, 1986), jelikož bylo zjištěno, že houby, jejichž buňky měly silně melanizované buněčné stěny, byly více odolné (Pennisi, 2003; Redman *et al.*, 2002). Z toho vyplývá, že jejich přítomnost v ekosystémech může být zásadní pro život rostlin. U některých druhů bylo zjištěno, že mají enzymy štěpící sacharidy (Knapp *et Kovács*, 2016; Caldwell *et al.*, 2000), a to včetně enzymů, které degradují buněčnou stěnu rostlin označovaných zkratkou PCWDEs (z angl. plant cell-wall degrading enzymes) (Knapp *et al.*, 2008). Tyto enzymy by pak endofytům umožnily rozkládat organický substrát a tím se významně podílet na výživě hostitele (Knapp *et al.*, 2018). Dále se předpokládá, že endofytické houby by se mohly účastnit degradace organické hmoty v půdách chudých

na živiny podobným způsobem jako erikoidní mykorrhizní houby (Knapp *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2008). Některé druhy DSE totiž zajišťují rostlinám příjem fosforu, dusíku a uhlíku, čímž podporují jejich růst (Surono *et al.*, 2017; Della Monica *et al.*, 2015). Skupina 'dark septate endofytes' představuje početnou a zajímavou skupinu endofytů, nicméně stále existuje málo dostupných informací týkajících se jejich taxonomie a ekologie (Rodriguez *et al.*, 2009). Komparativní genomika konkrétních druhů, jež patří mezi 'dark septate endofytes' ukázala, že tyto houby si vyvinuly unikátní genetické inovace a obsahují z větší části odlišné geny či genové duplikace specifické pouze pro určité druhy (Knapp *et al.*, 2018). Využitím právě komparativní genomiky by mohlo dojít k pochopení a zodpovězení otázek týkajících se evoluce a biologie endofytů (Knapp *et al.*, 2018).

### 3.2.4 Produkce sekundárních metabolitů

Klíčem ke studiu metabolitů endofytických hub je zejména jejich správná izolace z daného rostlinného hostitele. Prvním a nejdůležitějším krokem je sterilizace rostlinného vzorku řadou chemických látek (Deka, *et al.*, 2017). Nicméně povrchová sterilizace je často časově náročná a liší se u jednotlivých pletiv. Proto byla vyvinuta metoda, která umožňuje sterilizaci směsných vzorků souběžně, avšak odděleně (Greenfield *et al.*, 2015). Princip této metody je založen na použití sady perforovaných falkon, do každé z nich se vloží daný vzorek a následně se postupně každá z falkon ponoří do nádoby obsahující sterilizační látku. Pomocí této metody mohou být sterilizovány vzorky kořenů, stonků, listů nebo dokonce i celé klíčící rostliny (Greenfield *et al.*, 2015). Extrakce sekundárních metabolitů zahrnuje několik kroků. Nejprve se provádí kultivace izolátů v tekutém kultivačním médiu (bujónu), které musí být po určité době inkubace přefiltrováno, aby došlo k odstranění mycelií. Metabolity se z filtrátu oddělují pomocí organických rozpouštědel jako je ethyl acetát či dichlormethan. Extrakce kapalinou je nejčastější metoda využívaná k extrakci metabolitů, následně je rozpouštědlo odstraněno rotační vakuovou odparkou. Výsledné reziduum je předmětem testování (Deka *et al.*, 2017).

Sekundární metabolity produkované endofytickými houbami mohou zásadně ovlivňovat zdraví rostlinného hostitele. Jejich účinek spočívá především v podpoře růstu rostlin, zvýšení tolerance k biotickému (konkurence, škůdci, choroby) a abiotickému stresu (teplota, záření) (Gouda *et al.*, 2016) a potlačení růstu či aktivity škůdců prostřednictvím obranných mechanismů rostlin (Deka *et al.*, 2017). Endofytické houby se tudíž mohou nepřímo podílet i na zvýšení výnosu plodin, a to i ve stresových podmínkách (Deka *et al.*, 2017). V důsledku kolonizace rostlin endofyty dochází k produkci bioaktivních metabolitů či různých mykotoxinů, jež pak vedou otravám herbivorů (Roberts *et al.*, 2004; Carroll, 1988). Příkladem mohou být endofytické houby vyskytující se u trávy košťavy rákosovité (*Festuca arundinaceae*), které produkují velké množství látek jako jsou alkaloidy, amidy kyseliny lysergové, ergopeptiny, které způsobují závažné otravy zejména hovězího dobytka (Deka *et al.*, 2017). Endofyty kávovníku (*Beauveria bassiana* a *Clonostachys rosea*) chrání rostliny před největším škůdcem kávových rostlin, broukem *Hypothenemus hampei* z čeledi nosatcovití (*Curculionidae*) (Vega *et al.*, 2008). Houba *Beauveria bassiana*, jež byla nalezena i v klíčících rostlinách rajčete a bavlníku, chrání

tyto rostliny před patogenními druhy hub jako je *Rhizoctonia solani* a *Pythium myriotylum* (Ownley *et al.*, 2008).

Některé bioaktivní sloučeniny mohou být využity i pro medicínské účely. Řada látek má totiž kromě ochranného účinku u rostlin i široké využití v medicíně. Jedná se především o antibiotika a látky s potencionálně protirakovinnými účinky. Příkladem může být látka taxol (paclitaxel), ta je považována za jednu z nejslibnějších látek v léčbě rakoviny izolovaných z endofytických hub (Jalgaonwala *et al.*, 2011; Visalakchi *et Muthumary*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Taxol je po chemické stránce alkaloid produkovaný endofytem *Metarhizium anisopliae*, jež kolonizuje kůru stromu tis (Jalgaonwala *et al.*, 2011; Visalakchi *et Muthumary*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Dalšími izolovanými bioaktivními látkami jsou sordaricin (izolovaný z *Fusarium sp.*) či javanicin (z *Chloridium sp.*), které mají antimikrobiální a antifungální účinky proti patogenům způsobující kažení potravin (Jalgaonwala *et al.*, 2011).

### 3.2.5 Endofyty a indukovaná rezistence rostlin

Indukovaná rezistence je fyziologický stav zvýšené obranyschopnosti rostliny, který se vytváří vlivem působení specifických vnějších stimulů (Choudhary *et al.*, 2007). Jedná se vlastně o odolnost, kterou daná rostlina získává po kontaktu s patogenem (nebo jiným typem organismu či danou chemickou látkou) a tento stav rezistence je zpravidla účinný vůči širokému spektru škodlivých organismů (van Loon *et al.*, 2000). Jedná se především o viry, bakterie, houby, hlísty a dále je tento stav účinný vůči abiotickým stresovým faktorům (Fontana *et al.*, 2021). Prostřednictvím indukované rezistence je rostlina schopna oddálit nebo předejít rozšíření daného patogenu a následně jeho kolonizaci rostlinného těla. Je žádoucí, aby rostlina v důsledku indukovaných obranných mechanismů dosáhla unikátního fyziologického stavu zvaného 'priming' (Conrath *et al.*, 2006), který vzniká v důsledku působení daného elicitoru. Takto je rostlina v pozoru a připravena se bránit před potenciálními patogeny, a to prostřednictvím obranných mechanismů, jež mají mnohem větší intenzitu (Mauch-Mani *et al.*, 2017; Conrath *et al.*, 2006). Díky tomu, že endofyty obývají stejnou ekologickou niku jako řada fytopatogenů, jsou schopny dané prostředí ochránit a potlačit škodlivý vliv patogenů prostřednictvím kompetice, produkce specifických látek proti patogenům, parazitismu nebo spuštěním právě indukované rezistence (Fontana *et al.*, 2021; Araújo *et al.*, 2010).

Existují dvě formy indukované rezistence, první tzv. systémově získaná rezistence (SAR) a dále indukovaná systémová rezistence (ISR) (Choudhary *et al.*, 2007). Indukovaná rezistence může být rozlišena na základě původu elicitoru a typu regulační látky (kyselina jasmonová, ethylen), jež je pro zprostředkování tohoto procesu nezbytná (Choudhary *et al.*, 2007). Systémově získaná rezistence je většinou závislá na přítomnosti kyseliny salicylové stimulující expresi PR-proteinů a je obecně účinná vůči biotrofním patogenům (Fontana *et al.*, 2021), zatímco obranné mechanismy závislé na přítomnosti kyseliny jasmonové a ethylenu chrání rostlinu před nekrotrofními organismy (např. houbami) (Kamle *et al.*, 2020; Pieterse *et al.*, 2014; Choudhary *et al.*, 2007; Vallad *et al.*, 2004). Předpokládá se, že pokud endofyty zvyšují rezistenci rostlin vůči nekrotrofním houbám, tak na druhou stranu tím mohou způsobit jejich zvýšenou náchylnost k biotrofním organismům (Jung *et al.*, 2012). K potlačení rozvoje daného

onemocnění dochází ve většině případů prostřednictvím kyseliny jasmonové a ethylenu, což vede k indukované systémové rezistenci (Pascholati *et al.*, 2012). Na základě toho lze odlišit, zda daný obranný mechanismus byl spuštěn v důsledku napadení rostliny patogenní houbou nebo vlivem abiotického stresu (Fontana *et al.*, 2021).

Endofyty se mohou podílet na spuštění indukované rezistence stimulací rostliny k produkci látek, které působí na fytopatogeny a pozměňují morfologii rostlin takovým způsobem, aby se byly schopny ubránit patogenům i za nepříznivých podmínek (Fontana *et al.*, 2021). Mechanismy indukované rezistence spuštěné vlivem působení endofytů zahrnují syntézu fytoalexinů a PR-proteinů, zesílení buněčné stěny ukládáním ligninu a glukanu či tvorbu silnější kutikuly (Fontana *et al.*, 2021; Neto *et al.*, 2002). Endofytické houby produkují také řadu sekundárních metabolitů, jež produkují i samotné rostliny, jako jsou např. komponenty buněčné stěny a také enzymy xylanasy, celulasy a chitinasy (Fontana *et al.*, 2021). Některé studie přišly s teorií, že endofyty se během koevoluce s hostitelskou rostlinou přizpůsobily na její vnitřní prostředí a získaly část hostitelské DNA, která se začlenila do genomu endofytů, čímž získaly schopnost syntetizovat bioaktivní látky (Kour *et al.*, 2008). Podle některých teorií došlo i k opačnému procesu, kdy hostitelská rostlina získala část DNA endofytu (Pileggi *et al.*, 2009). Tudíž endofytické houby mohou uvnitř hostitele regulovat biochemické procesy vedoucí k produkci látek, jež jsou následně využívány jak samotným endofytem, tak hostitelskou rostlinou (Strobel *et al.*, 2004). Příkladem může být houba *Gilmaniella* sp. izolovaná z rostliny *Atractylodes lancea*, která údajně produkuje metabolity s elicitorovou aktivitou, jež působí na daného hostitele, čímž se může podstatně zlepšit celkový obsah těkavých olejnatých látek (Wang *et al.*, 2011). Dalším příkladem může být endofytická houba *Piriformospora indica*, která se vyznačuje zajímavými vlastnostmi jako je zlepšení růstu, schopnost navození rezistence vůči fytopatogenům jako je *Fusarium*, a to u ječmene (*Hordeum vulgare*) (Deshmukh *et al.*, 2006), pšenice (*T. aestivum*) (Serfling *et al.*, 2007), kukuřice (*Z. mays*) (Kumar *et al.*, 2009). Díky tomu by tato houba mohla najít uplatnění zejména v zemědělství (Fontana *et al.*, 2021). Podle Liljeroth *et al.*, 2002, se *Microdochium bolleyi* podílí na spuštění indukované systémové rezistence u ječmene (*Hordeum*), protože bylo zjištěno, že potlačuje příznaky onemocnění způsobené patogenem *Bipolaris sorokiniana* v listech, přestože zde nebyla fyzicky přítomna (Shadmani *et al.*, 2018).

Jak již bylo zmíněno endofyty se také podílí na navození tolerance rostlin k abiotickému stresu, což má velký význam v zemědělství. V poslední době je úroda zemědělských plodin významně ovlivněna klimatickými změnami, a proto je čím dál větší poptávka po nových praktikách, které by mohly zlepšit výnosy plodin i v případě růstu při teplotním stresu (především při vysokých teplotách) (Ali *et al.*, 2018). Při nadměrně vysokých teplotách se zvyšuje rychlost transpirace, snižuje se účinnost fotosyntézy a zhoršuje se hospodaření s vodou. Bylo prokázáno, že ošetření rostlin endofytickou houbou *Thermomyces* sp. snižuje rychlost transpirace a rostliny si udržují vyšší obsah vody v listech (Ali *et al.*, 2018). Tato houba také zvyšuje celkový obsah cukrů, flavonoidů, saponinů, rozpustných proteinů a antioxidantů, což bylo pozorováno například u okurky (*Cucumis*). U okurky navíc došlo



i k prodloužení kořenů, což je významná adaptace na růst v pouštních ekosystémech a umožňuje rostlině lépe získat vlhkost a živiny z půdy v podmínkách s nedostatkem vody (Ali *et al.*, 2018). Dále se endofyty mohou podílet i na zvýšení tolerance vůči vodnímu stresu. Jedna z hypotéz je využití oxidu uhličitého vyprodukovaného endofyty samotnými rostlinami (Bloemen *et al.*, 2013). Fotosyntéza by pak mohla nadále probíhat, čímž by se vyrovnala ztráta oxidu uhličitého v důsledku uzavření průduchů u rostlin ve stresových podmínkách (Bloemen *et al.*, 2013). V neposlední řadě endofyty umožňují rostlinám tolerovat vysoké koncentrace těžkých kovů v půdě, a to kupříkladu u pšenice (Malik *et al.*, 2020). Příkladem může být endofytická houba *Penicillium roqueforti*, jež omezuje příjem těžkých kovů rostlinou, která roste v kontaminované půdě (Ikram *et al.*, 2018).

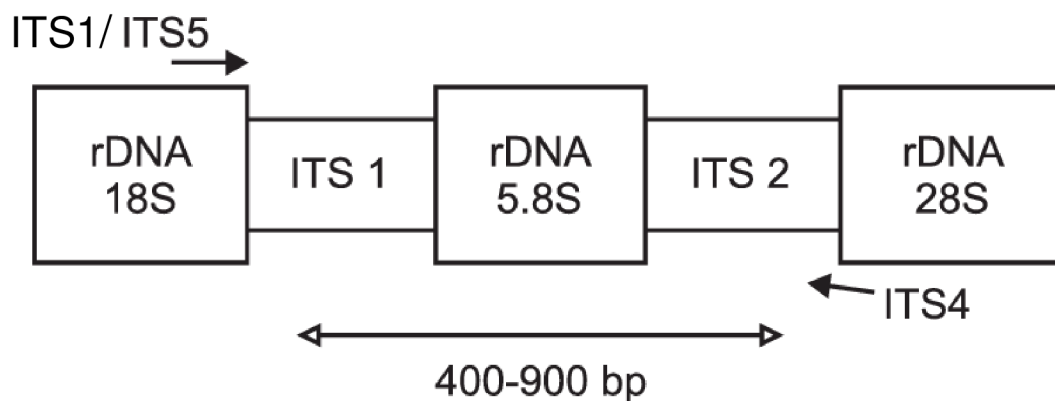
### 3.3 Molekulární metody detekce a identifikace endofytů

Mezi často využívané metody k detekci různých houbových organismů se řadí tzv. kultivační metody. Použití těchto metod bylo popsáno zejména pro diagnostiku fytopatogenních hub, nicméně jsou aplikovatelné i na endofytické houby, jejichž diagnostika je čím dál více předmětem zájmu. Detekce by měla být především efektivní a v případě fytopatogenních hub by také měla zajistit jejich identifikaci v raných stádiích infekce, čímž se následně může předejít rozvoji závažných onemocnění rostlin (Sankaran *et al.*, 2010). Konvenční metody detekce jsou založené na identifikaci viditelných příznaků (tvorba konidií, mycelií, morfologické změny rostliny) (Tör *et Woods-Tör*, 2017; Nezhad, 2014) a zpravidla zahrnují několik kroků. V případě endofytů se jedná o očištění rostlinného pletiva pod tekoucí vodou, povrchová sterilizace zajišťující usmrcení veškerých mikroorganismů (epifytů) na povrchu hostitele, izolace endofytických hub po přenesení rostlinného pletiva na agarové médium a odlišení jednotlivých endofytů na základě morfologických charakteristik (Sun *et Guo*, 2012). Dále zahrnují použití mikroskopických technik a biochemických testů, které jsou však v mnohých případech velmi pracné a vyžadují značnou znalost o houbových organismech a jejich taxonomii (McCartney *et al.*, 2003; Pryce *et al.*, 2003). Tyto metody jsou tedy především využívány zkušenými mykology. Růst mycelia na agarovém médiu umožňuje zhodnocení fyziologických charakteristik jako je barva kolonie a intenzita růstu či mikroskopickou vizualizaci pohlavně nebo nepohlavně vzniklých spor (Hyde *et Soyong*, 2008). Světelná mikroskopie umožňuje posouzení barvy, tvaru a povrchové struktury spor. Nicméně identifikace jednotlivých hub pouze na základě morfologických vlastností není vždy dostačující (Geiser, 2004), obzvláště když je cílem identifikovat konkrétní druh (Hughes *et al.*, 2013; Lutzoni *et al.*, 2004). Navíc pouze některé druhy endofytů mohou být kultivovány *in vitro* (Azevedo *et Araújo*, 2007). Stejně tak i imunochemické metody, jež se využívají k diagnostice endofytů či fytopatogenních hub často vykazují nedostatečnou afinitu a při jejich použití může dojít k interferenci vlivem kontaminantů (Meng *et Doyle*, 2002). Proto je tedy v dnešní době snaha nahradit tyto metody metodami molekulárními, díky kterým je možné se těmto nedostatkům vyhnout (Hariharan *et Prasannath*, 2021). Molekulární metody jsou sice více nákladné, za to jsou však rychlé, citlivé, přesné a mohou být využity na analýzu velkého množství vzorků (Ahmad *et al.*, 2019). Díky tomu je možné

detekovat různé organismy i v případě, že jsou v rostlině přítomny pouze v malém množství (Rollins *et al.*, 2016; Luchi *et al.*, 2013). Detekce endofytů pomocí molekulárních metod zahrnuje obecně několik kroků jako je izolace genomové DNA, purifikace a kvantifikace získané DNA (Hariharan *et al.*, 2021). Pro izolaci DNA jsou v současnosti často využívány komerční kity pro extrakci nukleových kyselin (Martinelli *et al.*, 2014).

Mezi hojně využívané molekulární metody endofytů se řadí různá provedení polymerázové řetězové reakce, a to především standardní PCR (Martin *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2012; Doss *et al.*, 1998 a další) a Real-time PCR (qPCR) (Chow *et al.*, 2018; Landa *et al.*, 2013; Cook *et al.*, 2009). Dále se také využívají techniky založené na DNA microarrays, hybridizace *in situ* a sekvenování (Hariharan *et al.*, 2021). DNA microarrays nazývané také jako DNA čipy představují pevné nosiče (nylonové membrány, silikonové nebo skleněné destičky) s navázanými hybridizačními sondami (Snustad *et al.*, 2017). Tyto sondy pak hybridizují s danou DNA.

Ke studiu diverzity a k odlišení jednotlivých houbových organismů, a tedy i endofytických hub pomocí molekulárních metod se často využívá ITS oblasti houbové rDNA nebo gen kódující 18S rRNA (Monard *et al.*, 2013). ITS oblast (z angl. internal transcribed spacer, vnitřní transkribovaný mezerník) je složena z dalších dvou oblastí označovaných jako ITS1 a ITS2, které oddělují geny kódující ribozomální rRNA tvořící jednotlivé podjednotky ribozomu. Oblasti ITS1 a ITS2 jsou po transkripci vyštěpeny (Brasileiro *et al.*, 2004). Nejčastěji se amplifikuje sekvence zahrnující ITS1 a ITS2, mezi nimiž leží gen kódující 5.8S rRNA (Korabecna, 2007), a to například pomocí tzv. univerzálního páru primerů ITS1 a ITS4, které poprvé navrhli v roce 1990 White *et al.* (obrázek 2). Tyto primery amplifikují ITS oblasti řady houbových organismů a dobře fungují zejména při analýze DNA izolované z jednoho daného organismu, avšak v případě vzorku DNA izolované z hostitelské rostliny mohou amplifikovat i sekvence rostlinné DNA (Martin *et al.*, 2005). Proto se také využívají primery ITS1-F a ITS4-B (Gardes *et al.*, 1993), jež jsou specifické pro houby a rostlinnou DNA neamplifikují (Martin *et al.*, 2005). Výhodou ITS oblasti oproti genu kódující 18S rRNA je jejich vysoká variabilita u blízkce příbuzných druhů hub (Monard *et al.*, 2013), zároveň jsou však tyto oblasti vysoce konzervativní v rámci druhu. Stejně tak je výhodné i to, že geny kódující rRNA jsou v genomu přítomny v mnoha kopiích (Glynn *et al.*, 2007; Vilgalys *et al.*, 1990), tudíž je možno amplifikovat danou DNA sekvenci, a to i přesto, že se ve vzorku nachází v nízké koncentraci.



**Obrázek 2:** Schématické znázornění houbové rDNA s ITS1 a ITS2 oblastmi oddělující geny kódující 18S, 5.8S, 28S rRNA, upraveno dle Brasileiro *et al.*, 2004.

Legenda: ITS5/ITS4 a ITS1/ITS4 – pár univerzálních primerů (White *et al.*, 1990) pro amplifikaci ITS1–5.8S–ITS2 sekvence.

### 3.3.1 Příklady molekulární detekce endofytických hub

Příkladem využití molekulárních metod pro diagnostiku endofytů je detekce endofytických hub *Microdochium bolleyi* a *Microdochium phragmitis* v rákosu obecném (*Phragmites australis*), kterou provedli Ernst *et al.*, 2011. V tomto experimentu byla konkrétně využita nested-PCR (také nazývána jako odstupňovaná PCR (Šmarda *et al.*, 2005)), a to s cílem identifikovat tyto endofyty a zjistit, zda jsou schopny společné existence v jednom hostiteli/rostlinném orgánu zároveň, v tomto případě v kořenech rákosu. Nested-PCR využívá dvě sady párů primerů a probíhá ve dvou fázích, čímž je zajištěna vyšší specifita a senzitivita (Hariharan *et Prasannath*, 2021). Varianta této PCR umožňuje v první fázi amplifikace využít nespecifické primery pro detekci několika organismů a v druhé fázi pak primery specifické pro konkrétní druh (Bhat *et Browne*, 2010). Na základě provedení nested-PCR bylo zjištěno, že jak *M. bolleyi*, tak *M. phragmitis* kolonizují preferenčně kořeny rákosu obecného (Ernst *et al.*, 2011). Nicméně *M. bolleyi* se vyskytuje spíše v kořenech na sušších místech, zatímco *M. phragmitis* kolonizuje kořeny v zaplavených oblastech (Ernst *et al.*, 2011).

Dalším příkladem může být molekulární detekce a kvantifikace endofytu *Epichloë* a jeho blízké příbuzných druhů *Acremonium* spp. (*Clavicipitaceae*, *Ascomycotina*) v travině sveřep vzpřímený (*Bromus erectus*) (Groppe *et Boller*, 1997). Pro detekci těchto endofytů byly použity specifické primery amplifikující oblast mikrosatelitového lokusu (Groppe *et al.*, 1995). Mikrosatelitové lokusy jsou vysoce polymorfni, tudíž jejich analýzou lze získat informace o genetické diverzitě daných kmenů hub (Groppe *et al.*, 1995). Jednotlivé alely mikrosatelitových lokusů mohou být detekovány rozdělením vzniklých PCR produktů pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (Groppe *et al.*, 1995).

Metoda PCR byla využita i pro detekci endofytu *Acremonium* (*Epichloë*) *coenophialum* v listových pochvách a semenech kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea*) (Doss *et Welty*, 1995) a pro detekci endofytů z rodu *Neotyphodium* vyskytujících se také v kostřavě rákosovité (Doss *et al.*,

1998). V experimentu (Doss *et al.*, 1998) byly použity primery pro amplifikaci sekvence intronů genu kódující tubulin 2 a bylo zjištěno, že jsou specifické právě pro endofyty z rodu *Neotyphodium*. Nicméně v některých případech byly získány falešně negativní výsledky, jelikož tyto endofytické houby se nevyskytují rovnoměrně ve všech pletivech. Některé endofyty z rodu *Neotyphodium*, jako je například *Neotyphodium lolii* se také nachází v jilku vytrvalém (*Lolium perenne*) (Zhou *et al.*, 2014). Tento endofyt podporuje růst jilku, a to zejména v nepříznivých podmínkách a při napadení hmyzím škůdcem (Thom *et al.*, 2012). Nicméně některé kmeny se podílí na produkci alkaloidů způsobující otravy dobytka (Thom *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2009). Detekce a kvantifikace tří vybraných kmenů endofytu *Neotyphodium lolii* byla provedena pomocí kvantitativní Real-time PCR na základě navržených primerů pro detekci genů zodpovědných za produkci sekundárních metabolitů (Zhou *et al.*, 2014). Jelikož odlišné kmeny *Neotyphodium lolii* produkují různé alkaloidy, bylo možné je s pomocí těchto primerů odlišit (Zhou *et al.*, 2014).

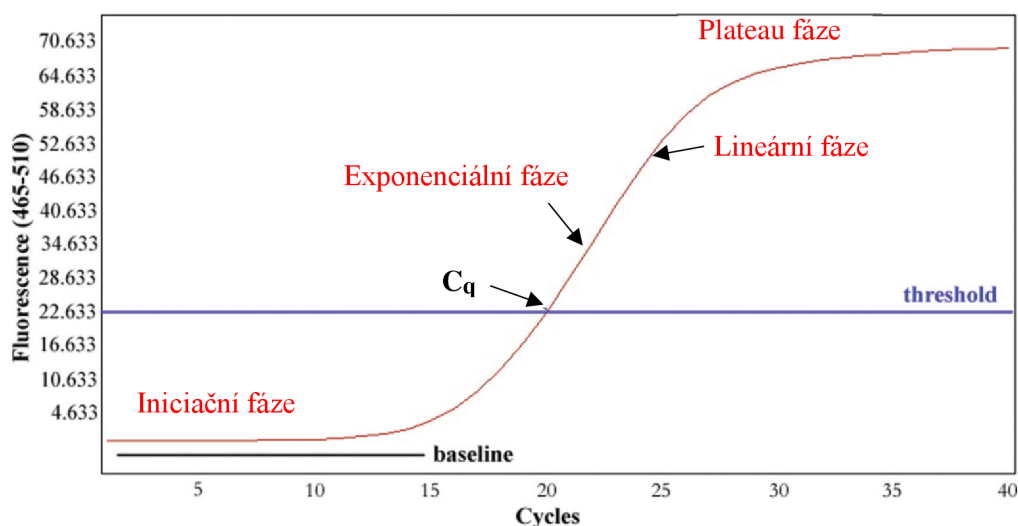
Pro vytvoření PCR primerů specifických pro detekci endofytu *Acremonium implicatum* v trávě z rodu *Brachiaria* byla použita metoda RAPD (z angl. Random amplified polymorphic DNA technique) (Kelemu *et al.*, 2003). Jedná se o metodu založenou na PCR, která využívá jeden primer s arbitrární sekvencí pro náhodnou amplifikaci nespecifikovaných genomových sekvencí s cílem získat sadu amplifikovaných DNA fragmentů představující genetický profil daného organismu (Mbwana *et al.*, 2006). DNA polymorfismus je pomocí této metody detekován jako přítomnost nebo absence určitých amplikonů mezi různými jedinci (Williams *et al.*, 1990). Na základě amplifikovaných úseků DNA získaných pomocí metody RAPD a jejich osekvenováním se Kelemu *et al.*, 2003 podařilo vytvořit vysoce specifické primery pro rychlou a přesnou detekci *Acremonium implicatum*.

### 3.3.2 Kvantifikace endofytů pomocí kvantitativní Real-time PCR

Detekce a zároveň kvantifikace endofytických hub může být provedena pomocí tzv. kvantitativní Real-time PCR (qPCR), jež byla využita i v rámci tohoto experimentu. Tudiž prostřednictvím qPCR lze získat výsledky jak kvalitativní, tak kvantitativní. Při tomto typu PCR je množství syntetizovaných produktů zaznamenáno průběžně v reálném čase, automaticky po každém cyklu (McCartney *et al.*, 2003). Ke kvantifikaci se nejčastěji využívají buď fluorescenční barviva, například SYBR green I, která se nespecificky interkalují do nově vznikající dvouvláknové DNA nebo fluorescenčně značené sondy TaqMan<sup>TM</sup> (Šmarda *et al.*, 2005). Po ozáření barviva SYBR green I modrým světlem o vlnové délce 480 nm dojde k emisi zeleného světla o vlnové délce 520 nm (Rodríguez-Lazáro *et al.*, 2013). Barvivo SYBR Green I se konkrétně váže na menší žlábek dsDNA, nenavázané barvivo vykazuje pouze nízkou fluorescenci, avšak navázáním na dsDNA se intenzita fluorescence výrazně zvyšuje (Rodríguez-Lazáro *et al.*, 2013). Signál se dále zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktu (Šmarda *et al.*, 2005). V důsledku nespecifity fluorescenčních barviv však může dojít k jejich vazbě i na artefakty (primer dimery), proto je nutné mít navržené vysoce specifické primery (McCartney *et al.*, 2003). SONDY jsou na rozdíl od fluorescenčních barviv specifické pro konkrétní sekvenci cílové DNA, na kterou se během reakce následně naváží (Hariharan

et Prasannath, 2021). Fluorescenčně značené sondy se vyznačují přítomností reportérového fluoroforu na 5' konci a molekulou zhášeče (angl. quencher) na 3' konci (Narayanasamy, 2011). Molekula zhášeče blokuje fluorescenci reportérové molekuly, avšak během elongace amplikonu dochází k odstěpení reportérového fluoroforu v důsledku 5'–3' exonukleázové aktivity *Taq* DNA polymerázy (Narayanasamy, 2011). Výsledkem oddálení fluoroforu od molekuly zhášeče je nárůst fluorescence (Narayanasamy, 2011).

V závislosti na fluorescenční aktivitě může být celý průběh reakce znázorněn pomocí amplifikační křivky (obrázek 3), která vyjadřuje závislost naměřené fluorescence na daném cyklu. Amplifikační křivka znázorňuje čtyři různé fáze, tzv. iniciační, exponenciální, lineární a plateau fázi (Rodríguez-Lázaro et Hernández, 2013). Iniciační fáze zahrnuje počáteční cykly reakce (Rodríguez-Lázaro et Hernández, 2013), ve kterých je fluorescenční signál příliš nízký, odpovídá hodnotě pozadí čili negativní kontrole označované jako NTC (z angl. no template control), a tudíž jej nelze ještě změřit (Kralík et Ricchi, 2017). Během exponenciální fáze dochází k exponenciálnímu nárůstu fluorescence, a to do doby, než je dosažena plateau fáze (Rodríguez-Lázaro et Hernández, 2013). V plateau fázi se již intenzita fluorescence nemění. Intenzita naměřené fluorescence je tedy úměrná množství amplifikovaných produktů (amplikonů). Cyklus, ve kterém je nárůst fluorescence takový, že jej lze již detekovat (překročení fluorescence nad úroveň pozadí (angl. threshold)), je na amplifikační křivce označen jako  $C_q$  (z angl. quantification cycle) (Kralík et Ricchi, 2017). Hodnota  $C_q$ , nazývaná také jako  $C_t$  (z angl. cycle threshold) pak slouží k výpočtu počátečního množství cílové molekuly DNA ve vzorku (Narayanasamy, 2011), jednotlivé hodnoty  $C_q$  se odečítají v exponenciální fázi. Čím větší je počáteční koncentrace cílové molekuly DNA ve vzorku, tím bude počet cyklů k dosažení prahové hodnoty menší (a tedy i hodnota  $C_q$  bude nižší).



**Obrázek 3:** Fáze amplifikační křivky, upraveno dle Rodríguez-Lázaro et Hernández, 2013.

Nicméně nárůst fluorescence může být také způsoben i artefakty (např. již zmíněné primer dimery), a to především v případě nespecifického značení DNA. To znamená, že hodnota  $C_q$  může být dosažena i v případě, že došlo k amplifikaci artefaktu a tím pádem bude získán falešně pozitivní výsledek. Kromě toho bude hodnota  $C_q$  nižší, než by byla v případě přítomnosti pouze specifických produktů (Ruiz-Villalba *et al.*, 2021). Přítomnost nespecifických produktů lze zjistit pomocí analýzy křivek tání (angl. Melting curve analysis) (Ririe *et al.*, 1997), jelikož rozdílné produkty mají odlišné teploty tání. To znamená, že pokud se vytvoří více než jeden vrchol (peak) může to značit přítomnost nespecifických produktů (Ruiz-Villalba *et al.*, 2021).

Kvantifikace pomocí kvantitativní Real-time PCR může být absolutní nebo relativní (Kralik *et Ricci*, 2017). Absolutní kvantifikaci lze přímo determinovat absolutní množství cílové DNA ve vzorku, a to na základě sestrojení kalibrační přímky série standardů (ředící řada připravena např. desítkovým ředěním) o známé koncentraci (známém počtu kopií DNA) (Kralik *et Ricci*, 2017; Bustin *et al.*, 2009; Kubista *et al.*, 2006; Yang *et Rothman*, 2004). Z této křivky se pak odečítá koncentrace neznámého vzorku. Relativní kvantifikace využívá vnitřní kontrolu (referenční vzorek) a často se provádí při studiu exprese určitého genu (Bustin *et al.*, 2009). Jako vnitřní kontrola se využívá tzv. 'house-keeping' gen (referenční gen) mající odlišnou sekvenci od cílové sekvence DNA (Kozera *et Rapacz*, 2013). Referenční gen musí splňovat určitá kritéria (Chervoneva *et al.*, 2010). Velmi důležité je, aby exprese referenčního genu nebyla ovlivněna experimentálními podmínkami (Kozera *et Rapacz*, 2013). Intenzita exprese referenčního genu by také neměla vykazovat variabilitu mezi jednotlivými tkáněmi/pletivy a vývojovými stádii daného organismu (Kozera *et Rapacz*, 2013). Naopak musí demonstrovat rozdíly v expresi způsobené nedokonalostí použité technologie či přípravných postupů a je vhodné, aby hodnota  $C_q$  referenčního genu byla podobná jako  $C_q$  hodnota genu zájmu (Kozera *et Rapacz*, 2013). Referenční gen by měl být také specifický pro konkrétní druh a je vhodné, aby byl v genomu přítomný v malém počtu kopií (Zhu *et al.*, 2014). Relativní kvantifikace se velmi často využívá pro stanovení míry exprese daného genu, přičemž se zjišťuje míra exprese (koncentrace mRNA) cílového genu ve srovnání s referenčním genem (Bustin *et al.*, 2009). K tomu se využívá například tzv. výpočet delta-delta ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Bustin *et al.*, 2009). V případě relativní kvantifikace daného organismu umožňuje vnitřní kontrola (referenční gen) určit do jaké míry obsahovaly testované vzorky srovnatelné množství DNA (Matusínský, 2021, užitý vzor).

Výhodou kvantitativní Real-time PCR je, že vzniklé produkty není nutno separovat pomocí elektroforézy, jelikož amplifikace a kvantifikace probíhají zároveň v průběhu reakce. Stejně tak je výhodné i to, že qPCR umožňuje již zmíněnou analýzu křivek tání, díky níž je možné odlišit nespecifické produkty nebo primer dimery (Sibley *et al.*, 2012). Na rozdíl od konvenční PCR, která umožňuje tzv. end-point analýzu je Real-time PCR mnohem přesnější, jelikož informace o množství DNA ve vzorku jsou získávány na základě již zmíněných  $C_q$  hodnot, které se odečítají v exponenciální fázi v průběhu každého cyklu (Manter *et Vivanco*, 2007). Pomocí kvantitativní Real-time PCR lze tedy detekovat například nárůst či pokles množství daného endofytu v rostlinném hostiteli v průběhu času.

### 3.4 Mikroskopické metody používané ke kvantifikaci endofytů

Mezi tradiční metody, jež umožňují určitým způsobem kvantifikovat (a vizualizovat) endofyty v rostlinných pletivech, patří metody mikroskopické (Ahmad *et al.*, 2019), kterým předchází zpravidla barvení. Hyfy většiny endofytických hub jsou bezbarvé, zatímco kořeny rostlin jsou obvykle tvořeny několika vrstvami buněk a mohou být na svém povrchu pigmentované, to znamená, že detekce kořenových endofytů může být obtížná (Kaminskyj, 2008). Pro detekci přítomnosti endofytu uvnitř hostitele je tedy nutné jej zviditelnit pomocí specifických barviv. Výjimku tvoří pouze zástupci endofytů s tmavě pigmentovanými hyfami (již zmíněné ‘dark septate endofytes’), které lze v kořenech pozorovat bez barvení (Jumpponen *et Trappe*, 1998). Mezi typická barviva využívaná pro barvení endofytických hub patří methylenová modř, anilinová modř či bavlíková modř a laktofenolová modř (Ahmad *et al.*, 2019). Methylenová modř je vhodná pro pozorování morfologických charakteristik (Moemen *et al.*, 2015), bavlíková modř barví protoplazmu buněk, avšak nikoli buněčné stěny (Ahmad *et al.*, 2019) a anilinová modř je vhodná pro barvení mycelií (Porter *et al.*, 1977).

Jednou z tradičních metod kvantifikace endofytu v kořenech, jež lze provést s použitím mikroskopu je tzv. průsečiková metoda (Giovannetti *et Mosse*, 1980). Tato metoda byla původně zavedena pro kvantifikaci endomykorhizních hub, které v kortikálních buňkách kořenu vytváří tzv. arbuskuly či vezikuly. Její princip spočívá v použití Petriho misek, které mají na spodní straně nakreslenou mřížku (Giovannetti *et Mosse*, 1980) nebo se pod spodní část Petriho misky vloží průhledná fólie s vyznačenou čtvercovou mřížkou (Metody stanovení kolonizace kořenů, 2001). Pomocí této metody se sledují průsečíky kořenových segmentů s mřížkou a zaznamenává se přítomnost či absence struktur vytvořených danou houbou (Giovannetti *et Mosse*, 1980). Při kvantifikaci průsečikovou metodou je vhodné, aby jednotlivé kořeny byly uspořádány rovnoběžně s delší stranou mikroskopického sklíčka (Kaminskyj, 2008). Začíná se v jednom rohu zorného pole, a to tak, aby průsečíky mřížky byly umístěny kolmo na osu daného kořene (Kaminskyj, 2008). Je nutné prozkoumat kořen v celé své hloubce, a to pomocí jemného zaostřování. Poté by se sklíčko mělo posunout laterálně o jedno zorné pole a celý proces zopakovat (Kaminskyj, 2008).

Další možnou metodou kvantifikace je tzv. preparátová metoda ± (Giovannetti *et Mosse*, 1980). Jedná se o nesystematickou metodu, která se provádí při vysokém zvětšení. Provedení této metody je jednodušší než u průsečikové metody. Obarvené kořenové segmenty o délce přibližně 1 cm se umístí na podložní sklíčko do příslušného média (nejčastěji glycerolu) a pozorují se pod mikroskopem při zvětšení 100×–400× (Metody stanovení kolonizace kořenů, 2001). U každého segmentu je zaznamenán výskyt (+) nebo absence (–) kolonizace endofytem. Tato metoda však může poskytovat i tzv. nadhodnocené výsledky (závisí na délce použitých segmentů), jelikož segment, který byl označen (+) nemusí být kolonizován po celé své délce, ovšem segment (–) je bez přítomnosti endofytu (Metody stanovení kolonizace kořenů, 2001). Následně je proveden výpočet procentuálního zastoupení kořenových segmentů kolonizovaných daným endofytem. V praxi může být tedy míra kolonizace vypočítána jako

počet kořenových segmentů (vždy dlouhých 1 cm), jež jsou v jakékoliv míře kolonizovány daným endofytem děleno celkovým počtem zkoumaných segmentů (Sun *et* Tang, 2012).

Preparátová metoda je však příliš pracná a má mnoho úskalí, které v konečném důsledku vedou k nepřesným výsledkům. Nicméně některým z nich lze předejít. Týká se to především výběru kořenových segmentů, kdy je důležité, aby segmenty pro kvantifikaci byly odebrány těsně pod kořenovým krčkem. V těchto místech je totiž zastoupení klastrů chlamydospor největší. Nicméně, jak už bylo naznačeno, mikroskopické zhodnocení kolonizace endofyty je velmi subjektivní, protože výsledky zjištěné různými osobami se mohou lišit.

### **3.5 Charakterizace organismu *Brachypodium distachyon* a popis současných znalostí o využití *B. distachyon* ve výzkumu obecně**

#### **3.5.1 Základní charakteristika**

*Brachypodium distachyon* je první druh trávy z podčeledi Pooideae čeledi Poaceae, jehož genom byl kompletně osekvenován (The International *Brachypodium* Initiative, Nature 463, 2010). Rod *Brachypodium* je v rámci fylogenetického stromu sesterská skupina Triticeae a Poeae, to znamená, že je příbuzný s řadou obilovin (pšenice (*Triticum*), žito (*Secale*), ječmen (*Hordeum*)), a tudíž slouží jako vhodný jednoděložný modelový systém ve výzkumu zemědělsky významných rostlin (Li *et al.*, 2012). *B. distachyon* patří mezi planě rostoucí trávy především v oblastech mírného a subtropického pásma (Hasterok *et al.*, 2006) (oblasti Středomoří a Středního východu) na převážně chladnějších a vlhkých místech (Li *et al.*, 2012). Jedná se o C<sub>3</sub> rostlinu, která vytváří klásky s 10 až 12 semeny (S-Y Hong *et al.*, 2011). *B. distachyon* se obecně vyznačuje vlastnostmi, které jsou typické pro modelové rostliny, patří mezi ně především relativně malý vzrůst (15–30 cm), krátký životní cyklus (8–12 týdnů), snadná kultivace v laboratoři a jeho genom patří mezi nejmenší v porovnání s ostatními diploidními travami (asi 300 Mbp) (Li *et al.*, 2012; The International *Brachypodium* Initiative, Nature 463, 2010). V neposlední řadě může být také transformován bakterií *Agrobacterium* (Vogel *et* Hill, 2008).

#### **3.5.2 Využití a význam**

*Brachypodium distachyon* se využívá v základním výzkumu vývoje rostlin, ve výzkumu interakce rostlin s mikroorganismy, ve výzkumu vlivu abiotického stresu, evoluční a systémové biologie (Scholthof *et al.*, 2018). *B. distachyon* dále nachází uplatnění ve vývoji nových prostředků namířených ke zlepšení vlastností ostatních C<sub>3</sub> rostlin z mírného podnebného pásu, jako je pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmen (*Hordeum vulgare*), jež se řadí mezi celosvětově významné plodiny (Scholthof *et al.*, 2018). Jelikož se buněčná stěna *B. distachyon* na buněčné úrovni podobá buněčné stěně ostatních trav, slouží *B. distachyon* také jako ideální modelový organismus při studiu biosyntézy buněčné stěny (Bouvier *et al.*, 2012). Mimoto má *B. distachyon* podobnou anatomickou stavbu cévních svazků jako C<sub>3</sub> trávy, tudíž je vhodným modelem ke studiu složení cévních svazků a jejich vývoje v souvislosti s narůstající produkcí biomasy a biopaliva z trav využívaných pro krmné účely (Matos *et al.*, 2013).



Význam *B. distachyon* se také uplatňuje při studiu mechanismů tolerance rostlin k abiotickému stresu, což má velký význam především pro zemědělství, jelikož to umožňuje vyvinout plodiny se schopností odolávat změně klimatu a extrémním podmínkám životního prostředí (Scholthof *et al.*, 2018). *B. distachyon* totiž reaguje na abiotický stres podobným způsobem jako pšenice, žito a ječmen v důsledku podobné adaptace na podnebí mírného pásu a C<sub>3</sub> fotosyntéze (Des Marais *et Juenger*, 2016). Rostlina *B. distachyon* byla také použita při studiu vlivu velmi nízkých teplot na obiloviny, které rostou v mírném podnebném pásu (Colton-Gagnon *et al.*, 2014). Colton-Gagnon *et al.*, 2014 prokázali, že *B. distachyon* se na chladné až mrazivé podnebí aklimatizuje podobným způsobem jako ozimé obiloviny a že tzv. „zimní“ genotypy *B. distachyon* (Bd1-1, Bd18-1, and Bd29-1) jsou schopné tolerovat mráz prostřednictvím akumulace osmoticky aktivních látek jako je prolin a sacharidy a dále pomocí aktivace tzv. ‘cold-responsive’ genů kódujících ‘cold-regulated proteins’ (COR).

V neposlední řadě se *Brachypodium distachyon* využívá jako modelový organismus ve výzkumu interakce hostitel-patogen, jelikož u obilovin (pšenice, ječmen) je v důsledku jejich velkého genomu a neúčinné transformace výzkum obtížný (Zhong *et al.*, 2015). *B. distachyon* může být hostitelem řady houbových patogenů (Garvin *et al.*, 2008) jako je např. *Magnaporthe grisea*, jež napadá rýži (Draper *et al.*, 2001), dále *Fusarium graminearum* a *Fusarium culmorum*, které způsobují závažná onemocnění pšenice (Zhong *et al.*, 2015). Dále je také hostitelem hub způsobující rzivost obilovin jako je *Puccinia brachypodii* (Fitzgerald *et al.*, 2015), v případě rzi (*Uredinales*) však *B. distachyon* vykazuje tzv. nehostitelskou rezistenci, jež je založena na nesespecifické obranné reakci (Ayliffe *et al.*, 2013). Infikováním *B. distachyon* daným houbovým patogenem lze zkoumat podstatu interakce s hostitelskou rostlinou, v tomto případě, jak daný houbový patogen reaguje se zemědělsky významnými obilovinami (Zhong *et al.*, 2015). Příkladem využití *B. distachyon* jako modelový systém může být jeho interakce s *Cochliobolus sativus*, který napadá velké množství hostitelů včetně pšenice, ječmene a jiných trav (Zhong *et al.*, 2015). Ukazuje se, že rostlina *Brachypodium distachyon* by také mohla být vhodným genetickým modelem pro zkoumání interakce a vlivu patogenních hub právě z rodu *Fusarium* způsobující fuzariózy obilovin (Peraldi *et al.*, 2011). Doposud používaná modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* není totiž pro výzkum obilovin vhodná (Peraldi *et al.*, 2011). Navíc příznaky vyvolané patogeny z rodu *Fusarium* u *Brachypodium distachyon* mají velmi podobný projev jako u pšenice (Peraldi *et al.*, 2011).

### 3.6 Charakterizace pšenice z hlediska interakcí s endofytickými houbami

Na utváření rostlinného mikrobiomu (tedy i zastoupení endofytů) se z velké části podílí interakce mezi genotypem hostitele a lokalitou růstu (environmentální faktory) (Azarbad *et al.*, 2020; Rojas *et al.*, 2020b; Fitzpatrick *et al.*, 2018). Nicméně vliv lokality růstu na zastoupení endofytických hub u pšenice se může měnit v závislosti na odlišných abiotických a biotických faktorech, které na rostliny na jednotlivých místech působí (Schlatter *et al.*, 2020; Sapkota *et al.*, 2015). Hlavním zdrojem mikrobiálního inokula u pšenice je půda, vzduch (spory přenášené vzduchem, tj. horizontální přenos) a semena (Zarraonaindia *et al.*, 2015; Hodgson *et al.*, 2014; Maignien *et al.*, 2014). Nicméně zdroj

inokula se liší pro jednotlivá rostlinná pletiva a orgány. Na molekulární úrovni se na vytváření a regulaci symbiotického vztahu mezi endofytem a pšenicí mohou podílet epigenetické mechanismy (DNA metylace, posttranslační modifikace histonů, aktivita malých RNA molekul (snRNA) a long noncoding RNA (lncRNA)), které pozměňují strukturu chromatinu (Martienssen *et Colot*, 2001). Tyto epigenetické regulace mohou být indukovány vlivem působení řady faktorů v daném prostředí a mohou se podílet na řízení exprese tzv. ‘stress-response’ genů u rostlin, jež jsou vystaveny určité formě stresu (Varga *et Soulsbury*, 2019; Ichida *et al.*, 2007; Martienssen *et Colot*, 2001). Samotná přítomnost endofytů může dokonce ovlivňovat DNA metylaci probíhající v rostlinném hostiteli (Varga *et Soulsbury*, 2019). Navzdory důležitému významu epigenetické regulace v interakci mezi endofyty a pšenicí je však stále málo dostupných informací o této problematice (Błaszczuk *et al.*, 2021).

Latz *et al.*, 2020 zjišťovali, jak moc je mikrobiom pšenice utvářen životním prostředím, jež se liší na jednotlivých místech a do jaké míry rostlinný genotyp (kultivar) přispívá k variabilitě houbového společenstva. K tomu, aby se zjistilo, zda typ rostlinného pletiva, lokalita růstu a genotyp hostitelské rostliny má vliv na společenstva endofytických hub u pšenice, byly použity blízké příbuzné ozimé kultivary pšenice. Tyto rostliny byly pěstovány na dvou různých lokalitách. Obě lokality se vyznačovaly stejným složením mikrobiomu v půdě, ve vzduchu a v semenech, avšak působily zde odlišné abiotické faktory. Co se týče typu rostlinného pletiva/orgánu, největší diverzitu houbových organismů vykazovaly kořeny, méně pak semena a nejméně diverzifikované bylo zastoupení organismů v listech. Vysoká diverzita hub v kořenech odráží vysokou rozmanitost půdních organismů. Z toho vyplývá, že typ rostlinného pletiva má největší vliv na společenstva endofytických hub u pšenice. Rozdíly v lokalitě růstu měly vliv především na mikrobiom listů a v menší míře na mikrobiom kořenů. Navíc byly pozorovány rozdíly v zastoupení některých druhů organismů v nadzemních částech rostlin. To se týkalo především rostlin, které byly pěstovány venku na rozdíl od rostlin pěstovaných ve vnitřních prostorech (ve skleníku), u kterých se zastoupení druhů nezměnilo. U organismů, které se nacházely v kořenech, tento vliv nebyl pozorován. Tudiž odlišné klimatické podmínky venku a ve vnitřních prostorech se více odrazily na zastoupení endofytických organismů v nadzemních částech rostlin. Nejméně významný byl vliv kultivaru. V neposlední řadě bylo zjištěno, že i množství patogenních organismů se liší v závislosti na odlišném prostředí. Zastoupení jednotlivých druhů endofytů pšenice je tedy ovlivněno mnoha faktory (Latz *et al.*, 2020).

### **3.6.1 Endofyty v semenech pšenice**

Jedním z pozorovaných vlivů endofytů u pšenice je jejich schopnost zlepšit klíčení semen při teplotním stresu a suchu. Semena mají funkci generativních orgánů a hrají významnou roli v rozšíření rostlin na nová stanoviště (Baskin *et Baskin*, 2004), zatímco endofytické houby mohou potenciálně ovlivnit, které semeno vyklíčí jak v přírodních, tak určitým způsobem narušených nebo znečištěných habitatech (Hubbard *et al.*, 2012). Proto je velmi důležité, aby byla semena endofyty kolonizována. Klíčení semen je nezbytný proces pro přežití rostlin a jejich rozmnožování jak v optimálních, tak ve stresových podmínkách (Hubbard *et al.*, 2012). Tudiž vyvinutí určité metody, která by mohla zlepšit

a předpovědět úspěšnost vyklíčení v případě nedostatku vody a při nadměrně vysokých teplotách má velký význam (Hubbard *et al.*, 2012). Endofyty přebývající v semenech a jež se přenáší osivem (angl. seed-borne and seed-transmitted endophytes), mohou prodloužit dormanci semen, a tudíž zajistit, aby semeno vyklíčilo až v příznivých podmínkách (Kuźniar *et al.*, 2020). Mikrobiom semen dále představuje výchozí bod pro utváření mikrobiomu nových semenáčů (Shahzad *et al.*, 2018; Shade *et al.*, 2017).

### 3.6.2 Význam endofytů pro udržitelnější produkci pšenice

Schopnost endofytických hub navodit zvýšenou toleranci pšenice především k abiotickému stresu (zvýšená koncentrace solí a těžkých kovů v půdě, vysoká teplota) a biotickému stresu (Ahlawat *et al.*, 2021) a porozumění komplexnímu vztahu endofyt-hostitel (pšenice), by mohlo přispět k rozvoji udržitelnějšího zemědělství (Błaszczyk *et al.*, 2021). Doposud již byly identifikovány endofytické houby, které by mohly být využity kupříkladu v biologické ochraně pšenice proti patogenu *Fusarium graminearum* (Comby *et al.*, 2007). Příkladem takových endofytů je právě *M. bolleyi*, ale také *Clonostachys rosea* či *Penicillium olsonii* (Rojas *et al.*, 2020a). Princip biologické ochrany pšenice proti *F. graminearum* spočívá v potlačení populace patogenu prostřednictvím kolonizace pšenice těmito endofytickými houbami (Gdanetz *et al.*, 2017). Błaszczyk *et al.*, 2021 popsali, že závažnost onemocnění způsobené *F. graminearum* byla mnohem menší a množství patogenu uvnitř pšeničných klasů bylo sníženo v případě, že byla pšenice inokulována endofytickými houbami alespoň dva dny předtím, než byla pšenice vystavena kontaktu s patogenem.

Je nutné však podotknout, že endofytické houby mohou být využity v biologické ochraně pšenice pouze tehdy, pokud splňují určité požadavky. Nesmí být škodlivé pro ostatní rostliny a živočichy, musí být efektivní v odstraňování či potlačování růstu daného patogenu a stejně tak musí být schopny přežít v různých podmínkách prostředí a být kompatibilní s dalšími bioaktivními látkami, které se využívají při pěstování pšenice (Błaszczyk *et al.*, 2021). Navíc celý proces zahrnující izolaci endofytických hub, posouzení jejich efektivnosti v biologické ochraně *in vitro*, ve skleníku a na polích, dále pak zajištění masové produkce daného biologického agens je velmi komplikovaný (Błaszczyk *et al.*, 2021). Tudíž využití biologické ochrany u pšenice je značně náročné na provedení (Błaszczyk *et al.*, 2021).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Biologický materiál

- Osivo ozimé pšenice (*Triticum aestivum*, odrůda Bohemia)
- Osivo *Brachypodium distachyon* – semena linie Bd21 z Joint Genome Institute (<https://jgi.doe.gov/>)
- 6 izolátů *Microdochium bolleyi* původem z kořenů pšenice (UPOC-FUN-253–258) ze sbírky fytopatogenních mikroorganismů UPOC (Collection of Phytopathogenic Microorganisms UPOC Czech Republic)
- Vzorky DNA patogenních hub (*Microdochium nivale*, *Microdochium majus*, *Rhizoctonia cerealis*, *Cochliobolus sativus*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Oculimacula yallundae*, *Blumeria graminis*, *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora graminea*); houbové kultury získány terénním sběrem a kultivací na Petriho miskách, dále z českých sbírek mikroorganismů CPPF (Sbírka fytopatogenních hub, VÚRV Praha Ruzyně, CZ) a CCM (Česká sbírka mikroorganismů Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, CZ) (Matušinsky, 2021, uživatelský vzor CZ 34829 U1)
- Profi výsevní substrát FLORCOM SV (BB Com, 885)

### 4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

#### Použité chemikálie

- qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, kat. č. P551)
- Primery MbRT\_ITS (Eastport)
- Primery MbqPCR (Eastport)
- Nukleáz-prostá voda pro PCR (Quiagen, kat. č. 129114)
- Deionizovaná voda
- 70% ethanol

#### Použité roztoky

- 2,5% KOH
- 1% HCl
- 0,05% anilinová modř v laktoglycerolu: smíchat stejný objem vody, glycerolu a kyseliny mléčné
- 1% NaOCl (SAVO)

#### Použité soupravy

- DNeasy mericon Food Kit (50) (Quiagen, kat. č. 69514)

### 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Cycler Real-Time PCR CFX Connect (BIO-RAD)
- Spektrofotometr Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Mikrocentrifuga MiniStar Silverline (VWR)

- Vortex 1 Shaker (IKA™)
- Stolní chlazená centrifuga 5415D (Eppendorf)
- ThermoCell heating block 202 (BIOER)
- Homogenizátor MM301 (Retsch)
- Mikroskop CX31 (Olympus)
- Mikroskop BX60 (Olympus) s CDD kamerou DP73-1-51 WD
- Laboratorní autokláv VX-55 (Systec)
- Analytické váhy AE 24 Q (Mettler)

#### **4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy**

##### **4.4.1 Založení experimentu ve skleníku**

###### **4.4.1.1 Příprava inokula**

Jako inokulum bylo použito 6 izolátů *Microdochium bolleyi* kultivovaných na semenech prosa (*Panicum*) ve tmě po dobu 3 týdnů při 20 °C. Před kultivací bylo 200 g semen prosa vložených do plastové sáčku s 50 ml destilované vody dvakrát sterilizováno tlakovou parou (v autoklávu) při 120 °C po dobu 20 min. Každý z 6 izolátů *M. bolleyi* (UPOC-FUN-253–258) byl kultivován zvlášť a následně před samotnou aplikací inokula byla ve stejném poměru smíchána všechna inokula (inokulovaná semena prosa) dohromady.

###### **4.4.1.2 Setí a odběr vzorků**

V červnu 2021 byl založen pokus ve skleníku. V první řadě byl proveden výsev pšenice a *Brachypodium distachyon*, v obou případech do dvaceti květináčů. Při výsevu byla provedena inokulace endofytem *M. bolleyi* aplikací inokula (2,5 g na květináč) přímo na vysévané obilky v deseti květináčích s pšenicí a v deseti květináčích s *Brachypodium distachyon* (květináče byly označeny jako Whe Mb1 a Bd Mb1). Do zbylých dvaceti květináčů bylo přidáno pouze autoklávované (neinokulované) proso, tyto květináče sloužily jako negativní kontrola (označeny jako Whe Mb0 a Bd Mb0). Následně se nechaly rostliny narůst a každý měsíc byl odebírán vzorek pšenice a *B. distachyon*.

Každý odběr byl prováděn tak, že se odebralo vždy šest rostlin z každé varianty (varianty Whe Mb0, Whe Mb1, Bd Mb0 a Bd Mb1). Kořeny rostlin byly umyty pod tekoucí vodou a následně se zaznamenalo, v jaké fázi růstu byly rostliny odebrány a byla změřena délka kořenů a nadzemní části. Třem rostlinám z každé varianty se ustříhly kořeny a vložily se do falkony se 70% ethanolem. Takto připravené kořeny byly následně použity pro mikroskopování. Zbylé tři rostliny byly povrchově dezinfikovány 3 min v 1% NaOCl (SAVO) a důkladně promyty ve sterilní destilované vodě, poté se nechaly usušit a následně se z usušených kořenů izolovala DNA. Takto se získaly vzorky ve třech biologických opakováních. V rámci čtvrtého odběru byly rostlinám kromě kořenů odebrány také listy, báze stébla a klasy pro následnou analýzu distribuce endofytu *M. bolleyi* v rostlinném hostiteli.

#### 4.4.2 Mikroskopování kořenů

Část odebraných kořenů pšenice a *Brachypodium distachyon* byla mikroskopována s cílem stanovit úspěšnost kolonizace kořenů endofytem *M. bolleyi*. Pomocí světelného mikroskopu byla vizuálně zhodnocena přítomnost endofytu v jednotlivých kořenech na základě tzv. preparátové metody (Giovannetti *et* Mosse, 1980) modifikované dle Masarykovy univerzity (Metody stanovení kolonizace kořenů, 2001). Celý proces byl založen na zaznamenávání přítomnosti klastrů chlamydospor vytvořených endofytickou houbou *M. bolleyi* v kortikálních buňkách kořenů pšenice a *B. distachyon*. Před mikroskopováním byly kořeny nejprve obarveny barvivem anilínová modř. Samotnému barvení předcházelo zesvětlení a zprůhlednění kořenů za pomoci 2,5% hydroxidu draselného po dobu 3 dnů, poté byla do roztoku s kořeny přidána 1% kyselina chlorovodíková, čímž se zajistilo okyselení, jež bylo důležité pro následné barvení. Po okyselení byly rostliny umístěny do laktoglycerolu. Těsně před mikroskopováním byly kořeny obarveny již zmíněnou anilínovou modří (0,05% roztok anilínové modří v laktoglycerolu) přidáním několika kapek do roztoku s kořeny. Nicméně ne všechny mikroskopované kořenové segmenty byly obarveny, jelikož *M. bolleyi* patří mezi 'dark septate endofytes' vytvářející chlamydospory tmavě hnědé barvy, které šlo pozorovat i bez obarvení houbových hyf. Následovalo nastříhání kořenů na malé segmenty o délce přibližně 1 cm. Z kořene rostlin každého odběru bylo mikroskopováno alespoň patnáct segmentů, které byly uspořádány paralelně za sebou na podložním sklíčku (byly použity převážně segmenty ustříhnuté v blízkosti kořenového krčku). Na takto připravený preparát bylo přidáno několik kapek vody a poté přiloženo krycí sklíčko. Jednotlivé segmenty byly postupně mikroskopovány při zvětšení 200× a 400×. V průběhu mikroskopování se zaznamenávala přítomnost (1) či nepřítomnost (0) klastrů chlamydospor v pozorovaných kořenových segmentech. Zjištěný výsledek byl následně srovnán se zjištěnou přítomností endofytů pomocí kvantitativní Real-time PCR.

#### 4.4.3 Izolace DNA

DNA byla izolována z usušených kořenů pšenice a *Brachypodium distachyon*. Před každou izolací byly kořeny zváženy. Izolace DNA byla provedena za použití DNeasy mericon Food Kit (50) podle modifikovaných pokynů protokolu: Standard Protocol (200 mg), jež je určen pro izolaci celkové DNA z malého množství vzorku (200 mg).

Vzorek (50–100 mg) byl umístěn do vychlazené a vysterilizované třecí misky a následně po přidání tekutého dusíku byl homogenizován pomocí tloučku na jemný prášek. Homogenát, ulpěný na stěně misky, byl za pomoci špachtle setřen a následně přenesen za přídavku menšího množství tekutého dusíku do 1,5ml mikrozkušavky. Některé vzorky byly homogenizovány jiným způsobem, a to v homogenizátoru MM301 (Retsch). K homogenátu bylo přidáno 1000 µl lyzačního pufru (Food lysis buffer) a 2,5 µl roztoku proteinázy K, po přidání byl vzorek vortexován. Vzorek byl inkubován minimálně po dobu 30 min na ThermoCell heating bloku při 60 °C, přičemž byl pravidelně vortexován. Po inkubaci byl vzorek chlazen na ledu, tak aby dosáhl pokojové teploty (cca 5 min). Lyzát byl centrifugován po dobu 5 min při 2500 g. Do prázdné 1,5ml mikrozkušavky bylo napipetováno 500 µl

chloroformu. Ze získaného supernatantu po centrifugaci bylo přepipetováno 700  $\mu\text{l}$  do mikrozkušavky s chloroformem, tak aby nedošlo k porušení peletu. Vzniklý roztok byl důkladně vortexován (15 s) a poté centrifugován při maximálních otáčkách (13 200 rpm/16 110 g) po dobu 15 min. Do další 1,5ml mikrozkušavky bylo napipetováno 350  $\mu\text{l}$  pufru PB. Z předchozího kroku po centrifugaci bylo přepipetováno 350  $\mu\text{l}$  horní vodné vrstvy do mikrozkušavky s pufrem PB. Takto vzniklý roztok byl důkladně promíchán opětovným nasátím a vypuštěním pomocí pipety a následně byl celý objem přepipetován do 50 QIAquick Spin kolony umístěné do 2ml sběrné zkumavky. Roztok v koloně byl centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 3 min. Do kolony bylo napipetováno 500  $\mu\text{l}$  pufru AW2 a roztok v koloně byl následně centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 3 min. Kolona byla centrifugována při maximálních otáčkách 3 min, aby se membrána v koloně vysušila. Kolona byla přenesena do nové 1,5ml mikrozkušavky. Na prostředek membrány v koloně bylo poté přidáno 150  $\mu\text{l}$  pufru EB (Elution buffer) a následně proběhla inkubace při pokojové teplotě 3 min. Poté byla provedena centrifugace 3 min při 10 000 g, při které došlo k uvolnění DNA. Koncentrace DNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop. Izolovaná DNA byla následně uchovávána při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro zjištění distribuce endofytu v rostlině se stejným způsobem izolovala DNA i z báze stébla, listů a klasu.

#### 4.4.4 Kvantitativní Real-time PCR (qPCR)

V rámci optimalizace diagnostiky endofytické houby *Microdochium bolleyi* pomocí kvantitativní Real-time PCR byly nejdříve otestovány dva typy párů primerů a následně byla určena efektivita reakce. Poté byla provedena kvantifikace a zjištěna distribuce endofytu v rostlinném hostiteli. Při přípravě reakční směsi pro provedení veškerých qPCR se postupovalo stejným způsobem. V první řadě byly smíchány jednotlivé reagenty dle tabulky 1 (kromě templátové DNA, která byla přidána až po rozpipetování reakční směsi). V tabulce 1 jsou uvedeny objemy jednotlivých chemikálií na jednu reakci a použité páry primerů se nachází v tabulce 3, 4, 6. Koncentrace vzorků DNA pro danou reakci byla vždy změřena na spektrofotometru Nanodrop a následně byl vzorek DNA naředěn na výslednou koncentraci  $2,5\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Připravená qPCR reakční směs byla vortexována a centrifugována a následně rozpipetována po 13  $\mu\text{l}$  do 0,2ml PCR mikrozkušavek ve stripu po 8 kusech, umístěných do vychlazeného stojánku. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 2  $\mu\text{l}$  naředěného vzorku DNA. Mikrozkušavky byly stočeny na mikrocentrifuze a vloženy do cykléru, kde proběhla reakce s teplotním profilem následovaná analýzou křivek tání dle tabulky 2. Součástí každé qPCR reakce byla i negativní kontrola (NTC), která obsahovala místo DNA vodu. Tím se následně potvrdilo, že dané reagenty nebyly kontaminovány templátovou DNA. Každý vzorek byl do reakce pipetován v triplicátech a reakce byla vždy provedena ve dvou opakováních.

**Tabulka 1:** Složení reakční směsi pro qPCR

Chemikálie	Konečná koncentrace	Objem pro 1 test [μl]
Nukleáz-prostá voda pro PCR	–	5,1
SYBR Green Master Mix (2x)	1x	7,5
Primer F	0,2 μmol·l <sup>-1</sup>	0,2
Primer R	0,2 μmol·l <sup>-1</sup>	0,2
Templátová DNA	2,5 ng·μl <sup>-1</sup>	2
<b>Celkem</b>		<b>15</b>

**Tabulka 2:** Teplotní program qPCR reakce a analýzy křivek tání

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

\*v tomto kroku snímání fluorescence

#### 4.4.4.1 Testování specifity primerů (MbRT\_ITS a MbqPCR)

Pro kvantitativní Real-time PCR byly k dispozici dva typy párů primerů (MbRT\_ITS a MbqPCR) (tabulka 3) pro detekci ITS oblasti *Microdochium bolleyi*, jejichž specifita byla testována na 11 houbových patogenech (*Microdochium nivale*, *Microdochium majus*, *Rhizoctonia cerealis*, *Cochliobolus sativus*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Oculimacula yallundae*, *Blumeria graminis*, *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora graminea*), které se běžně vyskytují v pšenici. Primery MbqPCR a MbRT\_ITS byly navrženy v programu primer3plus (<https://www.primer3plus.com/>). Pro vytvoření primerů MbqPCR byl nejprve proveden alignment sekvence ITS oblasti rDNA (ITS1–5.8S–ITS2–28S) *Microdochium bolleyi* (GenBank accession no. MW301449.1) a příbuzného druhu *Microdochium nivale* (GenBank accession no. MG891798.1) v programu T-Coffee multiple sequence alignment (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>). Na základě provedeného alignmentu bylo možné zjistit jednonukleotidové záměny a následně navrhnout pár primerů specifický pro detekci ITS oblasti *M. bolleyi*. Primery MbRT\_ITS (navržené vedoucím práce; Matušinsky 2021, užitný vzor) jsou určeny pro amplifikaci ITS1 oblasti genu pro rRNA (*ribosomal RNA gene internal transcribed spacer 1*). Celkem bylo použito 12 vzorků DNA včetně vzorku DNA *Microdochium bolleyi*. Následovalo vlastní



provedení kvantitativní Real-time PCR. Pro testování primerů byly připraveny dvě reakční směsi, kdy jedna z nich obsahovala pár primerů MbqPCR a druhá pár primerů MbRT\_ITS.

**Tabulka 3:** Testované primery pro detekci ITS oblasti rDNA *M. bolleyi*

Primer	Sekvence (5'– 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Literatura
MbqPCR (F)	ATCGAATCTTTGAACGCACA	184	Primery navržené autorkou této práce
MbqPCR (R)	GGCTTGCAGAAGCGAGATAA		
MbRT_ITS (F)	CGGTGCTGGAAACAGTGCTGCCA	114	Matušinsky, 2021 (užitný vzor)
MbRT_ITS (R)	CGATGCCAGAACCAAGAGATCC		

#### 4.4.4.2 Efektivita reakce

Pro zjištění efektivity reakce byla připravena ředící řada templatové DNA (vzorky DNA izolátu *M. bolleyi* UPOC-FUN-253). Ředící řada spočívala v přípravě pěti roztoků (desítkovým ředěním) o koncentracích 1 ng·μl<sup>-1</sup>, 0,1 ng·μl<sup>-1</sup>, 0,01 ng·μl<sup>-1</sup>, 0,001 ng·μl<sup>-1</sup> a 0,0001 ng·μl<sup>-1</sup>. Koncentrace vzorku DNA každého izolátu byla změřena na spektrofotometru Nanodrop a následně naředěna na koncentraci 1 ng·μl<sup>-1</sup>. Poté se do čtyř 1,5ml mikrozkušavek pro každý izolát napipetovalo 18 μl vody. Do první mikrozkušavky s vodou byly přidány 2 μl z roztoku DNA daného izolátu o koncentraci 1 ng·μl<sup>-1</sup>, takto byl získán roztok DNA o koncentraci 0,1 ng·μl<sup>-1</sup>. Z takto připraveného roztoku byly následně přepipetovány 2 μl do druhé mikrozkušavky a stejným způsobem se pokračovalo, dokud nebyly připraveny všechny roztoky ředící řady. Vzniklé roztoky DNA byly následně krátce zvortexovány a zcentrifugovány. Následovala příprava qPCR reakční směsi. V rámci testování efektivity reakce byly použity již pouze primery MbRT\_ITS.

#### 4.4.4.3 Kvantifikace v hostiteli

##### Kvantifikace *Microdochium bolleyi* v rostlině *Brachypodium distachyon* (stanovení dynamiky)

Kvantifikace endofytu *Microdochium bolleyi* v rostlině *Brachypodium distachyon* byla provedena s použitím páru primerů MbRT\_ITS pro amplifikaci ITS oblasti rDNA (tabulka 4). Dále byly použity primery BdFIM pro amplifikaci referenčního genu BdFIM (*B. distachyon* *fimbrin-like protein gene*) (tabulka 4), jenž je specifický pro *B. distachyon* a v genomu se nachází v malém počtu kopií (Zhu *et al.*, 2014). V reakci byly použity vzorky DNA izolované z rostlin *B. distachyon* ze všech pěti odběrů s cílem zjistit, jak moc narůstá množství endofytu postupně během pěti měsíců (tabulka 5).

**Tabulka 4:** Primery pro kvantifikaci *M. bolleyi* v rostlině *B. distachyon*

Primer	Sekvence (5'– 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Literatura
MbRT_ITS (F)	CGGTGCTGGAAACAGTGCTGCCA	114	Matušinsky, 2021 (užitný vzor)
MbRT_ITS (R)	CGATGCCAGAACCAAGAGATCC		
BdFIM (F)	CCTCACACGGATTTTCGAGAGA	231	Zhu <i>et al.</i> , 2014
BdFIM (R)	GGACAACCCATTTCTGCGA		

**Tabulka 5:** Použité vzorky DNA izolované z kořenů *B. distachyon* pro kvantifikaci *M. bolleyi*

Vzorek	Odběr	Opakování	Vzorek	Odběr	Opakování
Bd Mb0	1.	1, 2	Bd Mb1	1.	1, 2
Bd Mb0	2.	1, 2	Bd Mb1	2.	1, 2
Bd Mb0	3.	1, 2	Bd Mb1	3.	1, 2
Bd Mb0	4.	1, 2	Bd Mb1	4.	1, 2
Bd Mb0	5.	1, 2	Bd Mb1	5.	1, 2

**Kvantifikace *Microdochium bolleyi* v pšenici (stanovení dynamiky)**

Kvantifikace *Microdochium bolleyi* v pšenici byla provedena s pomocí párů primerů MbRT\_ITS pro amplifikaci ITS oblasti rDNA a primery WPAL pro amplifikaci referenčního genu *PAL* (gen kódující fenylalanin-amoniaklyázu) (tabulka 6). V reakci byly použity vzorky DNA izolované z rostlin pšenice opět ze všech pěti odběrů (tabulka 7). Postup pro přípravu reakce byl dále stejný jako při kvantifikaci *M. bolleyi* v rostlině *B. distachyon*.

**Tabulka 6:** Primery pro kvantifikaci *M. bolleyi* v pšenici

Primer	Sekvence (5'– 3')	Velikost PCR produktu [bp]	Literatura
MbRT_ITS (F)	CGGTGCTGGAAACAGTGCTGCCA	114	Matušinsky, 2021 (užitný vzor)
MbRT_ITS (R)	CGATGCCAGAACCAAGAGATCC		
WPAL (F)	CGTTCTTGGTCGCGTTGTG		Walsh <i>et al.</i> , 2005
WPAL (R)	ACTCTTGACAGCATTCTTGACATTCT		

**Tabulka 7:** Použité vzorky DNA izolované z kořenů pšenice pro kvantifikaci *M. bolleyi*

Vzorek	Odběr	Opakování	Vzorek	Odběr	Opakování
<b>Whe Mb0</b>	1.	1, 2	<b>Whe Mb1</b>	1.	1, 2
<b>Whe Mb0</b>	2.	1, 2	<b>Whe Mb1</b>	2.	1, 2
<b>Whe Mb0</b>	3.	1, 2	<b>Whe Mb1</b>	3.	1, 2
<b>Whe Mb0</b>	4.	1, 2	<b>Whe Mb1</b>	4.	1, 2
<b>Whe Mb0</b>	5.	1, 2	<b>Whe Mb1</b>	5.	1, 2

#### 4.4.4.4 Distribuce v rostlině

Distribuce endofytu *M. bolleyi* v rostlinách pšenice a *B. distachyon* byla zjišťována pomocí kvantitativní Real-time PCR. V reakci byly použity vzorky DNA izolované z částí rostlin *B. distachyon* a pšenice (kořeny, báze stébla, listy, klasy) inokulovaných a neinokulovaných rostlin (varianty Whe Mb0, Whe Mb1, Bd Mb0, Bd Mb1), které jsou uvedeny v tabulce 8. V reakci byly použity stejné primery jako v předchozích reakcích (tabulka 4 a 6). Konkrétně byly použity vzorky ze čtvrtého odběru, jelikož v této fázi již měly rostliny vytvořené klasy.

**Tabulka 8:** Použité vzorky DNA izolované z různých částí rostlin pro stanovení distribuce *M. bolleyi*

Vzorek	Odběr	Opakování	Vzorek	Odběr	Opakování
<b>Bd Mb0 (kořen)</b>	4.	1, 2	<b>Bd Mb1 (kořen)</b>	4.	1, 2
<b>Bd Mb0 (báze)</b>	4.	1, 2	<b>Bd Mb1 (báze)</b>	4.	1, 2
<b>Bd Mb0 (list)</b>	4.	1, 2	<b>Bd Mb1 (list)</b>	4.	1, 2
<b>Bd Mb0 (klas)</b>	4.	1, 2	<b>Bd Mb1 (klas)</b>	4.	1, 2
<b>Whe Mb0 (kořen)</b>	4.	1, 2	<b>Whe Mb1 (kořen)</b>	4.	1, 2
<b>Whe Mb0 (báze)</b>	4.	1, 2	<b>Whe Mb1 (báze)</b>	4.	1, 2
<b>Whe Mb0 (list)</b>	4.	1, 2	<b>Whe Mb1 (list)</b>	4.	1, 2
<b>Whe Mb0 (klas)</b>	4.	1, 2	<b>Whe Mb1 (klas)</b>	4.	1, 2

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Odběr vzorků

Každý měsíc (od července do listopadu 2021) byl proveden odběr vzorků. Celkově bylo provedeno pět odběrů, v souhrnné tabulce (tabulka 9) jsou zaznamenané údaje o fázi růstu a naměřené délce kořenů a nadzemní části rostlin každého odběru. Zjištěná délka kořenů je pouze orientační, jelikož v důsledku přetržení při odběru neměly zachovány svoji původní délku.

**Tabulka 9:** Průměrné délky rostlin a převládající fáze růstu jednotlivých odběrů

<b>Rostlina</b> <b>(varianta)</b>	<b>Délka (Ø)/fáze</b>	<b>1. odběr</b>	<b>2. odběr</b>	<b>3. odběr</b>	<b>4. odběr</b>	<b>5. odběr</b>
<b>Whe Mb0</b>	Délka prýtu [cm]	37	39	39	42	45
	Délka kořene [cm]	17	18	19	25	16
	Fáze růstu*	5. list	6. list	10. list	kvetení	zralost
<b>Whe Mb1</b>	Délka prýtu [cm]	37	45	42	47	49
	Délka kořene [cm]	12	22	20	18	15
	Fáze růstu	1. odnož	2. odnož	3. odnož	kvetení	zralost
<b>Bd Mb0</b>	Délka prýtu [cm]	14	26	48	66	71
	Délka kořene [cm]	15	13	11	11	11
	Fáze růstu	5. odnož	6. odnož	6. odnož	začátek kvetení	zralost
<b>Bd Mb1</b>	Délka prýtu [cm]	10	24	49	68	71
	Délka kořene [cm]	13	12	11	13	13
	Fáze růstu	5. odnož	7. odnož	8. odnož	konec kvetení	zralost

\* Fáze růstu byly určeny na základě makrofenologické stupnice pro obilniny (BBCH, Enz *et* Dachler, 1997). V rámci zaznamenaných vývojových fází nejsou uvedeny např. fáze sloupkování a metání, které však uběhly mezi jednotlivými odběry, jelikož veškeré vzorky byly odebírány v intervalu jednoho měsíce.

Na základě zaznamenaných fází růstu rostlin jednotlivých odběrů (tabulka 9) lze usoudit, že přítomnost endofytu *Microdochium bolleyi* urychluje růst a vývoj pšenice, ale i *Brachypodium distachyon*. Rostliny, jejichž semena byla při vysetí inokulována endofytem *Microdochium bolleyi*, se nacházely v pozdější fázi vývoje ve srovnání s rostlinami bez přítomnosti endofytu. Významné rozdíly v jednotlivých vývojových fázích lze v tabulce 9 pozorovat především mezi rostlinami pšenice (Whe Mb0 a WheMb1) prvních tří odběrů, navíc rostliny s endofytem měly větší nadzemní část. Stejně tak lze z tabulky 10, ve které je zaznamenaný průměrný počet zralých klásků na rostlinu, pozorovat, že rostliny *Brachypodium distachyon* s přítomností endofytu vytvořily více klásků než rostliny bez endofytu. U pšenice nebyly klásky počítány, jelikož v rámci experimentu byla použita ozimá pšenice, která na rozdíl od *B. distachyon* vyžaduje jarovizaci. V důsledku toho došlo k vymetání a vykvetení pouze u některých rostlin pšenice.

**Tabulka 10:** Průměrný počet klásků na 1 rostlin u *B. distachyon* varianty Mb0 a Mb1

Rostlina		N (počet rostlin)	Průměrný počet klásků na 1 rostlinu
<i>B. distachyon</i>	Mb0	14	8
	Mb1	12	17

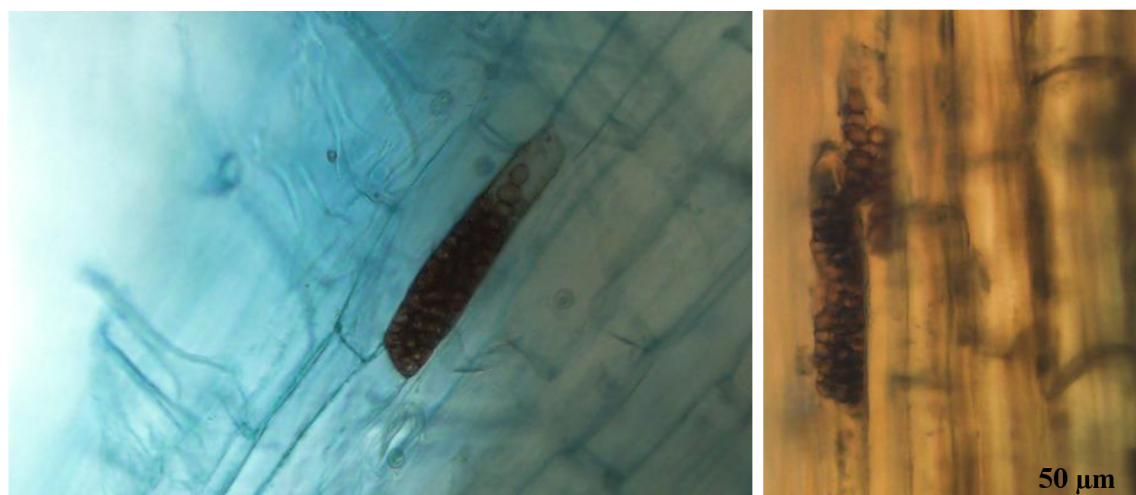
## 5.2 Mikroskopování

Pomocí mikroskopu byla zhodnoceno, zda se v kořenech rostlin jednotlivých odběrů nachází klastry chlamydospor indikující přítomnost endofytu *M. bolleyi*. K mikroskopování byly použity kořenové segmenty odebrané v blízkosti kořenového krčku, jelikož v této oblasti byla kolonizace kořenů endofytem *M. bolleyi* nejintenzivnější. V případě kořenových segmentů odebraných na konci kořene nebylo možno najít téměř žádné klastry chlamydospor. Morfologie pozorovaných chlamydospor lze vidět na obrázcích 4 a 5 (foto provedené pomocí mikroskopu BX60 (Olympus) s CCD kamerou), v případě pátého odběru je vidět masivní kolonizace kortikálních buněk kořenů. Zjištěná přítomnost/nepřítomnost klastrů chlamydospor v kořenech pšenice a *B. distachyon* (varianty WheMb1 a BdMb1) jednotlivých odběrů je zaznamenána v tabulce 11. V kořenech rostlin bez endofytu (varianty Whe Mb0 a BdMb0) nebyla zaznamenána přítomnost endofytu. Výsledky zjištěné pomocí mikroskopu (potvrzení přítomnosti endofytů v rostlinách jednotlivých odběrů, nikoli množství endofytu) byly následně potvrzeny provedením kvantitativní Real-time PCR, pomocí které byly získány podobné výsledky.

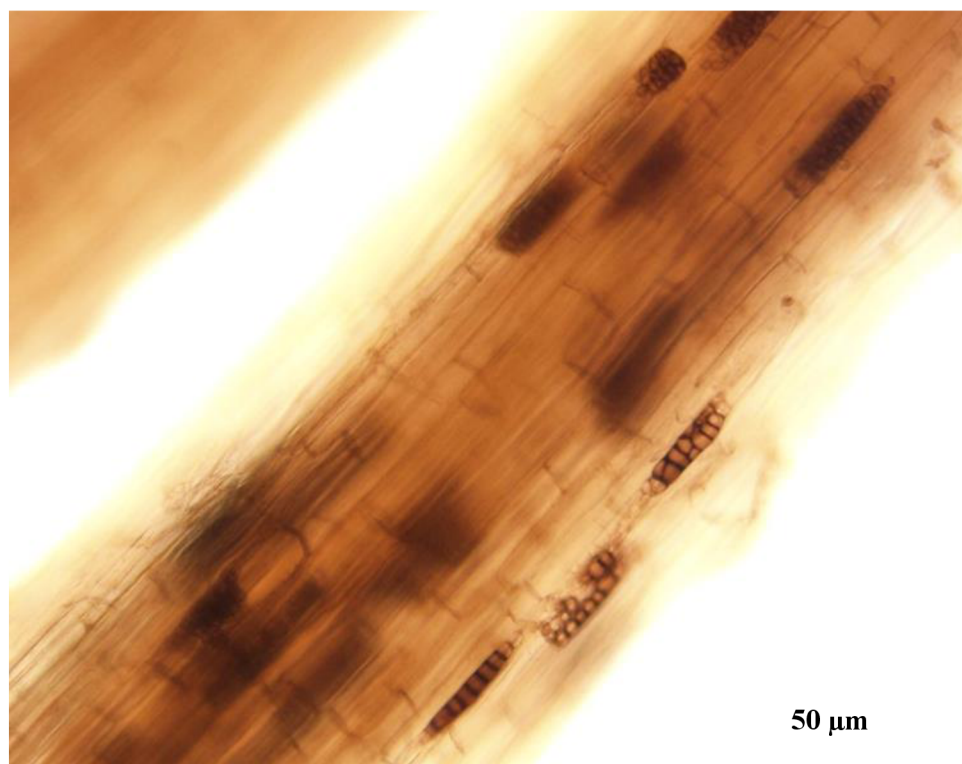
**Tabulka 11:** Mikroskopická detekce *M. bolleyi* v kořenech pšenice a *B. distachyon*

Odběr	1. odběr			2. odběr			3. odběr			4. odběr			5. odběr		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Rostlina</b>															
<b>Bd Mb0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Bd Mb1</b>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Whe Mb0</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Whe Mb1</b>	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1

Legenda: (1) – přítomnost endofytu, (0) – nepřítomnost endofytu



**Obrázek 4:** Klastry chlamydospor *M. bolleyi* v kořenech rostlin *B. distachyon* třetího odběru, Z: 400×



**Obrázek 5:** Klastry chlamydospor *M. bolleyi* v kořenech rostlin *B. distachyon* pátého odběru, Z: 400×

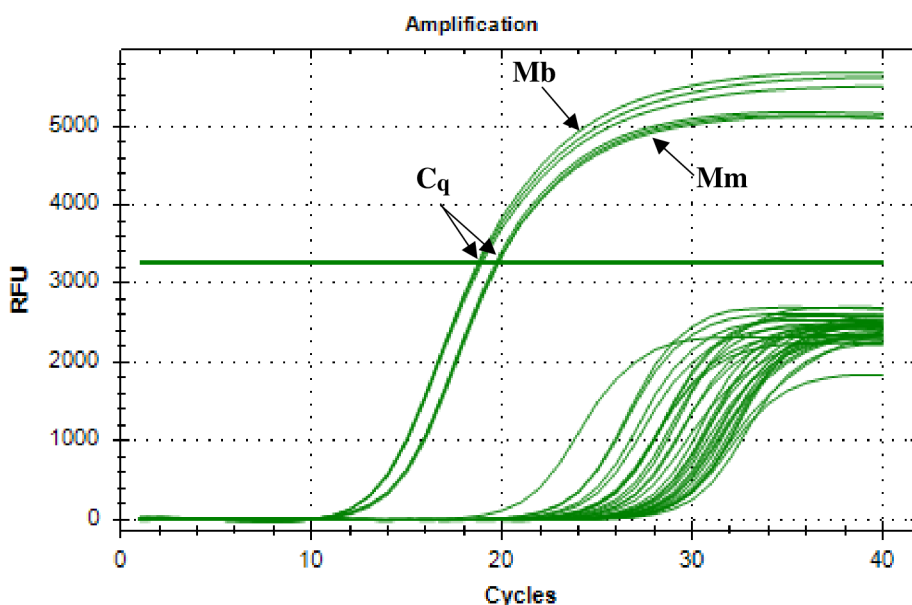
## 5.3 Výsledky qPCR

### 5.3.1 Testování specifity primerů (MbRT\_ITS a MbqPCR)

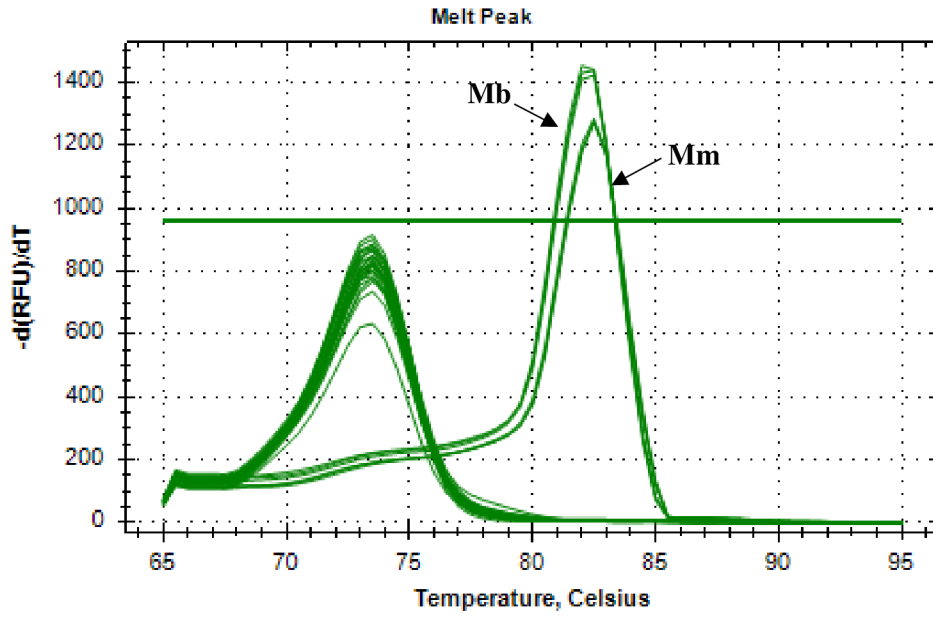
Specifita primerů MbRT\_ITS a MbqPCR pro detekci ITS oblasti *Microdochium bolleyi* byla posouzena na základě získaných amplifikačních křivek (závislost naměřené fluorescence na daném cyklu) a analýzy křivek tání, které demonstrují, zda jsou primery schopny detekovat i některého z dalších 11 houbových patogenů. Amplifikační křivka (graf 1) získaná z reakce s primery MbqPCR a analýza křivek tání (graf 2) dokazuje, že tento pár primerů není specifický, jelikož pozitivní odezvu vykazoval nejen vzorek obsahující DNA *Microdochium bolleyi* (Mb), ale i vzorek DNA příbuzného druhu *Microdochium majus* (Mm). Nespecifita primerů je na grafu 2 potvrzena taktéž křivkami tání jak pro *M. bolleyi*, tak pro *M. majus*. Hodnoty  $C_q$  jsou uvedeny v souhrnné tabulce 12 a jsou vyznačeny v grafu 1 a 3. Nízké  $C_q$  hodnoty (<30) pro *M. bolleyi* a *M. majus* značí pozitivní odezvu a tedy to, že přítomnost těchto organismů byla pomocí primerů MbqPCR detekována a potvrzují tak jejich nespecifitu. Použití těchto primerů pro detekci *M. bolleyi* v neznámém vzorku by vedlo k získání falešně pozitivního výsledku (přítomnost *M. majus* by byla vyhodnocena jako přítomnost *M. bolleyi*). Tudíž primery MbqPCR nemohly být v experimentu dále využity. Důvodem je chybné navržení těchto primerů, přičemž nebyl proveden alignment sekvence ITS rDNA *M. bolleyi* (GenBank accession no. MW301449.1) se sekvencí ITS rDNA *M. majus*. Amplifikační křivka (graf 3), jež byla získána z reakce s primery MbRT\_ITS a analýza křivek tání (graf 4) ukazuje, že tento pár primerů je dostatečně specifický, proto mohl být použit pro další analýzy.

**Tabulka 12:**  $C_q$  hodnoty pro Mb a Mm získané při testování primerů MbqPCR a MbRT\_ITS

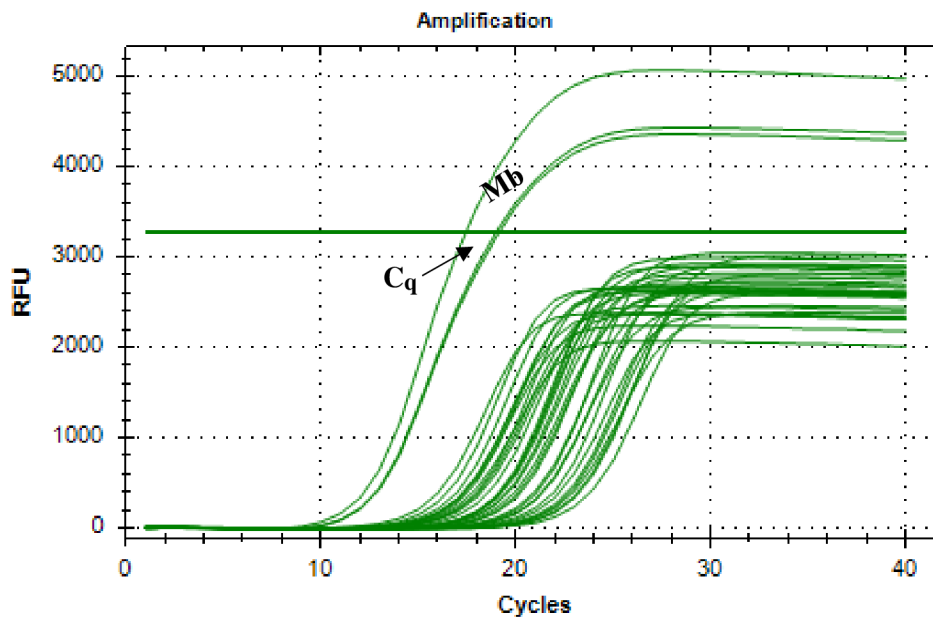
	<i>Microdochium bolleyi</i> (Mb)	<i>Microdochium majus</i> (Mm)
Primery MbqPCR ( $C_q$ )	18,84	19,76
Primery MbRT_ITS ( $C_q$ )	18,5	N/A



**Graf 1:** Amplifikační křivka pro vzorky DNA *M. bolleyi* a *M. majus* získaná při testování specifity primerů MbqPCR

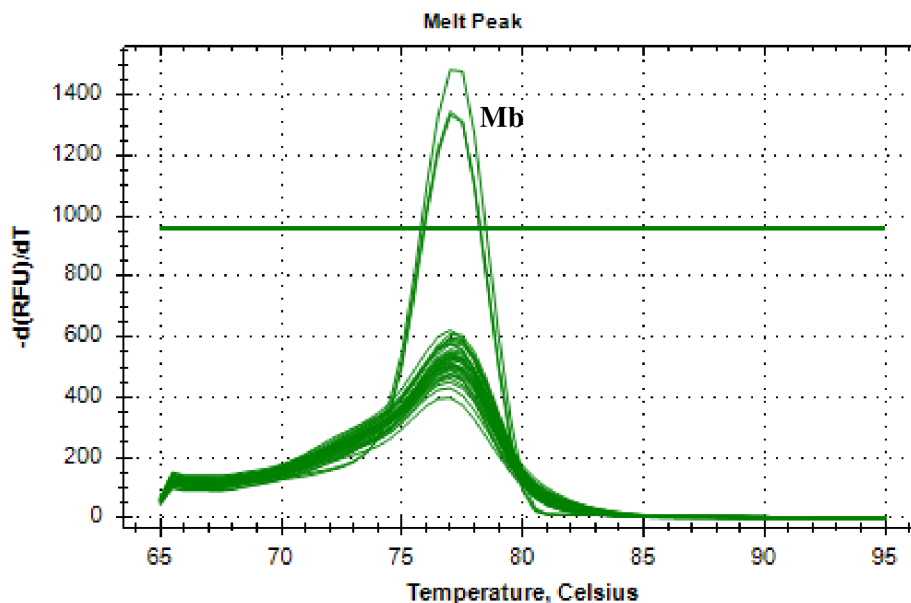


**Graf 2:** Křivka tání pro jednotlivé PCR produkty získané při testování specifity primerů MbqPCR



**Graf 3:** Amplifikační křivka pro vzorek DNA *M. bolleyi* získaná při testování specifity primerů MbRT\_ITS





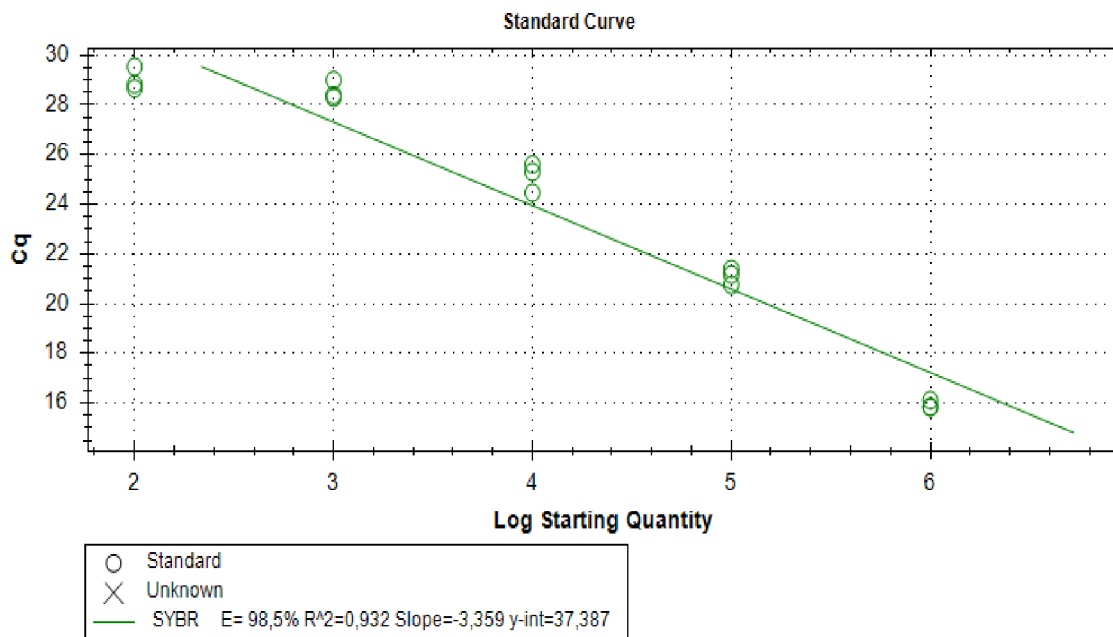
**Graf 4:** Křivka tání pro jednotlivé PCR produkty získané při testování specifity primerů MbRT\_ITS

### 5.3.2 Efektivita reakce

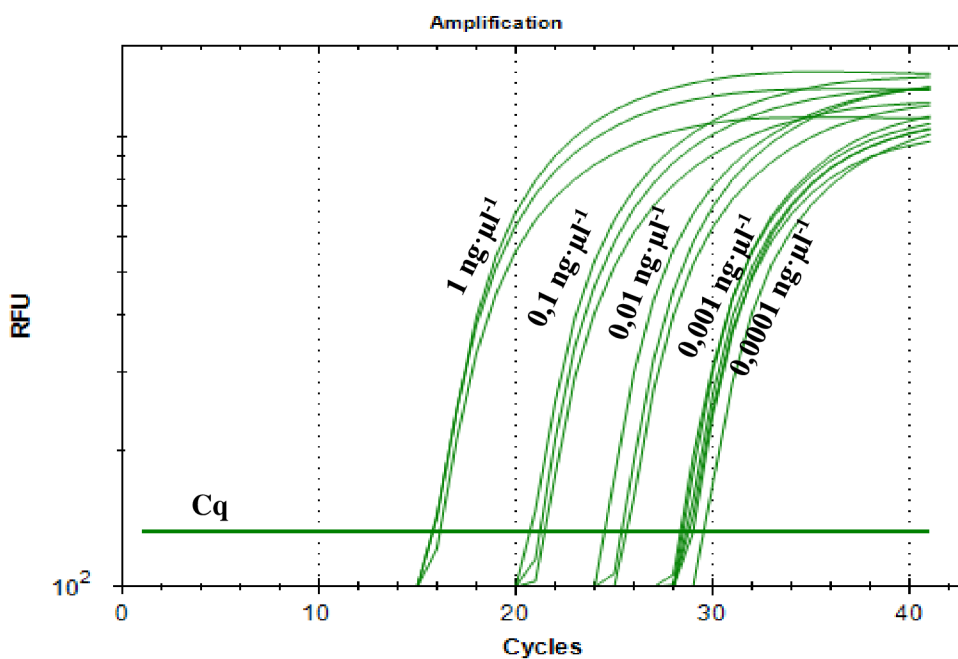
Byla provedena kvantitativní Real-time PCR s jednotlivými roztoky DNA připravené ředící řady DNA izolátů *M. bolleyi*. Na základě získané standardní křivky (graf 5) bylo zjištěno, že efektivita (účinnost) reakce je 98,5 %. Účinnost reakce (E) lze vypočítat s pomocí hodnoty sklonu křivky podle vzorce  $E = (-1 + (10^{-1/\text{sklon}}) \times 100$  (Higuchi *et al.*, 1993). Standardní křivka představuje závislost získaných  $C_q$  hodnot na logaritmu hodnot koncentrace jednotlivých roztoků ředící řady. Zjištěné průměrné  $C_q$  hodnoty (vypočtené z triplikátu) jsou zaznamenány v tabulce 13. Z tabulky vyplývá, že čím nižší je  $C_q$  hodnota, tím větší je koncentrace DNA ve vzorku, což odpovídá očekávání. Naměřené  $C_q$  hodnoty značí, že v rozmezí cyklů 15–29 lze spolehlivě provést kvantifikaci *M. bolleyi*. Jako pozitivní na přítomnost endofytu byly následně považovány všechny vzorky s  $C_q$  hodnotou menší než 30. Amplifikační křivky pro jednotlivé hodnoty ředění jsou společně s  $C_q$  hodnotami znázorněny na grafu 6. Stejně tak byla provedena analýza křivek tání (graf 7).

**Tabulka 13:**  $C_q$  hodnoty pro jednotlivé roztoky ředící řady (efektivita reakce)

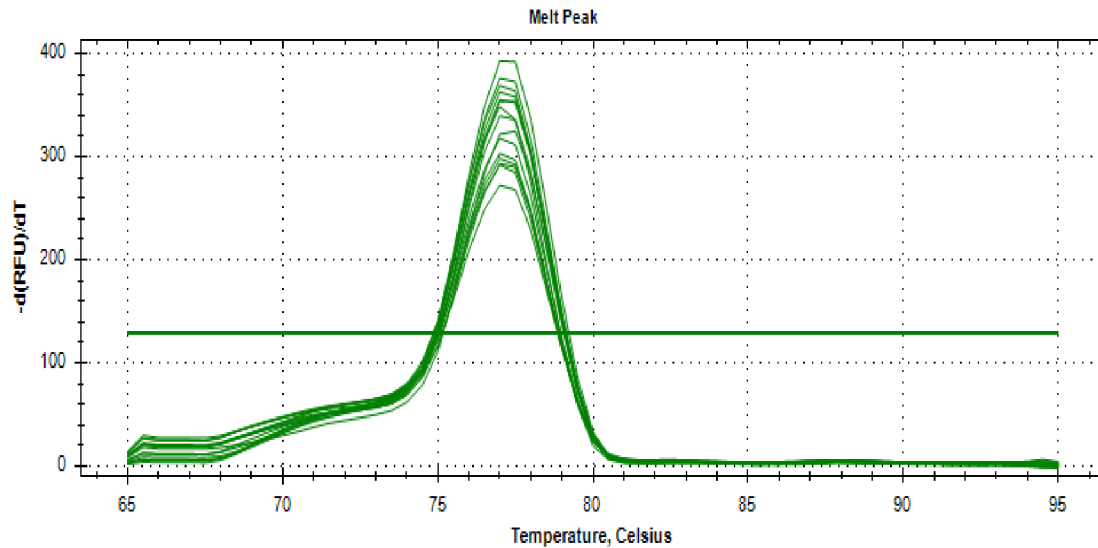
Koncentrace [ $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ]	Průměrná $C_q$ hodnota
1	15,94
0,1	21,12
0,01	25,13
0,001	28,56
0,0001	29,01



**Graf 5:** Standardní křivka pro zjištění efektivity reakce



**Graf 6:** Amplifikační křivky pro vzorky DNA izolátů *M. bolleyi* ředící řady

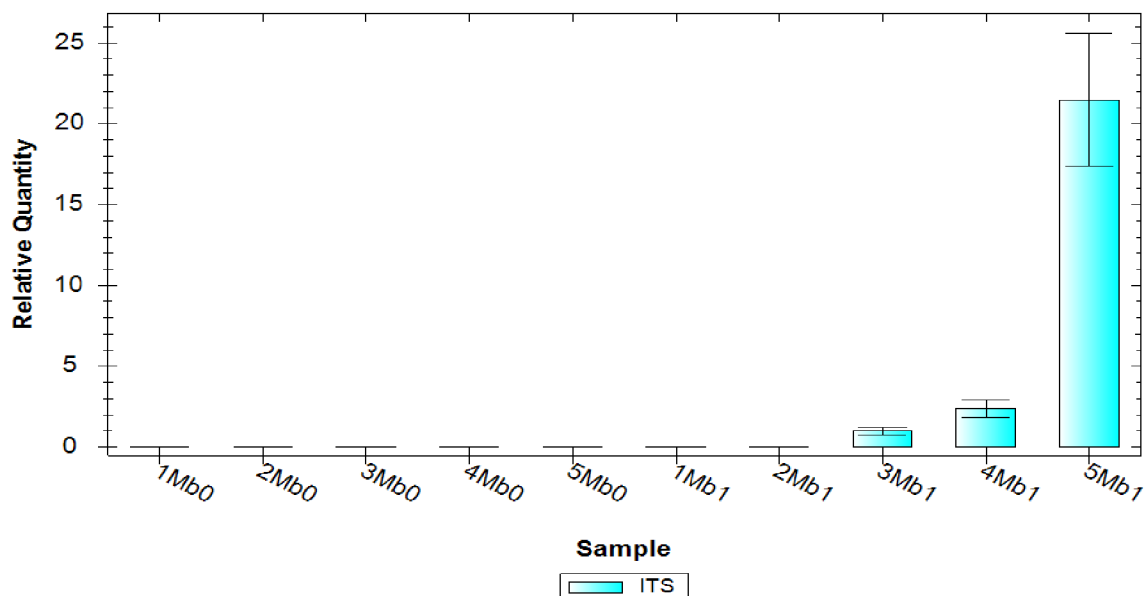


**Graf 7:** Křivky tání pro jednotlivé PCR produkty získané při zjišťování efektivity reakce

### 5.3.3 Kvantifikace v hostiteli

#### 5.3.3.1 Kvantifikace *Microdochium bolleyi* v rostlině *Brachypodium distachyon* (stanovení dynamiky)

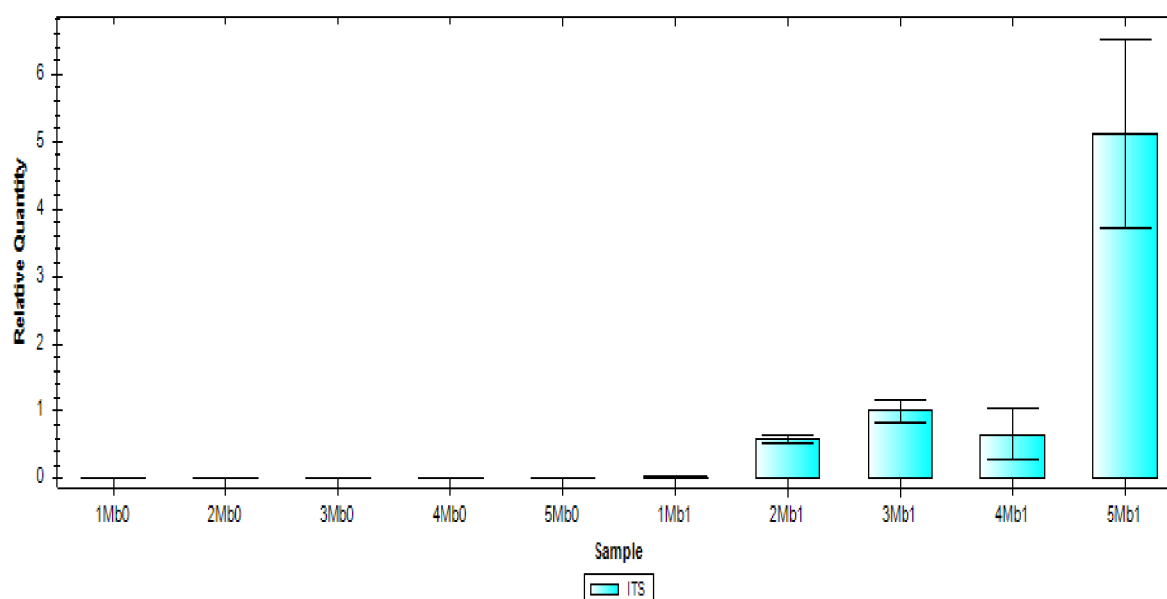
Pomocí kvantitativní Real-time PCR byla sledována dynamika kolonizace endofytem *M. bolleyi*, to znamená, jak se mění jeho obsah v rostlinném hostiteli postupně během pěti měsíců. Poprvé bylo možno detekovat endofyt v rostlinách *B. distachyon* třetího odběru (varianta Bd Mb1). Množství endofytické houby v rostlinách postupně vzrůstalo, přičemž rostliny pátého odběru se vyznačovaly největší mírou kolonizace (graf 8). V kontrolních rostlinách (varianta Bd Mb0) nebyl endofyt detekován.



**Graf 8:** Relativní množství DNA *M. bolleyi* v rostlinách *B. distachyon* (varianty Bd Mb0, Bd Mb1) jednotlivých odběrů

### 5.3.3.2 Kvantifikace *Microdochium bolleyi* v rostlinách pšenice (stanovení dynamiky)

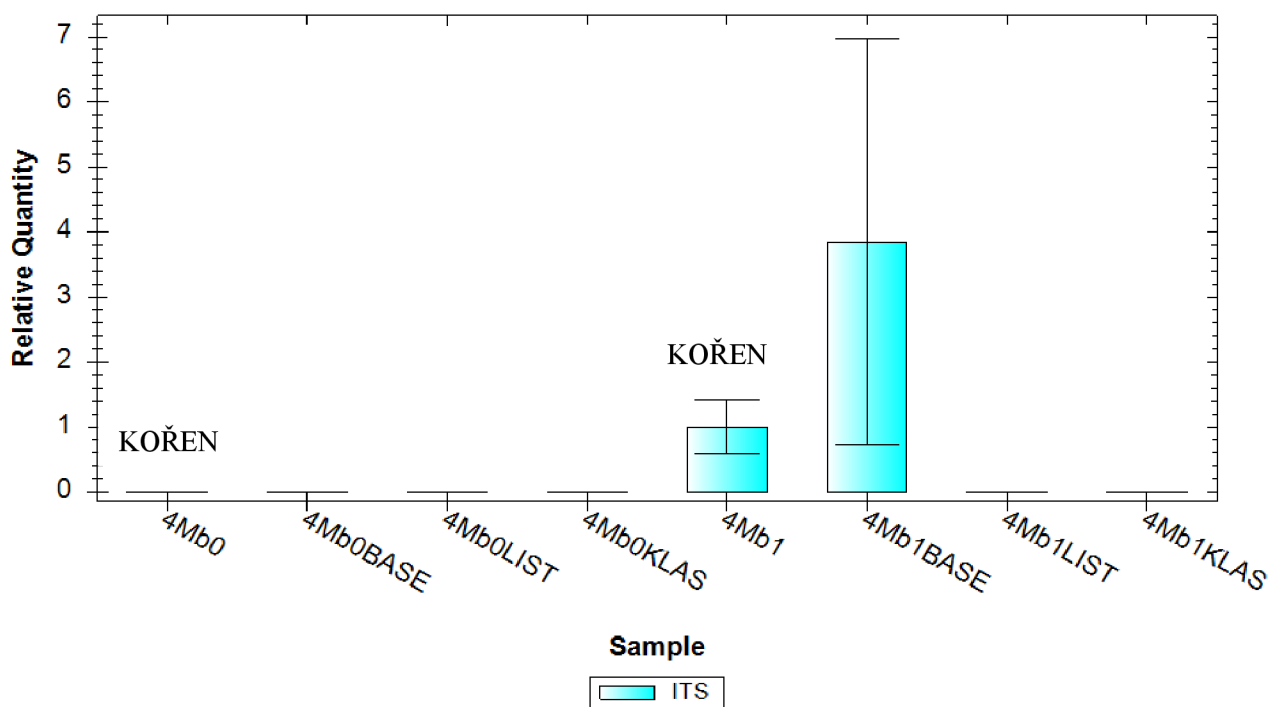
V případě pšenice byl endofyt *M. bolleyi* poprvé detekován již v rostlinách druhého odběru (varianta Whe Mb1), což lze pozorovat na grafu 9. Největší množství endofytu se stejně jako v rostlinách *B. distachyon* nacházelo v rostlinách pátého odběru. Nicméně rostliny třetího odběru vykazovaly vyšší míru kolonizace než rostliny čtvrtého odběru, tudíž nárůst endofytu nebyl postupný jako tomu bylo v rostlinách *B. distachyon*. To bylo pravděpodobně způsobeno v důsledku použití malého počtu vzorků. V kontrolních rostlinách (varianta Whe Mb0) nebyl endofyt detekován.



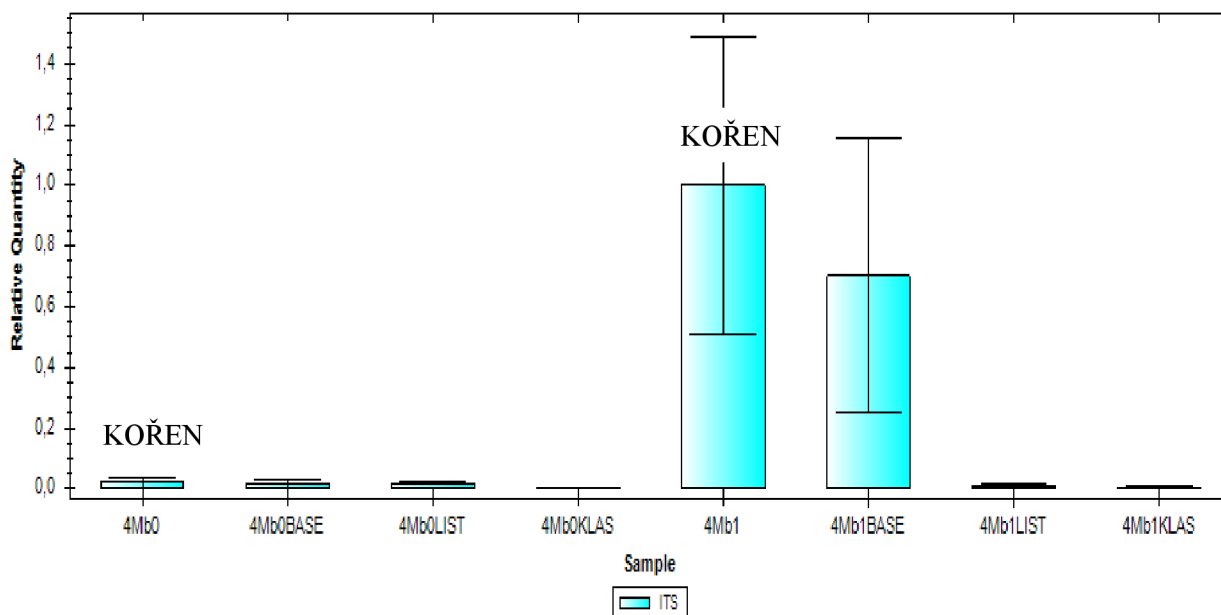
**Graf 9:** Relativní množství DNA *M. bolleyi* v rostlinách pšenice (varianty Whe Mb0, Mb1) jednotlivých odběrů

### 5.3.4 Distribuce v rostlině

Endofytická houba *Microdochium bolleyi* se primárně vyskytuje v kořenech daného rostlinného hostitele, nicméně v některých případech byl tento endofyt izolován i z báze stébla (Reinecke, 1978; Salt, 1977). Distribuce endofytu v rostlinném hostiteli byla stanovena na základě provedení kvantitativní Real-time PCR se vzorky DNA izolované z kořenů, báze stébla, listů a klasů rostlin *B. distachyon* a pšenice čtvrtého odběru. Ze získaného grafu 10 a 11 lze pozorovat, že endofyt *M. bolleyi* byl detekován nejen v kořenech, ale i v bázi stébla obou druhů. V případě *B. distachyon* bylo dokonce zjištěno větší množství endofytu v bázi stébla než v kořenech. Z grafů 10 a 11 lze pozorovat, že se endofyt nevyskytuje v listech a v klasech. Vzhledem k tomu, že v klasech nebyla detekována přítomnost endofytu, lze usoudit, že se tento endofyt nepřenáší osivem, tedy vertikálně. To odpovídá očekávání, jelikož *Microdochium bolleyi* se řadí do čtvrté třídy endofytů (Rodriguez *et al.*, 2009), jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2.3. U této skupiny endofytů se předpokládá, že se přenáší pouze horizontálně.



**Graf 10:** Distribuce endofytu *M. bolleyi* v rostlinách *B. distachyon* (varianty Bd Mb0, Mb1; 4. odběr)



**Graf 11:** Distribuce endofytu *M. bolleyi* v rostlinách pšenice (varianty Whe Mb0, Mb1; 4. odběr)

## 6 DISKUZE

Endofytické houby se zpravidla po delší část svého života vyskytují uvnitř rostlin (Gouda *et al.*, 2016; Hardoim *et al.*, 2015). Jejich přítomnost je velmi často detekována pomocí kultivačních metod (Sun *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2000) nebo mikroskopicky (Bleša *et al.*, 2021; He *et al.*, 2019; Kaminskyj, 2008). Do popředí se však čím dál více dostávají molekulární metody umožňující mnohem snadnější a přesnější detekci jednotlivých endofytických organismů (Ernst *et al.*, 2011; Kelemu *et al.*, 2003; Groppe *et Boller*, 1997). Experimentální část této bakalářské práce je zaměřena na diagnostiku endofytické houby *Microdochium bolleyi* pomocí kvantitativní Real-time PCR. Přítomnost endofytu v rostlinném hostiteli byla také zhodnocena mikroskopicky.

Pro detekci endofytu v kořenech *B. distachyon* a pšenice byl použit pár oligonukleotidových primerů MbRT\_ITS (Matusšinsky, 2021, užitý vzor) navržený pro amplifikaci ITS1 oblasti genu pro rRNA *M. bolleyi*. Tyto primery jsou dostatečně specifické pro endofytickou houbu *M. bolleyi*, jelikož jsou schopny odlišit tento druh od ostatních druhů hub včetně zástupců ze stejného rodu jako je *M. nivale* či *M. majus*. Stejně tak neamplifikují DNA rostlinného hostitele, což může být problém v případě univerzálních primerů ITS1 a ITS4 (White *et al.*, 1990) umožňující detekovat houbové organismy pomocí standardní PCR, což popsali například Martin *et Rygiewicz*, 2005. Velmi podobné sekvence primerů jako mají primery MbRT\_ITS použili Ernst *et al.*, 2011 pro odlišení *M. bolleyi* od *Microdochium phragmitis* v rákosu obecném (*Phragmites australis*) pomocí nested-PCR. Řada endofytů již byla detekována pomocí molekulárních metod, tedy hlavně pomocí standardní PCR, avšak ve většině případů s využitím již zmíněných univerzálních párů primerů ITS1/ITS4, ITS4/ITS5 (White *et al.*, 1990) a ITS1-F/ITS4-B (Gardes *et Bruns*, 1993) amplifikující ITS oblast (ITS1–5,8S–ITS2) rDNA, což provedli například Martin *et Dombrowski*, 2015; Yoo *et Eom*, 2012, Hong *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2000. Nicméně v případě použití univerzálních primerů amplifikující ITS oblast houbové rDNA je zpravidla nutné výsledné PCR produkty osekvenovat a následně porovnat se sekvencemi kupříkladu v nukleotidové databázi GenBank NCBI pomocí BLAST algoritmu, aby bylo možné jednotlivé druhy identifikovat. Příkladem použitých druhově specifických primerů jsou primery amplifikující oblast intronu genu kódující tubulin 2. Ty byly využity pro detekci endofytů rodu *Neotyphodium* v kostřavě rákosovité (*Festuca arundinacea*) (Doss *et al.*, 1998) a také v jílku mnohokvětém (*Lolium multiflorum*) a jílku vytrvalém (*Lolium perenne*) (Dombrowski *et al.*, 2006).

Pomocí kvantitativní Real-time PCR byla provedena relativní kvantifikace endofytické houby *M. bolleyi* s cílem stanovit dynamiku kolonizace hostitele tímto endofytem postupně během pěti měsíců. Z největší míry byly kolonizovány kořeny rostlin jak pšenice, tak *B. distachyon* odebrané pět měsíců od zasetí (a inokulace), z toho vyplývá, že množství endofytu *M. bolleyi* se v rostlinách v průběhu času zvyšuje. Poprvé byl endofyt detekován v rostlinách pšenice po dvou měsících od zasetí a v rostlinách *B. distachyon* po třech měsících. Následně byla stanovena distribuce endofytu v rámci celé rostliny. Zjištěná přítomnost endofytu neodpovídala zcela očekávání, jelikož kromě v kořenech byla přítomnost této houby potvrzena i v bázi stébla. *M. bolleyi* se primárně vyskytuje v kořenech, což je obecně typické

pro čtvrtou třídu endofytů, do které tento endofyt patří (Rodriguez *et al.*, 2009). Nicméně některé studie (Reinecke, 1978; Salt, 1977) uvádí, že *M. bolleyi* byla izolována i z báze stébel. Latz *et al.*, 2020 zjišťovali, které z částí rostlin pšenice jsou nejvíce kolonizovány endofytickými houbami, a to pomocí metody metabarcoding. Endofyty byly identifikovány na základě ITS oblasti, která byla amplifikována s využitím několika typů primerů, výsledné PCR produkty byly osekvenovány, přičemž bylo zjištěno, že nejvíce rozmanité je společenstvo endofytických hub v kořenech. Tao *et al.*, 2008 zkoumali distribuci endofytických hub v rámci orchideje *Bletilla ochracea*, a to pomocí PCR amplifikace ITS oblasti, metody DGGE (Denaturační gradientová gelová elektroforéza) a tzv. ‘random’ klonování PCR produktů. Ve srovnání s poměrně běžně využívanou konvenční PCR v detekci endofytů se kvantitativní Real-time PCR v této oblasti zatím tak často nevyužívá. Cook *et al.*, 2009 využili qPCR pro stanovení množství endofytu *Undifilum oxytropis* podílející se na produkci toxického alkaloidu (swainsonine) v rostlinách z rodu Vlnice (*Oxytropis*) a Kozinec (*Astragalus*). Nicméně na rozdíl od relativní kvantifikace, jež byla použita v případě *M. bolleyi*, Cook *et al.*, 2009, stanovili absolutní obsah endofytu *U. oxytropis* vyjádřený jako množství v pg z celkové izolované DNA na základě sestavení kalibrační křivky roztoků DNA o známé koncentraci. Landa *et al.*, 2013 použili kvantitativní Real-time PCR a nested-PCR v kombinaci s konfokální laserovou mikroskopií pro detekci a monitorování kolonizace máku setého (*Papaver somniferum*) endofytem *Beauveria bassiana* s využitím univerzálních primerů a následně druhově specifických primerů. Chow *et al.*, 2018 zjišťovali pomocí qPCR vliv endofytů (*Diaporthe phaseolorum*, *Trichoderma asperellum* a *Penicillium citrinum*) na patogen Gb (*Ganoderma boninense*), který napadá palmu olejnou (*Elaeis guineensis*). Analýza prokázala, že v případě, kdy byly rostliny inokulovány současně endofyty a patogenem Gb, došlo k potlačení kolonizace patogenem endofytickými houbami prostřednictvím kompetice, což se projevilo vyšším obsahem DNA endofytů v porovnání s obsahem DNA patogenu. Nicméně doposud nebyla vyvinuta molekulární metoda umožňující spolehlivě kvantifikovat endofyt *Microdochium bolleyi* v rostlinném hostiteli a žádný z výše uvedených autorů nepoužil relativní způsob kvantifikace k vyjádření množství endofytu.

Přítomnost endofytů v kořenech pšenice a *B. distachyon* byla také posouzena pomocí světelného mikroskopu. Jako pozitivní na výskyt endofytu byly označeny kořeny, ve kterých byly detekovány tmavě hnědě zbarvené klastry chlamydospor. Zjištěné výsledky týkající se přítomnosti/nepřítomnosti endofytu z mikroskopování odpovídají výsledkům z kvantitativní Real-time PCR (kapitoly 5.2 a 5.3). Mikroskopické metody pro stanovení přítomnosti endofytů jsou sice využívány, ale v mnohých případech v kombinaci s molekulárními či jinými metodami (He *et al.*, 2019; Shadmani *et al.*, 2018; Tellenbach *et al.*, 2010). Nicméně v porovnání s molekulárními metodami je celý proces časově náročný, a ne zcela přesný. Identifikace jednotlivých organismů pomocí mikroskopu vyžaduje značnou zkušenost, jelikož tímto způsobem lze jednotlivé druhy odlišit pouze na základě morfologických znaků. Navíc jednotlivé kořeny nejsou většinou kolonizovány rovnoměrně po celé délce, proto je k mikroskopování nutné vybrat pouze určitou část kořenu a pokud jsou kořeny příliš tlusté, je obtížné preparát proostrit ve všech jeho částech. V případě této práce byly mikroskopovány zejména segmenty

kořenů odebrané v blízkosti kořenového krčku. Tyto části se totiž vyznačovaly největším množstvím chlamydospor. Z toho lze usoudit, že je vhodné použít mikroskopickou detekci pouze jako doprovodný nástroj v kombinaci se spolehlivější a přesnější molekulární metodou, nikoli však jako samostatnou metodu pro diagnostiku endofytů.

Na základě zaznamenaných údajů o vývojových fázích rostlin jednotlivých odběrů lze říct, že *M. bolleyi* urychluje vývoj a podporuje růst pšenice a *B. distachyon*, jelikož rostliny s přítomností endofytu se nacházely v pozdější fázi vývoje ve srovnání s rostlinami bez endofytu. Nicméně je nutné podotknout, že tyto výsledky jsou spíše orientační, protože tato schopnost *M. bolleyi* byla usuzována pouze na základě určení fáze růstu a změření velikosti rostlin. Shadmani *et al.*, 2018 však zaznamenali tuto vlastnost *M. bolleyi* při zkoumání vlivu *M. bolleyi* na potlačení patogenu *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* u ječmene. V případě experimentu, který provedli Shadmani *et al.* 2018 byla schopnost *M. bolleyi* podporovat růst ječmene prokázána na základě srovnání hmotností čerstvých a usušených rostlin s endofytem a bez endofytu.

Pomocí kvantitativní Real-time PCR s použitím primerů MbRT\_ITS byla úspěšně detekována přítomnost endofytu *M. bolleyi* v rostlinách *B. distachyon* a pšenice a následně její distribuce v rámci celé rostliny. Dále bylo zjištěno, jak se postupně mění relativní obsah této endofytické houby v kortikálních buňkách kořene během pěti měsíců růstu jednotlivých rostlin. Jedinou nevýhodou je, že získané výsledky jsou relativní, tudíž není známo skutečné množství DNA v daném rostlinném pletivu. Nicméně tato metoda by mohla být dále využita pro posouzení vlivu endofytu *M. bolleyi* na patogeny (např. z rodu *Fusarium*) způsobující závažné choroby pšenice.



## 7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce byla provedena optimalizace diagnostiky endofytické houby *Microdochium bolleyi* v rostlinném hostiteli pomocí kvantitativní Real-time PCR. Samotné detekci této houby předcházelo založení pokusu ve skleníku a inokulace osiva rostliny *Brachypodium distachyon* a pšenice (*Triticum aestivum*). Inokulace byla úspěšně provedena, jelikož přítomnost endofytu v obou rostlinných hostitelích byla následně potvrzena molekulární metodou (qPCR) i mikroskopicky. Pro detekci sledovaného endofytu pomocí qPCR byly testovány dva typy párů primerů (MbqPCR a MbRT\_ITS) pro amplifikaci ITS oblasti rDNA. Primery MbqPCR navržené v rámci této práce musely být z experimentu vyřazeny, neboť nebyly specifické pro *M. bolleyi* a detekovaly i příbuzný druh *M. majus*. V experimentu byly dále použity pouze primery MbRT\_ITS (Matusínský 2021, užitý vzor), jež byly specifické a úspěšně amplifikovaly ITS oblast *M. bolleyi* ve vzorcích DNA izolované z pšenice i *B. distachyon*.

Analýza dynamiky kolonizace kořenů endofytem pomocí kvantitativní Real-time PCR prokázala, že obsah endofytu v rostlinách se v průběhu času postupně zvyšuje, přičemž nejintenzivněji byly kolonizovány kořeny rostlin posledního odběru (po pěti měsících od zasetí a inokulace). Zjištěné množství DNA endofytu *M. bolleyi* metodou qPCR, která byla provedena v této práci, je však relativní. Pomocí této metody byla také stanovena distribuce endofytu uvnitř jednotlivých rostlin. *M. bolleyi* je zejména kořenový endofyt, nicméně jeho přítomnost byla prokázána i v bázi stébla pšenice a *B. distachyon*. Pomocí světelného mikroskopu byl prokázán výskyt endofytu v kořenech v podobě vytvořených klastrů chlamydospor. Na základě zjištěných vývojových fází rostlin jednotlivých odběrů bylo zaznamenáno, že endofyt *M. bolleyi* urychluje vývoj svého hostitele. Pro úplné potvrzení tohoto vlivu by však bylo nutné provést další analýzu. V neposlední řadě lze usoudit, že endofyt *M. bolleyi* se nepřenáší osivem (vertikálně), jelikož v semenech inokulovaných rostlin nebyl tento endofyt detekován.

## 8 LITERATURA

- Addy, H. D., Piercey, M. M., Currah, R. S (2005): Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany* 83: 1–13.
- Ahlawat, O. P., Yadav, D., Kashyap, P. L., Khippal, A., Singh, G. (2021): Wheat endophytes and their potential role in managing abiotic stress under changing climate. *Journal of Applied Microbiology* 00: 1–20.
- Ahmad, R. Z., Ameen, F., Khalid R., Alghuthaymi M. A., Alsalmi R., Li C. (2019): A Brief History of Endophyte Detection Techniques in Grasses. *Sustainable Agriculture Research* 8: 66.
- Ali, A. H., Abdelrahman, M., Radwan, U., El-Zayat, S., El-Sayed, M. A. (2018): Effect of *Thermomyces* fungal endophyte isolated from extreme hot desert-adapted plant on heat stress tolerance of cucumber. *Applied Soil Ecology* 124: 155–162.
- Andrade-Linares D. R., Franken P. (2013): Fungal Endophytes in Plant Roots: Taxonomy, Colonization Patterns, and Functions. In: Aroca R. (ed.) *Symbiotic Endophytes. Soil Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg 37: 311–334.
- Araújo, W. L., Lacava, P. T., Marco, J., Lima, A. O. S., Sobral, J. K., Azevedo, J. L., Pizzirani-Kleiner, A. A. (2010): Isolamento de microrganismos endofíticos. *Guiaprático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos. Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos* 167.
- Arora, J., Ramawat, K. G. (2017): An introduction to endophytes. In: Maheshwari, D. (ed.) *Endophytes: biology and biotechnology*, pp. 1–23, Springer, Cham.
- Ayliffe M., Singh D., Park R., Moscou M., Pryor T. (2013): Infection of *Brachypodium distachyon* with selected grass rust pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 946–957.
- Azarbad, H., Tremblay, J., Giard-Laliberté, C., Bainard, L. D., Yergeau, E. (2020): Four decades of soil water stress history together with host genotype constrain the response of the wheat microbiome to soil moisture. *FEMS microbiology ecology* 96: fiae098.
- Azevedo, J. L., Araújo, W. L. (2007): Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli, B. N., Deshmukh, S. K. (ed.) *Fungi: multifaceted microbes*. Boca Raton (FL) pp. 189–207, CRC Press.
- Barrow, J. R. (2003): Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 13: 239–247.
- Baskin, J. M., Baskin, C. C. (2004): A Classification System for Seed Dormancy. *Seed Science Research* 14: 1–16.
- Bell, A. A., Wheeler, M. H. (1986): Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual review of phytopathology* 24: 411–451.
- Berg, G., Raaijmakers, J. M. (2018): Saving seed microbiomes. *The ISME journal* 12: 1167–1170.
- Bhat, R. G., Browne, G. T. (2010): Specific detection of *Phytophthora cactorum* in diseased strawberry plants using nested polymerase chain reaction. *Plant Pathology* 59: 121–129.
- Bischoff J.F., White J.F. Jr (2005): Evolutionary development of the Clavicipitaceae. In: Dighton J., White J. F., Oudemans P. (ed.) *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis, pp. 505–518.
- Błaszczak L., Salamon S., Mikołajczak K. (2021): Fungi Inhabiting the Wheat Endosphere. *Pathogens* 10: 1288.
- Bleša, D., Matušinsky, P., Sedmíková, R., Baláž, M. (2021): The potential of *Rhizoctonia*-like fungi for the biological protection of cereals against fungal pathogens. *Plants (Basel, Switzerland)*10: 349.

- Bloemen, J., McGuire, M. A., Aubrey, D. P., Teskey, R. O., Steppe, K. (2013): Transport of root-respired CO<sub>2</sub> via the transpiration stream affects aboveground carbon assimilation and CO<sub>2</sub> efflux in trees. *New Phytologist* 197: 555–556.
- Bonfante, P., Selosse, M. A. (2010): A glimpse into the past of land plants and of their mycorrhizal affairs: from fossils to evo-devo. *New Phytologist* 186: 267–270.
- Bouvier d'Yvoire M., Bouchabke-Coussa O., Voorend W., Antelme S., Cézard L., Legée F., Lebris P., Legay S., Whitehead C., McQueen-Mason S.J., Gomez L.D., Jouanin L., Lapierre C., Sibout R. (2012): Disrupting the cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 gene (BdCAD1) leads to altered lignification and improved saccharification in *Brachypodium distachyon*. *Plant Journal* 73: 496–508.
- Brasileiro, B. T. R. V., Coimbra, M. R. M., Morais Jr, M. A. D., Oliveira, N. T. D. (2004): Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology* 35: 205–210.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55: 611–622.
- Caldwell, B. A., Jumpponen, A., Trappe, J. M. (2000): Utilization of Major Detrital Substrates by Dark-Septate, Root Endophytes. *Mycologia* 92: 230–232.
- Carroll, G. (1988): Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology* 69: 2–9.
- Clay, K. (1990). Fungal endophytes of grasses. *Annual review of Ecology and Systematics* 21: 275–297.
- Clay, K., Schardl, C. (2002): Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American naturalist* 160: S99–S127.
- Colton-Gagnon K., Ali-Benali M.A., Mayer B.F., Dionne R., Bertrand A., Do Carmo S., Charron J.B. (2014): Comparative analysis of the cold acclimation and freezing tolerance capacities of seven diploid *Brachypodium distachyon* accessions. *Annals of Botany* 113: 681–93.
- Comby, M., Gacoïn, M., Robineau, M., Rabenoelina, F., Ptas, S.; Dupont, J.; Profizi, C.; Baillieul, F. (2007): Screening of wheat endophytes as biological control agents against *Fusarium* head blight using two different in vitro tests. *Microbiological Research* 202: 11–20.
- Conrath, U., Beckers, G., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, MA, Pieterse, C., Poinssot, B., Pozo, M., Alain, P., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B. (2006): Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular plant-microbe interactions* 19: 1062–1071.
- Cook, D., Gardner, D. R., Welch, K. D., Roper, J., Ralphs, M. H., Green, B. T. (2009): Quantitative PCR method to measure the fungal endophyte in locoweeds. *Journal of agricultural and food chemistry* 57: 6050–6054.
- Damm U., Brune A., Mendgen K. (2003): In vivo observation of conidial germination at the oxic–anoxic interface and infection of submerged reed roots by *Microdochium bolleyi*. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 293–299.
- David, A. S., Haridas S., LaButti K., Lim J., Lipzen A., Wang M., Barry K., Grigoriev I. V., Spatafora J. W., May G. (2016)a: Draft genome sequence of *Microdochium bolleyi*, a dark septate fungal endophyte of beach grass. *Genome Announcements* 4: e00270–16.
- David, A. S., Seabloom, E. W., May, G. (2016)b: Plant host species and geographic distance affect the structure of aboveground fungal symbiont communities, and environmental filtering affects belowground communities in a coastal dune ecosystem. *Microbial Ecology* 71: 912–926.
- De Hoog, G. S., Hermanides-Nijhof, E. J. (1977): Survey of the black yeasts and allied fungi. *Studies in Mycology* 15: 178–222.

- Deka D., Tayung K., Jha D.K. (2017): Harnessing Fungal Endophytes for Plant and Human Health. In: Maheshwari, D. (ed.) Endophytes: Biology and Biotechnology. Sustainable Development and Biodiversity, Springer, Cham., 15: 59–98.
- Della Monica, I. F., Saparrat, M. C. N., Godeas, A. M., and Scervino, J. M. (2015): The co-existence between DSE and AMF symbionts affects plant P pools through P mineralization and solubilization processes. *Fungal Ecology* 17: 10–17.
- Des Marais, D.L., Juenger, T.E. (2016): Brachypodium and the abiotic environment. In *Genetics and Genomics of Brachypodium*, J. Vogel, ed (Switzerland: Springer), pp. 291–311.
- Deshmukh, S., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., Kogel, K. H. (2006): The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18450–18457.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., Sharon, A. (2017): Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology spectrum* 5: 10.1128.
- Dombrowski, J. E., Baldwin, J. C., Azevedo, M. D., Banowitz, G. M. (2006): A sensitive PCR-based assay to detect *Neotyphodium* fungi in seed and plant tissue of tall fescue and ryegrass species. *Crop Science* 46: 1064–1070.
- Doss, R. P., Clement, S. L., Kuy, S. R., Welty, R. E. (1998): A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. *Plant disease* 82: 738–740.
- Doss, R. P., Welty R. E. (1995): A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology* 85: 913–917.
- Draper, J., Mur, L. A. J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G. C., Bablak, P., Hasterok, R., Routledge, A. P. M. (2001): *Brachypodium distachyon*. A New Model System for Functional Genomics in Grasses. *Plant Physiology* 127: 1539–1555.
- Duczek, L. J. (1997): Biological control of common root rot in barley by *Idriella bolleyi*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 402–405.
- Eady, C. (2021): The Impact of Alkaloid-Producing *Epichloë* Endophyte on Forage Ryegrass Breeding: A New Zealand Perspective. *Toxins* 13:158.
- Enz, M., Dachler, Ch. (1997): Compendium of Growth Stage Identification Keys for Mono-and Dicotyledonous Plants. Extended BBCH scale. 2nd. edition. ISBN 3-9520749-3-4
- Ernst, M., Neubert, K., Mendgen, K. W., Wirsal S. G. R. (2011): Niche differentiation of two sympatric species of *Microdochium* colonizing the roots of common reed. *BMC Microbiology* 11: 242.
- Faeth S. H., Sullivan T. J. (2003): Mutualistic, asexual endophytes in a native grass are usually parasitic. *American Naturalist* 161: 310–325.
- Faeth, S. H., Gardner, D. R., Hayes, C. J., Jani, A., Wittlinger, S. K., Jones, T. A. (2006): Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of chemical ecology* 32: 307–324.
- Fitzgerald T. L., Powell J. J., Schneebeil K., Hsia M. M., Gardiner D. M., Bragg J. N., Lynne McIntyre L., Manners J. M., Ayliffe M., Watt M., Vogel J. P., Henry R. J., Kazan K. (2015): *Brachypodium* as an emerging model for cereal–pathogen interactions. *Annals of Botany* 115: 717–731.
- Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., Johnson, M. (2018): Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: 1157–1165.
- Fontana, D. C., de Paula, S., Torres, A. G., de Souza, V. H. M., Pascholati, S. F., Schmidt, D., Dourado Neto, D. (2021): Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. *Pathogens* 10: 570.

- Gardes, M., Bruns, T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.
- Garvin, D. F., Gu, Y. Q., Hasterok, R., Hazen, S. P., Jenkins, G., Mockler, T. C., Mur, L. A. J., Vogel, J. P. (2008): Development of Genetic and Genomic Research Resources for *Brachypodium distachyon*, a New Model System for Grass Crop Research. *Crop Science* 48: S-69-S-84.
- Gdanetz, K., Trail, F. (2017): The wheat microbiome under four management strategies, and potential for endophytes in disease protection. *Phytobiomes* 1: 158–168.
- Geiser D.M. (2004): Practical Molecular Taxonomy of Fungi. In: Tkacz J.S., Lange L. (ed.) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*, pp. 3–14. Springer, Boston, MA.
- Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., Lelie, D., Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Moore, F. P., Moore, E. R., Campbell, C. D., Ryan, D., Dowling, D. N. (2004): Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS microbiology ecology* 48: 109–118.
- Giovannetti, M., Mosse, B. (1980): An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist* 489–500.
- Glynn, N. C., Ray, R., Edwards, S. G., Hare, M. C., Parry, D. W., Barnett, C. J., Beck, J. J. (2007): Quantitative *Fusarium* spp. and *Microdochium* spp. PCR assays to evaluate seed treatments for the control of *Fusarium* seedling blight of wheat. *Journal of applied microbiology* 102: 1645–1653.
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H. S., Patra, J. K. (2016): Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers in microbiology* 7: 1538.
- Greenfield M., Pareja R., Ortiz, V., Gómez-Jiménez M. I., Vega, F. E., Parsa, S. (2015): A novel method to scale up fungal endophyte isolations, *Biocontrol Science and Technology* 25: 1208–1212.
- Groppe, K., Boller, T. (1997): PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloë* endophytes in grass tissue. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1543–1550.
- Groppe, K., Sanders I., Wiemken A., Boller T. (1995): A microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloë* spp.) in grasses. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3943–3949.
- Guo, L. D., Hyde, K. D., Liew, E. (2000): Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New phytologist* 147: 617–630. *Handbook of Physiological Botany*. Vol. 2. Leipzig
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A. (2015): The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 79: 293–320.
- Hariharan, G., Prasannath, K. (2021): Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10: 600234.
- Hasterok, R., Marasek, A., Donnison, I. S., Armstead, I., Thomas, A., King, I. P., Wolny, E., Idziak, D., Draper, J., Jenkins, G. (2006): Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence in situ hybridization. *Genetics* 173: 349–362.
- He, C., Wang, W., Hou, J. (2019): Characterization of dark septate endophytic fungi and improve the performance of liquorice under organic residue treatment. *Frontiers in microbiology* 10: 1364.
- Hernández-Restrepo, M., Groenewald J. Z., Crous, P. W. (2016): Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia* 36: 57–82.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* 11: 1026–1030.

- Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., Gange, A. C. (2014): Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and evolution* 4: 1199–1208.
- Hong, S. K., Kim, W. G., Choi, H. W., Lee, S. Y. (2008): Identification of *Microdochium bolleyi* Associated with Basal Rot of Creeping Bent Grass in Korea. *Mycobiology* 36: 77–80.
- 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: 612–620.
- Hubbard M., Germida J., Vujanovic V. (2012): Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. *Botany* 90: 137–149.
- Hughes, K. W., Petersen, R. H., Lodge, D. J., Bergemann, S. E., Baumgartner, K., Tulloss, R. E., Lickey, E., Cifuentes, J. (2013): Evolutionary consequences of putative intra- and interspecific hybridization in agaric fungi. *Mycologia* 105: 1577–1594.
- Hyde, K. D., Soyong, K. (2008): The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33: 163–173.
- Chervoneva, I., Li, Y., Schulz, S., Croker S., Wilson, C., Waldman, S. A., Hyslop T. (2010): Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics* 11: 253.
- Chi, F., Shen, S. H., Cheng, H. P., Jing, Y. X., Yanni, Y. G., Dazzo, F. B. (2005): Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7271–7278.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., Johri, B. N. (2007): Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology* 47: 289–297.
- Chow Y. Y., Rahman, S., Ting, A. S. Y (2018): Interaction dynamics between endophytic biocontrol agents and pathogen in the host plant studied via quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) approach. *Biological Control* 15: 44–49.
- Ichida, H., Matsuyama, T., Abe, T. and Koba, T. (2007): DNA adenine methylation changes dramatically during establishment of symbiosis. *The FEBS Journal* 274: 951–962.
- Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Jan, F. G., Rahman, I. U., Iqbal, A., Hamayun, M. (2018): IAA producing fungal endophyte *Penicillium roqueforti* Thom., enhances stress tolerance and nutrients uptake in wheat plants grown on heavy metal contaminated soils. *PloS one* 13: e0208150.
- Jackson, M. B., Armstrong, W. (1999): Formation of Aerenchyma and the Processes of Plant Ventilation in Relation to Soil Flooding and Submergence. *Plant Biology* 1: 274–287.
- Jadubansa P., Lethbridge G., Bushell M. E. (1994): Physiology of production of viable biomass and spore inoculum for the biocontrol agent *Idriella (Microdochium) bolleyi*. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 24–28.
- Jalgaonwala, R.E., Mohite, B.V., Mahajan, R.T. (2011): A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1: 21–32.
- Jumpponen, A. (2001): Dark septate endophytes. Are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11: 207–211.
- Jumpponen, A., Trappe, J. M. (1998): Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* 140: 295–310.
- Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., Pozo, M. J. (2012): Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology* 38: 651–664.
- Kaminskyj, S. G. W. (2008): Effective and flexible methods for visualizing and quantifying endorhizal fungi. In Siddiqui, Z. A., Akhtar, M. S., Futai, K. (ed.) *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*, pp. 337–349, Springer, Dordrecht.
- Kamle M., Borah R., Bora H., Jaiswal A.K., Singh R.K., Kumar P. (2020): Systemic Acquired Resistance (SAR) and Induced Systemic Resistance (ISR): Role and Mechanism of Action Against Phytopathogens. In: Hesham AL., Upadhyay R., Sharma G., Manoharachary C., Gupta V. (ed.) *Fungal Biotechnology and Bioengineering. Fungal Biology*, pp. 457–470, Springer, Cham.

- Kelemu, S., Dongyi, H., Guixiu, H., Takayama, Y. (2003): Detecting and differentiating *Acremonium implicatum*: developing a PCR-based method for an endophytic fungus associated with the genus *Brachiaria*. *Molecular Plant Pathology* 4: 115–118.
- Kirk, J. J., Deacon, J. W. (1987): Control of the take-all fungus by *Microdochium bolleyi*, and interactions involving *M. bolleyi*, *Phialophora graminicola* and *Periconia macrospinoso* on cereal roots. *Plant and Soil* 98: 231–237.
- Knapp, D. G., Kovács, G. M. (2016): Interspecific metabolic diversity of root-colonizing endophytic fungi revealed by enzyme activity tests. *FEMS microbiology ecology* 92: 190.
- Knapp, D. G., Németh, J. B., Barry, K., Hainaut M., Henrissat B., Johnson J., Kuo A., Lim J. H. P., Lipzen A., Nolan M., Ohm R. A., Tamás L., Grigoriev I. V., Spatafora J. W., Nagy L. G., Kovács G. M. (2018): Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific Reports* 8: 6321.
- Knapp, D. G., Pintye, A., Kovács, G. M. (2012): The dark side is not fastidious-dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PloS one* 7: e32570.
- Knudsen I. M. B., Hockenhull J., Jensen D. F. (1995): Biocontrol of seedling diseases of barley and wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana*: effects of selected fungal antagonists on growth and yield components. *Plant Pathology* 44: 467–477.
- Korabecna, M. (2007): The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* 2: 783–787.
- Kour, A., Shawl, A., Rehman, S., Sultan, P. S., Qazi, P., Suden, P., Khajuria, R., Verma, V. (2008): Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 1115–1121.
- Kovács, G. M., Szigetvári, C. (2002): Mycorrhizae and other root-associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the Great Hungarian Plain. *Phyton - Annales Rei Botanicae* 42: 211–223.
- Kozera, B., Rapacz, M. (2013): Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics* 54: 391–406.
- Kralik, P., Ricchi, M. (2017): A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in microbiology* 8: 108.
- Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N., Hermsen, E. J. (2007): Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* 174: 648–657.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27: 95–125.
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., Johri, A. K. (2009): Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology (Reading, England)* 155: 780–790.
- Kusari S., Kosuth J., Cellarova E., Spitteller, M. (2011): Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal Ecology* 4: 219–223.
- Kuźniar A., Włodarczyk K., Grządziel J., Woźniak M., Furtak K., Gałazka A., Dziadczyk E., Skórzyńska-Polit E., Wolińska A. (2020): New Insight into the Composition of Wheat Seed Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 4634.
- Landa, B. B., López-Díaz, C., Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Muñoz-Ledesma, F. J., Ortiz-Urquiza, A., Quesada-Moraga, E. (2013): In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of invertebrate pathology* 114: 128–138.

- Lascaris D., Deacon, J. W. (1991): Colonization of wheat roots from seed-applied spores of *Idriella (Microdochium) bolleyi*: A biocontrol agent of take-all. *Biocontrol Science and Technology* 1: 229–240.
- Latz, M. A. C, Kern, M., Sørensen, H., Collinge, D. B., Jensen, B., Brown, J. K., Madsen, A., Jørgensen, H. J. L. (2020): Succession of the Fungal Endophytic Microbiome in Wheat is Dependent on Tissue-Specific Interactions of Host Genotype and Environment. *Science of the Total Environment* 759: 143804.
- Li, C., Rudi, H., Stockinger, E. J., Cheng, H., Cao, M., Fox, S., Mockler, T., Westereng, B., Fjellheim, S., Rognli, O. A., Sandve, S. R. (2012): Comparative analyses reveal potential uses of *Brachypodium distachyon* as a model for cold stress responses in temperate grasses. *BMC Plant biology* 12: 65.
- Liesack, W., Schnell, S., Revsbech, N. P. (2000): Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 625–645.
- Liljeroth, E., Bryngelsson, T. (2002): Seed Treatment of Barley with *Idriella bolleyi* causes Systemically Enhanced Defence against Root and Leaf Infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Biocontrol Science and Technology* 12: 235–249.
- Luchi, N., Ghelardini, L., Belbahri, L., Quartier, M., Santini, A. (2013): Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by quantitative real-time PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 5394–5404.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C.J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M., Hibbett, D., James, T.Y., Baloch, E., Grube, M., Reeb, V., Hofstetter, V., Schoch, C., Arnold, A.E., Miadlikowska, J., Spatafora, J., Johnson, D., Hambleton, S., Crockett, M., Shoemaker, R., Sung, G.-H., Lücking, R., Lumbsch, T., O'Donnell, K., Binder, M., Diederich, P., Ertz, D., Gueidan, C., Hansen, K., Harris, R.C., Hosaka, K., Lim, Y.-W., Matheny, B., Nishida, H., Pfister, D., Rogers, J., Rossman, A., Schmitt, I., Sipman, H., Stone, J., Sugiyama, J., Yahr, R., Vilgalys, R. (2004): Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446–1480.
- Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M. E., Eren, A. M., Simmons, S. L. (2014): Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *mBio* 5: e00682–13.
- Malik, A., Butt, T. A., Naqvi, S.T.A., Yousaf, S., Qureshi, M. K., Zafar, M. I., Farooq, G., Nawaz, I., Iqbal, M. (2020): Lead Tolerant Endophyte *Trametes Hirsuta* Improved the Growth and Lead Accumulation in the Vegetative Parts of *Triticum aestivum* L. *Heliyon* 6: e04188.
- Mandyam K., Jumpponen, A. (2005): Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* 53: 173–189.
- Manter, D. K., Vivanco, J. M. (2007): Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of microbiological methods* 71: 7–14.
- Martienssen, R. A., Colot, V. (2001): DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science (New York, N.Y.)* 293: 1070–1074.
- Martin, K. J., Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology* 5: 28.
- Martin, R. C., Dombrowski, J. E. (2015): Isolation and identification of fungal endophytes from grasses along the Oregon coast. *American Journal of Plant Sciences* 6: 3216.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L., Davis, C. E., Dandekar, A. M. (2014): Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 1–25.
- Matos, D. A., Whitney, I. P., Harrington, M. J., Hazen, S. P. (2013): Cell walls and the developmental anatomy of the *Brachypodium distachyon* stem internode. *PLOS one* 8: e80640.
- Matušinsky, P., Sedláková, B., Bleša, D. (2021): Sada primerů a set pro detekci *Microdochium bolleyi*, užitečný vzor CZ 34829 U1.



- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., Flors, V. (2017): Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual review of plant biology* 68: 485–512.
- Mbwana J., Bölin I., Lyamuya E., Mhalu F., Lagergard T. (2006): Molecular characterization of *Haemophilus ducreyi* isolates from different geographical locations. *J Clin Microbiology* 44: 132–7.
- McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., Ward, E. (2003): Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest management science* 59: 129–142.
- Meng, J., Doyle, M. P. (2002): Introduction. *Microbiological food safety. Microbes and infection* 4: 395–397.
- Moemen D., Bedir T., Awad E. A., Ellayeh, A. (2015): Fungal keratitis: Rapid diagnosis using methylene blue stain, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 2: 289–294.
- Monard, C., Gantner, S., Stenlid, J. (2013): Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS microbiology ecology* 84: 165–175.
- Murray, D. I. L., Gadd, G. M. (1981): Preliminary studies on *Microdochium bolleyi* with special reference to colonization of barley. *Transactions of the British Mycological Society* 76: 397–403.
- Nair, D. N., Padmavathy, S. (2014): Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *TheScientificWorldJournal* 250693.
- Narayanasamy, P. (2011). Detection of Fungal Pathogens in Plants. In: *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis*, pp. 5–199, Springer, Dordrecht. Print ISBN978-90-481-97347
- Nelson, E. (2018): The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant and Soil* 422: 1–28.
- Neto, P. A. S., Azevedo, J. L., Araújo, W. L. (2002): Microrganismos Endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. *Rev Biotecnol Cienc Desenvol.* 29: 62–76.
- Newsham, K. K. (2011): A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist* 190: 783–793.
- Nezhad, A. S. (2014): Future of portable devices for plant pathogen diagnosis. *Lab on a Chip* 14: 2887–2904.
- O'Dell T. E., Massicotte H. B., Trappe J. M. (1993): Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. *New Phytologist* 124: 93–100.
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., Pereira, R. M. (2008): *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of invertebrate pathology* 98: 267–270.
- Pascholati S. F., Dalio, R. J. D., Filho J. A. C., Brand, S. C., Pinto, L. R., Osswald, W. (2012): *Piriformospora indica*—Indutor de Resistência Em Plantas Contra Patógenos. In *Anais da VI Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*; Editora UFV: Viçosa, Brazil, pp. 79–112.
- Pennisi, E. (2003): Fungi shield new host plants from heat and drought. *Science* 301: 1466.
- 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: 100.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., Bakker, P. A. (2014): Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology* 52: 347–375.
- Pileggi, S., Oliveira, S., Andrade, C., Vicente, V., Dalzoto, P., Cruz, G., Gabardo, J., Massola, N., Tozze, H., Pileggi, M., Kava, V., Galli-Terasawa, L., Pimentel, I., Stringari, D., Glienke, C. (2009): Molecular and morphological markers for rapid distinction between 2 *Colletotrichum* species. *Canadian journal of microbiology* 55: 1076–1088.
- Pimentel, M. R., Molina, G., Dionísio, A. P., Maróstica Junior, M. R., Pastore, G. M. (2011): The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology research international* 2090–3138.

- Porter, J. K., Bacon, C. W., Robbins, J. D., Himmelsbach, D. S., Higman, H. C. (1977): Indole alkaloids from *Balansia Epichloë* (Weese). *Journal of agricultural and food chemistry* 25: 88–93.
- Pryce, T. M., Palladino, S., Kay, I. D., Coombs, G. W. (2003): Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Medical mycology* 41: 369–381.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., Henson, J. M. (2002): Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science (New York, N.Y.)* 298: 1581.
- Reinecke, P. (1978): *Microdochium bolleyi* at the stem base of cereals / *Microdochium bolleyi* an der Halmbasis von Getreide. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection* 85: 679–685.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* 245: 154–160.
- Roberts, C., Andrae, J. (2004): Tall Fescue Toxicosis and Management. *Crop Management* 3: 1–18.
- Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y. O., Redman, R. S. (2008): Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME journal* 2: 404–416.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E. and Redman, R. S. (2009): Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M. (2013): Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Current issues in molecular biology* 15: 25–38.
- Rojas, E. C., Jensen, B., Jørgensen, H. J. L., Latz, M. A. C., Esteban, P., Ding, Y., Collinge, D. B. (2020)a: Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against *Fusarium* head blight in wheat. *Biological Control* 144: 104222.
- Rojas, E. C., Sapkota, R., Jensen, B., Jørgensen, H., Henriksson, T., Jørgensen, L. N., Nicolaisen, M., Collinge, D. B. (2020)b: *Fusarium* Head Blight Modifies Fungal Endophytic Communities During Infection of Wheat Spikes. *Microbial ecology* 79: 397–408.
- Rollins, L., Coats, K., Elliott, M., Chastagner, G. (2016): Comparison of five detection and quantification methods for *Phytophthora ramorum* in stream and irrigation water. *Plant Disease* 100: 1202–1211.
- 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: 169–182.
- Ruiz-Villalba A., Ruijter J.M., van den Hoff M. J. B (2021): Use and Misuse of C<sub>q</sub> in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life* 11: 496.
- Saikkonen K., Wäli P.R., Helander M. (2010): Genetic Compatibility Determines Endophyte-Grass Combinations. *PLOS One* 5: e11395.
- Saikkonen, K., Helander, M., Faeth, S. H., Schulthess, F., Wilson, D. (1999): Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of *Neotyphodium* endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia* 121: 411–420.
- Saikkonen, K., Ion, D., Gyllenberg, M. (2002): The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proceedings. Biological sciences* 269: 1397–1403.
- Salt, G.A. (1977): Survey of fungi in cereal roots at Rothamsted, Woburn and Saxmundham, 1970–75. *Rep Rothamsted Exp Stn., Part 2*, pp. 153–168.
- Sankaran, S., Mishra, A. R., Ehsani, R., Davis, C. (2010): A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture* 72: 1–13.
- Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L. N., O'Hanlon, K. A., Nicolaisen, M. (2015): Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytologist* 207: 1134–1144.

- Selosse, M. A., Le Tacon, F. (1998): The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in ecology & evolution* 13: 15–20.
- Serfling, A., Wirsal, S. G. R., Lind, V., Deising, H. B. (2007): Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. *Phytopathology* 97: 523–531.
- Shade, A., Jacques, M. A., Barret, M. (2017): Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current opinion in microbiology* 37: 15–22.
- Shadmani, L., Jamali, S., Fatemi, A. (2018): Biocontrol activity of endophytic fungus of barley, *Microdochium bolleyi*, against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Mycologia Iranica* 5: 7–14.
- Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., Lee, I. J. (2018): What Is There in Seeds? Vertically Transmitted Endophytic Resources for Sustainable Improvement in Plant Growth. *Frontiers in plant science* 9: 24.
- Schlatter, D. C., Yin, C., Hulbert, S., Paulitz, T. C. (2020): Core Rhizosphere Microbiomes of Dryland Wheat Are Influenced by Location and Land Use History. *Applied and environmental microbiology* 86: e02135–19.
- Scholthof, K., Irigoyen, S., Catalan, P., Mandadi, K. K. (2018): *Brachypodium*: A Monocot Grass Model Genus for Plant Biology. *The Plant cell* 30: 1673–1694.
- Sibley, C. D., Peirano, G., Church, D. L. (2012): Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12: 505–521.
- Sieber, T. N., Grünig, C. R. (2013): in Eshel, A., Beeckman, T. (ed.) *Plant Roots: The hidden half*, pp. 1–49, CRC Press.
- Sieber, T., Riesen, T. K., Muller, E., Fried, P. M. (1988): Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. and germ. = *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of Phytopathology* 122: 289–306.
- Smith S. E., Read, D. (2008): 11 - Ericoid mycorrhizas, *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition), pp. 389–418, Academic Press.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J., Relichová, J., Doškař, J., Fajkus, J., Hořín, P., ... & Relichová, J. (2017). *Genetika*. Masarykova univerzita.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004): Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of natural products* 67: 257–268.
- Sun, X., Guo, L. D. (2012): Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques, *Mycology* 3: 65–76.
- Sun, X., Guo, L. D., Hyde, K. D. (2011): Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal diversity* 47: 85–95.
- Sun, X. G., Tang, M. (2012): Comparison of four routinely used methods for assessing root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany* 90: 1073–1083.
- Surono, Narisawa, K. (2017): The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of asparagus officinalis growth. *Fungal Ecology* 28: 1–10.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J. (2005): *Metody molekulární biologie*, 1st ed. Brno: Masarykova univerzita, 194 pp.
- Tao, G., Liu, Z. Y., Hyde, K. D., Lui, X. Z., Yu, Z. N. (2008): Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (*Orchidaceae*). *Fungal Divers* 33: 101–112.
- Tellenbach, C., Grünig, C. R., Sieber, T. N. (2010): Suitability of quantitative real-time PCR to estimate the biomass of fungal root endophytes. *Applied and environmental microbiology* 76: 5764–5772.

- The International Brachypodium Initiative (2010): Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463: 763–768.
- Thom E. R., Popay A. J., Hume D. E., Fletcher L. R. (2012): Evaluating the performance of endophytes in farm systems to improve farmer outcomes e a review. *Crop and Pasture Science* 63: 927–943.
- Tör, M., and Woods-Tör, A. (2017): Fungal and oomycete diseases. In: Thomas B., Murray, B. G., Murphy D. J. (ed.) *Encyclopedia of applied plant sciences*, pp. 77–82, Academic Press., NY.
- Vallad, G. E., Goodman, R. M. (2004): Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science* 44: 1920–1934.
- Van Loon L.C. (2000): Systemic Induced Resistance. In: Slusarenko A. J., Fraser R. S. S., van Loon L. C. (ed.) *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, pp. 521–574, Springer, Dordrecht.
- Varga, S., Soulsbury, C.D. (2019): Arbuscular mycorrhizal fungi change host plant DNA methylation systemically. *Plant Biology Journal* 21: 278–283.
- Vega, F.E., Posada, F.J., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S.A. (2008): Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72–82.
- Vilgalys, D., Gonzalez, D. (1990): Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current genetics* 18: 277–280.
- Visalakchi, S., Muthumary, J. (2010): Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: an overview. *International journal of pharma and bio sciences* 1: 1–9.
- Vogel, J., Hill, T. (2008): High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant cell reports* 27: 471–478.
- Walsh, K., Korimbocus, J., Boonham, N., Jennings, P., Hims, M. (2005): Using real-time PCR to discriminate and quantify the closely related wheat pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula acufomis*. *Journal of Phytopathology* 153: 715–721.
- Wang C. J. K., Wilcox H. E. (1985): New species of ecdomycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi: *Phialophora findlandia*, *Chloridium paucisporum* and *Phialocephala fortinii*. *Mycologia* 77: 951–958.
- Wang, Y., Dai, C. C., Zhao, Y. W, Peng, Y. (2011): Fungal endophyte-induced volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea* plantlets is mediated by nitric oxide, salicylic acid and hydrogen peroxide. *Process Biochemistry* 46: 730–735.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. T. (ed.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322, Academic Press Inc., NY.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey, S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 653
- Wirsel, S. G. R, Leibinger, W., Ernst, M., Mendgen, K. (2001): Genetic Diversity of Fungi Closely Associated with Common Reed. *New Phytologist* 149: 589–598.
- Yang, S., Rothman, R. E. (2004): PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet. Infectious diseases* 4: 337–348.
- Yoo, J. J, Eom A. H. (2012): Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated from Needle Leaves of Conifers in Bohyeon Mountain, Korea. *Mycobiology* 40: 231–235.
- Young C. A., Tapper B. A., May K., Moon C. D., Schardl C. L., Scott B. (2009): Indole-diterpene biosynthetic capability of *Epichloë* endophytes as predicted by ltm gene analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2200–2211.

- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. A., Mills, D. A., Martin, G., Taghavi, S., van der Lelie, D., Gilbert, J. A. (2015): The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* 6: e02527–14.
- Zhang, P., Zhou, P. P., Yu, L. J. (2009): An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3. *FEMS microbiology letters* 293: 155–159.
- Zhang, W., Krohn, K., Draeger, S., Schulz, B. (2008): Bioactive isocoumarins isolated from the endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *Journal of natural products* 71: 1078–1081.
- Zhong, S., Ali, S., Leng, Y., Wang, R., Garvin, D. F. (2015): *Brachypodium distachyon*-*Cochliobolus sativus* Pathosystem is a New Model for Studying Plant-Fungal Interactions in Cereal Crops. *Phytopathology* 105: 482–489.
- Zhou, Y., Bradshaw, R. E., Johnson, R. D., Hume, D. E., Simpson, W. R., Schmid, J. (2014): Detection and quantification of three distinct *Neotyphodium lolii* endophytes in *Lolium perenne* by real time PCR of secondary metabolite genes. *Fungal biology* 118: 316–324.
- Zhu, H., Wen, F., Li, P., Liu, X., Cao, J., Jiang, M., Feng, M., Chu, Z. (2014): Validation of a reference gene (BdFIM) for quantifying transgene copy numbers in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *Applied biochemistry and biotechnology* 172: 3163–3175.

#### **Internetové zdroje:**

- Metody stanovení kolonizace kořenů, 2001. Mykorhizní symbiózy (cvičení) [online] [navštíveno dne 19. 4. 2022]  
Dostupné z: [https://www.sci.muni.cz/~mykorri/html/index\\_practice.htm](https://www.sci.muni.cz/~mykorri/html/index_practice.htm)
- Cibulka, R. (2013). *Agrostis stolonifera* L. – psineček výběžkatý / psineček poplázový. *Botany.cz* [online]  
[navštíveno dne 19. 4. 2022]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/agrostis-stolonifera/>