

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Vliv půdní houbové mikroflóry na dormanci a klíčení semen
bobovitých rostlin**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Zientková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Zientková
Název práce	Vliv půdní houbové mikroflóry na dormanci a klíčení semen bobovitých rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra botaniky
Vedoucí práce	prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	<p>Semena rostlin se často vyznačují existencí klidového stavu, dormance. Správné načasování okamžiku klíčení je velmi důležité, obzvláště v prostředí vyznačujícím se sezónní periodicitou, jako jsou pouštní a polopouštní oblasti. Mimo dostatku vody a vhodné teploty jsou pro ukončení dormance důležité také biotické faktory, jako je složení půdní mikroflóry. O těchto je však s výjimkou některých studovaných druhů rostlin známo jen velmi málo. Houby jsou v půdě všudypřítomné a mohou ovlivnit přežití semen a to jak negativně, dekompozicí, nebo naopak kladně, napomáhajíc klíčení. Houby mohou přispět k narušení tvrdého osemení a snížit tak mechanickou a chemickou bariéru klíčení.</p> <p>Cílem této práce je přispět k porozumění vztahu mezi půdními houbami a semeny bobovitých rostlin vyznačujícími se fyzikálním typem dormance.</p>
Klíčová slova	Dormance, houby, hrách, klíčení, osemení, semena
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Zientková
Title of thesis	Influence of soil fungi on legume seed dormancy and germination
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>Plant seeds are often characterised by the existence of a dormant state, dormancy. The correct timing of the moment of germination is very important, especially in environments characterised by seasonality, such as desert and semi-desert areas. In addition to sufficient water and suitable temperature, biotic factors such as the composition of the soil microflora are also important for dormancy to be completed. However, very little is known about these except for some of the plant species studied. Fungi are ubiquitous in the soil and can affect seed survival either negatively, by decomposition, or positively, by aiding germination. Fungi can contribute to the disruption of hard seed coat and thus reduce the mechanical and chemical barrier to germination.</p> <p>The aim of this work is to contribute to the understanding of the relationship between soil fungi and seeds of legume plants characterized by a physical type of dormancy.</p>
Keywords	Seed dormancy, fungi, seeds, germination, seed coat
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za odborného vedení prof. Ing. Petra Smýkala, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....
Tereza Zientková

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za mnoho užitečných rad, konzultací a času, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D. za poskytnutí vybraných kmenů půdních hub. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za trpělivost a pochopení v době, kdy tato práce vznikala.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1 Dormance	9
2.1.1 Rozdělení dormance semen.....	9
2.1.2 Mechanismy dormance semen	9
2.2 Semena a půdní semenná banka.....	10
2.3 Semeno hrachu setého (<i>Pisum sativum</i>).....	12
2.4 Půdní houby	14
2.4.1 Právě půdní houby	14
2.4.1.1 Ascomycota (vřeckovýtrusné)	14
2.4.1.2 Basidiomycota (stopkovýtrusné).....	15
2.4.2 Stručný popis použitých izolátů půdních hub	15
2.5 Obrana semen proti půdním houbám	16
2.5.1 Fyzikální mechanismy obrany semen	17
2.5.2 Chemické a biochemické mechanismy obrany semen.....	17
2.5.4 Obranné enzymy semen	17
2.5.4.1 Polyfenoloxidáza.....	18
2.5.4.2 Lakáza	18
2.6 Vliv půdních hub na přerušení dormance semen	18
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
3.1 Rostlinný materiál	20
3.2 Materiál a metodika.....	22
3.2.1 Použité chemikálie a roztoky	22
3.2.2 Použité přístroje a nástroje	22
3.2.3 Příprava média	23

3.2.4 Naočkování půdních hub.....	23
3.2.5 Výsev semen	23
3.2.6 Hodnocení bobtnání a klíčení.....	24
3.2.7 Testování životaschopnosti semen.....	24
3.2.8 Řezy na kryomikrotomu a barvení vzorků.....	24
4 VÝSLEDKY	25
4.1 Inokulace semen hrachu – analýza bobtnání a klíčení.....	25
4.2 Anatomická analýza osemení.....	33
5 DISKUZE.....	41
6 ZÁVĚR	43
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44

1 ÚVOD

Dormance je běžnou strategií rostlin přizpůsobit se nepředvídatelným, drsným a nepříznivým podmínkám a prostředím. Jde o dočasné pozastavení fyziologických procesů. Semena takto setrvávají do doby, než dojde k příznivým podmínkám pro růst a přežití rostliny (Procházka, 1998). Stav dormance lze nalézt i u živočichů, větší význam má však u rostlin nebo řas a bakterií. V půdě semena mohou interagovat s mikroorganismy, které poté pomáhají při prolomení tohoto klidového období. Mezi tyto mikroorganismy řadíme zejména půdní houby.

Půdní houby jsou společně s půdními bakteriemi hlavními aktéry v procesu dekompozice organické hmoty. Jejich konkrétní interakce se semeny je velice různorodá. Jednou z nich může být například růst půdní houby na osemeni a následné narušení endokarpu. Tímto způsobem mohou výrazně snižovat mechanickou odolnost semene při klíčení semen s fyziologickým typem dormance.

Kromě pozitivního vlivu na porušení dormance semen a urychlení tak klíčení mají mikroorganismy v půdě také negativní vliv. Taková situace většinou vede k úplnému usmrcení semene. Tak jako vše v přírodě si tedy i semena vzájemným soužitím s patogeny vyvinula obranné mechanismy proti nim (Prokop, 2009). Jde o velké množství důkladně propracovaných a složitých mechanismů s cílem zabránění vniknutí patogenů do semen. Jde o mechanismy fyzikální, chemické i biochemické (Pollard, 2018).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Dormance

Pojmem dormance označujeme stav, při kterém dochází k přechodnému zastavení či omezení fyziologických procesů v organismu (Procházka, 1998). Jde o obecnější stav, který zahrnuje i např. klidový stav pupenů. Hlavním důvodem, proč k takovému stavu dochází, je snaha o přežití organismu. Dormance se vyskytuje jak u některých živočichů, především však u rostlin, řas a bakterií. Rostliny, které tohoto stavu využívají, brání semenům, aby všechna vyklíčila současně. Tím zabrání možnému úhynu zranitelné klíčící rostliny v důsledku nepříznivých podmínek (např. nevhodný průběh počasí, krátká doba slunečního záření, pokles teploty nebo především nedostatek vody). Pro ukončení dormance jsou tedy nutné vhodné podmínky, které jsou velmi často odlišné, než pro rostlinu samotnou (např. potřeba zaplavení nebo průchodu trávícím traktem). Může se jednat o faktory abiotické (vhodná teplota, dostatek vody) i biotické (složení půdní mikroflóry). Z tohoto důvodu vzniká více bloků klíčení, které se vyvinuly jako přizpůsobení se různým typům klimatu a prostředí, ve kterých působí. Díky dormanci mohou semena přežívat také různé přírodní katastrofy (Finkelstein a kol., 2008). Semena jsou schopna v dormanci setrvat rok ale i několik desítek až stovek let, v extrémních případech až tisíc let. V půdě tak dochází k hromadění nevyklíčených semen (vzniku půdní semenné banky – viz níže), která se ve vegetaci objeví okamžitě po záplavách, požárech nebo po dalším narušení.

2.1.1 Rozdělení dormance semen

Dormanci semen je možno rozdělit na dva typy. Jedná se o dormanci exogenní a endogenní. Dormance exogenní bývá způsobena vnějšími podmínkami zárodku semene. Příkladem tohoto typu dormance je například situace, kdy je osemení příliš odolné vůči průniku vody do semene a tím je zabráněno klíčení. K dormanci endogenní dochází v důsledku chemických změn uvnitř zárodku semene. Důvodem může být například nedostatečný vývin embrya nebo hormonální regulace.

2.1.2 Mechanismy dormance semen

U dormance lze rozlišit několik mechanismů. Prvním z nich je dormance **fyzikální**. Závisí na vývoji vrstev palisádových buněk v semeni nebo obalu, které jsou nepropustné pro vlhkost. V případě narušení fyzikální dormance dochází k chemickému nebo

mechanickému narušení osemení. K zahájení klíčení je nutné, aby se voda dostala do semene. Podmínkou klíčení semen u fyzikální dormance je tedy narušení palisádového parenchymu.

U druhů rostlin s **morfologickou** dormancí se vyskytují semena s nevyvinutým ne zcela diferenciovaným embryem. K vyklíčení semene je potřeba, aby embryo dostatečně dorostlo. Embrya semen s tímto typem nepotřebují většinou specifické podmínky, aby došlo k jejich vyklíčení, ale spíše časovou prodlevu mezi uvolněním semen z rostliny a dozráním embrya. Morfologická dormance je nejčastější u semen s lineárním a rudimentálním embryem.

Dalším mechanismem je dormance **fyzilogická**. Je způsobena fyziologickými inhibičními mechanismy semene. Hlavními reagujícími činiteli jsou kyselina abscisová (ABA) a gibereliny (GA). Jde o dva rostlinné hormony, které mají vůči sobě opačně postavené funkce – ABA dormanci indukuje, zároveň zabraňuje předčasnému klíčení (aby nedošlo k jevu, kdy dojde ke klíčení na mateřské rostlině), GA naopak zahajují klíčení. V semenech je obsažena jak ABA, tak GA. Kdy dojde k ukončení dormance a počátku klíčení tedy udává poměr těchto hormonů v rostlině. U mnoha rostlinných druhů bylo prokázáno ovlivnění dormance pomocí etylénu. Tento rostlinný hormon snižuje citlivost semen k ABA a dochází tak k ukončení dormance.

Čtvrtým typem je dormance **morfo-fyzilogická**. Jedná se o kombinaci dormance fyziologické a morfologické. Semena mají nedostatečně vyvinutá embrya a zároveň jsou ovlivněna fyziologickými podmínkami. K ukončení tohoto typu dormance jsou nutná ošetření (např. studená nebo teplá stratifikace, aplikace GA). Tento typ dormance se vyskytuje nejčastěji u semen, která mají lineární a primitivní embrya.

Kombinovaná dormance je spojením fyzikální a fyziologické dormance.

2.2 Semena a půdní semenná banka

Pojmem půdní semenná banka je označován soubor živých semen, který se nachází v půdě (Kůrová, 2014). Jedná se tedy o semena, která nevyrostou a nevyklíčí okamžitě po vysemenění. Rostliny si tímto zajišťují, že přetrvají na daném stanovišti i přes nepříznivé situace. Pokud tedy danou oblast zasáhnou například povodně či požáry, rostliny se mohou znovu objevit díky semenné bance.

Mezi nejvýznamnější faktory, díky kterým dochází ke vzniku semenné banky, patří činnost půdních živočichů (Kůrová, 2014). Tito živočichové vytvářejí v půdě velké množství skulin a pórů, které umožňují semenům zapadnout do půdy. Dalším faktorem

je například mikrotopografie terénu. Pro zachycení semen jsou výhodnější nerovné povrchy, které semena lépe zachytí. Důležitý je také tvar a velikost semene. Větší semena se do půdy dostávají obtížněji, zároveň jsou také větším lákadlem pro konzumenty. Semenná banka tedy obsahuje převážně drobnější semena, která jsou případnými konzumenty přehlédnuta a zároveň menší semena lépe zapadnou mezi jednotlivé fragmenty půdy.

Soubor semen, který vytváří půdní semennou banku, se vyznačuje různým stářím a různými vlastnostmi (Kůrová, 2014). Semena se do půdy dostávají každoročně nejen z místní populace, ale také přesunem ze vzdálenějších míst a stanovišť. Díky tomu semenná banka obsahuje semena různého genetického původu, což umožňuje zachování genetické variability. Tento aspekt může mít zásadní význam při ztrátě populace vlivem nepříznivých podmínek. Zároveň jsou tak genotypy uchovány v půdě po různě dlouhou dobu a slouží tak jako „evoluční paměť“ (semena různého původu a stáří) dané populace.

Je samozřejmé, že složení půdní semenné banky je v lesích výrazně odlišné od složení semenné banky, která se nachází v mokřadech. Právě mokřady jsou počtem semen nejobsáhlejší, lesy jsou oproti nim o poznání chudší. Co se druhového složení týče, převládá vždy pouze několik druhů (běžně se stává, že 10 druhů tvoří kolem 70 % semen celého obsahu půdní banky). Jak již bylo zmíněno, v semenné bance se nevyskytují pouze lokální druhy semen, ale i z okolních stanovišť, které se na místo dostaly buď vlivem vody, větru, živočichů, nebo například s hnojivem.

Kromě již zmíněných kladných stránek půdní semenné banky (zachování genetické variability, znovuoživení rostlinných druhů např. po přírodních katastrofách) je zde také negativní význam, a to zejména v podobě plevelů. Likvidace a vypořádávání se s jednoletými plevelely je totiž v zemědělství problémem, který výrazně ovlivňuje úrodnost a kvalitu plodin (Pollard, 2018). Plevelé je tedy nutné redukovat, protože např. v americkém zemědělství mají plevele na svědomí ztrátu 12 % z celkového výnosu za rok, což odpovídá částce 33 miliard dolarů ročně na produkci plodin (Pimentel a kol., 2005). Co se týče hubení plevelů, jde o velmi drahou záležitost – na herbicidní hubení plevelů se u amerických plodin využije částka až 7 miliard dolarů ročně.

Z tohoto důvodu je regulace semen plevelných druhů rostlin velmi důležitá. Bez kontroly a důkladné redukce plevelů by hustota těchto semen v půdě rostla, což by mělo za následek ještě větší ztráty úrody. Regulace plevelů je uskutečňována zejména v raných fázích vývoje plodiny, kdy je výnos plodiny nejvíce ovlivnitelný. Plevelé, které jsou přítomny v půdě i později během sezóny jsou však také schopny produkovat

životaschopná semena, která způsobují velké problémy v průběhu dalších let (Gallandt, 2006). Regulaci lze provést pomocí již zmíněných herbicidů, nebo také pomocí mikrobů. Půdní mikrobi mohou ovlivňovat klíčení a vývoj semen. Mohou způsobovat také samotný rozklad pomocí pronikání hyf do semene. Velké množství mikrobiálních druhů je schopno způsobovat mortalitu semen v půdě. Nejlépe prozkoumán byl pravděpodobně rozklad semen pomocí hub. Bylo testováno velké množství druhů půdních hub na různých druzích semen, např. *Ascomycota* – rozklad semen aksamitníků, *Pyrenophora semeniperda* – rozklad semen travních plevelů, *Fusarium avenaceum* – rozklad semen divokého ovsa (Pollard, 2018).

2.3 Semeno hrachu setého (*Pisum sativum*)

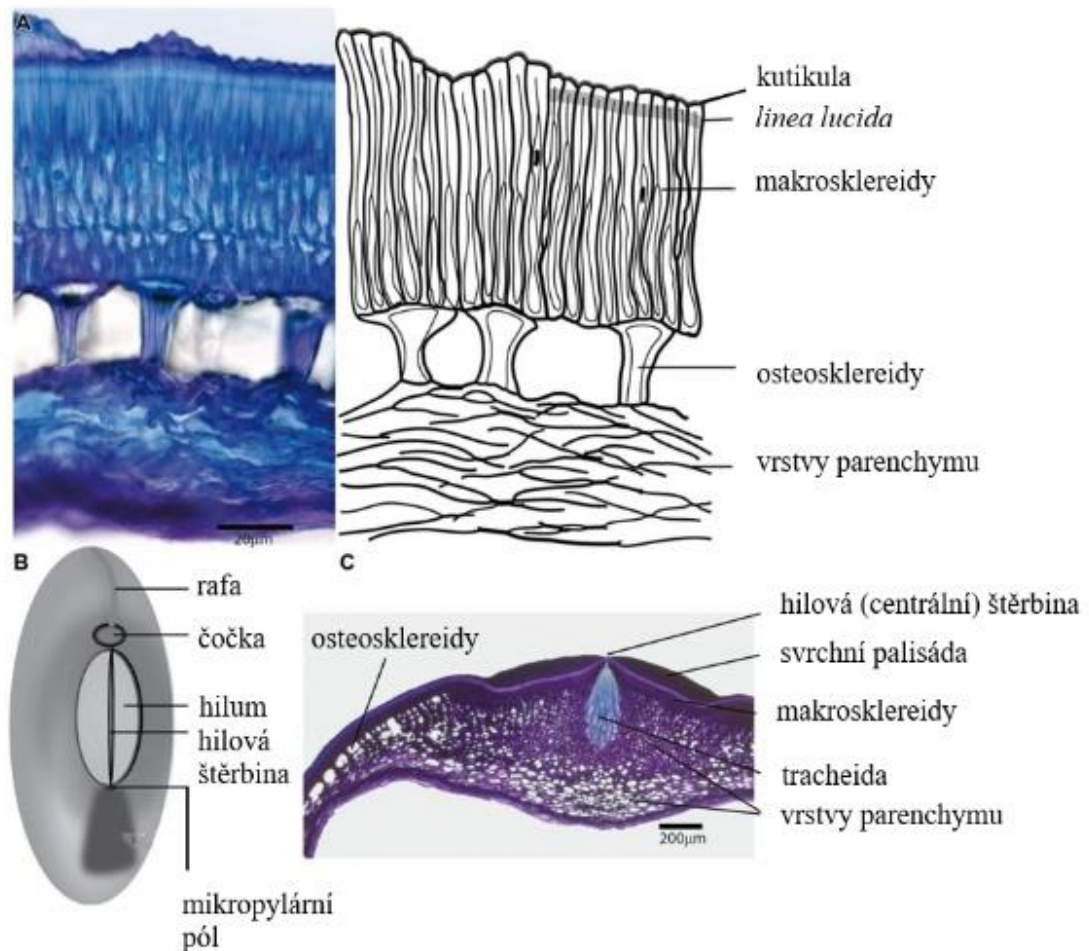
Semeno se vyvíjí z oplozeného vajíčka a většinou se skládá z následujících částí: embrya, živné tkáně endospermu (toto je v případě semen bobovitých druhů omezeno jen na časná stádia vývoje) a osemení, které bude podrobněji popsáno níže.

Osemení má velmi důležitou funkci – ochránit embryo a endosperm proti poškození. Představuje tak ochrannou bariéru mezi vnitřkem semene, tedy embryem, a vnějším prostředím. Osemení vzniká z vnějšího a vnitřního integumentu. Bývá většinou nepropustné pro vodu a plyny – na povrchu buněk se vyskytuje kutikula, která poskytuje semenu mechanickou i fyziologickou ochranu.

Osemení je typicky složeno ze čtyř vrstev – kutikula, epidermis, hypodermis a vnitřního parenchymu (viz obr. 1A). Epidermis je tvořena jedinou vrstvou palisády radiálně prodloužených makroklereid (Smýkal a kol., 2014). Ty mají silně a nerovnoměrně ztlustlé buněčné stěny. Oblast, která se nachází mezi terminálními čepičkami makroklereid a jejich bazální částí, se nazývá *linea lucida*. Vzhledem k odlišnému chemickému složení zde dochází k optickému lomu světla. Síla této linie zřejmě souvisí s nepropustností vody (Hradilová a kol., 2017, Jánská a kol. 2019). Vrstva pod epidermis se skládá z osteosklereid (sloupcové buňky). V této vrstvě se nachází velké množství mezibuněčných prostor, které jsou vyplněny vzduchem. Parenchymatická vrstva má významnou funkci v průběhu embryonálního vývoje, proto je tato vrstva také nazývána jako „živná vrstva“ (Van Dongen a kol., 2003). Tuto vrstvu tvoří chlorchym (buňky s chloroplasty), spodní parenchym a větvený parenchym.

Na povrchu semen je několik specifických útvarů. Jedním z nejvýraznějších je hilum (pupek) (viz obr. 1C), výrazná oválná jizva, která se nachází na chalazálním pólu semene. Jde o pozůstatek spojení semeníku s mateřskou rostlinou pomocí poutka

(funikulus). V palisádové vrstvě hila se nachází hilová (centrální) štěrbina, která se otevírá při nízké vlhkosti a umožňuje tak vysychání semene. Naopak při vysoké vlhkosti se hilová štěrbina uzavírá a brání tak absorpci vlhkosti (Smýkal a kol., 2014).



Obrázek 1: Struktura osemení bobovitých rostlin. (A) Příčný řez osemením *Pisum sativum* (vlevo) se schématickým nákresem (vpravo). Ve svrchní části makroklereid se nachází *linea lucida*. Vrstva pod makroklereidami je složená z osteosklereid. Oblast nejvíce uvnitř osemení je tvořena vrstvou parenchymatických buněk. (B) Schéma morfologie osemení bobovitých rostlin s nejdůležitějšími strukturálními znaky. (C) Příčný řez osemením *Pisum sativum* v oblasti hila. Nejsvrchnější vrstva se nazývá svrchní palisáda. Pod ní se nachází makroklereidy a následně vrstvy parenchymu (převzato z Smýkal a kol., 2014).

2.4 Půdní houby

Pojmem půdní houby označujeme všechny druhy hub, které žijí v půdě a lze je rozdělit do mnoha ekologických skupin. Jedná se o skupiny - parazitických hub (parazitují na rostlinách, živočiších i jiných houbách), rhizosférních (žijí v blízkosti kořenů rostlin), rhizopláních (žijí přímo na povrchu kořenů rostlin), houby-predátoři („loví“ živočichy, jako jsou např. háďátka nebo hlístice do svých pastí ve tvaru sítí a ok), koprofilní houby (žijí na exkrementech živočichů) a pravé půdní houby, saprofytní mikroskopické vláknité houby a bazidiomycety, kterým se budeme věnovat v následujících kapitolách (Nováková, 2017).

2.4.1 Pravé půdní houby

Společně s půdními bakteriemi jde o hlavní aktéry v procesu dekompozice organické hmoty. Během tohoto procesu dochází k postupnému rozkladu organických látek a následně k vzniku humusu. Půdní houby lze dále rozdělit podle toho, jakou látku jsou schopny využít (např. celulólytické, keratofilní nebo cukerné) (Nováková, 2021). Ke zjištění, jakým způsobem rozkládají houby organické látky, je nutná izolace a podrobné zkoumání jejich vlastností v laboratorních podmínkách. Při zkoumání rozkládání ligninu a humusových látek bylo zjištěno, že se těchto procesů účastní enzymy, jako jsou lakázy a peroxidázy (Baldrian, 2009).

Dalším dělením těchto hub může být systematické rozdělení na oddělení Ascomycota (askomycety, vřeckovýtrusné) a Basidiomycota (bazidiomycety, stopkovýtrusné).

2.4.1.1 Ascomycota (vřeckovýtrusné)

Mezi vřeckovýtrusné houby se řadí cca 60 000 druhů hub, což toto oddělení činí nejpočetnějším oddělením hub. Nejvýznamnějším znakem této skupiny je tvorba pohlavních orgánů a specializovaných jednobuněčných sporangií – vřecek (odtud pochází název samotného oddělení – vřeckovýtrusné). Ve vřecku vznikají výtrusy, zvané askospory. Houby se rozmnožují nepohlavně i pohlavně. Stélka vřeckovýtrusných hub je vláknitá s větveným přehrádkovaným myceliem. Hyfy hub mohou být buďto srostlé v nepravé pletivo (plektenchym) nebo mohou být volné. Hlavními složkami buněčné stěny těchto hub jsou polyglukany a chitin (Hibbett a kol., 2007).

Co se týče schopnosti rozkládat organické látky, houby z oddělení vřeckovýtrusných nejsou schopny rozkládat lignin a celulózu (v případě celulózy je

schopnost velice omezená). Naopak nízkomolekulární organické látky, jako např. organické kyseliny, lipidy, oligosacharidy jako je pektin či aminokyseliny, jsou houby schopny využívat velmi dobře. Houby rozloží tyto snadno dostupné látky a poté přežívají v půdě ve formě spor, dokud se v půdě neobjeví nový substrát (Baldrian, 2009).

Příkladem zástupců, které tato práce později detailněji přiblíží, jsou druhy *Fusarium* (srpatka), *Alternaria* (čerň), *Botrytis* (plíseň), *Penicilium* (štetičkovec), *Xylaria* (dřevnatka) a *Aspergillus* (kropidlák).

2.4.1.2 Basidiomycota (stopkovýtrusné)

Do oddělení stopkovýtrusných hub patří houby s typickými makroskopickými plodnicemi. Většina z nich je hospodářsky významná. Patří zde například *Trametes* (outkovka) nebo *Pleurotus* (hlíva). Stopkovýtrusné se od vřeckovýtrusných liší především nevytvářením morfologicky odlišných pohlavních orgánů. Stélka je tvořena, obdobně jako u vřeckovýtrusných hub, vláknitým přehrádkovaným myceliem. Buněčná stěna je obvykle tvořena několika tenkými, na sobě položenými vrstvami. Mezi hlavní složky tvořící buněčnou stěnu patří chitin a polyglukany (Hibbett a kol., 2007). Tyto houby rozkládají polysacharidy a lignin (obtížně získatelná velká zásoba energie).

2.4.2 Stručný popis použitých izolátů půdních hub

Fusarium solani je běžná fytopatogenní houba řadící se do oddělení Ascomycota. Vytváří bílé, plstnaté kolonie. *Fusarium solani* se vyskytuje v půdě po celém světě, zejména pak v tropických, subtropických a mírných pásech. Její výskyt je vázán na kořeny rostlin, objevuje se ale také v rybnících, řekách nebo vodovodních potrubích. Podílí se na onemocněních rostlin i člověka. Tato půdní houba způsobuje hnilobu kořenů hostitelské rostliny a způsobuje onemocnění u hospodářsky významných plodin, jako je hrách, paprika, dýně nebo brambory (Zhang a kol., 2006).

Alternaria chartarum patří do oddělení Ascomycota. Jedná se o všudypřítomný fytopatogenní druh. Spory se přenášejí vzduchem a nacházejí se v půdě, vodě nebo dokonce interiérech. Vytvářejí hnědě až černě zbarvené kolonie (Woudenberg a kol., 2013).

Botrytis cinerea je fytopatogenní pektinolytická mikroskopická houba, která na napadených rostlinách způsobuje plísně, vadnutí a hnilobu. Řadí se do oddělení Ascomycetes a vyskytují se převážně v mírném podnebném pásu. Tvoří šedé až černé kolonie. Infekce, které tato půdní houba způsobuje, patří mezi nejběžnější a

nejrozšířenější nemoci polních plodin a zeleniny na světě. Ve vlhkém prostředí způsobuje plíseň šedého zabarvení na ovoci i zelenině (nejznámější a nejčastěji se vyskytující je plíseň šedá u jahod). Za suchých podmínek se využívá ve vinařství – tzv. botrytizovaná vína. Enzymy, které *Botrytis cinerea* produkuje, způsobují změnu složení bobulí (zvýšení obsahu sacharidů a minerálů) (Staats a kol., 2005).

Penicillium chrysogenum je běžná vláknitá půdní houba patřící do oddělení Ascomycota. Roste ve vnitřních prostorech budov, které jsou poškozeny vodou, anebo také na zkažených potravinách. Tvoří modrošedé, bílé, někdy až hnědé kolonie. Jde o nejstudovanější rod čeledi *Penicillium* díky objevu penicilinu (β -laktamové antibiotikum) Alexandrem Flemिंगem. Tato půdní houba má tedy schopnost produkovat širokou škálu přírodních produktů - sekundárních metabolitů. Využití této schopnosti se uplatňuje zejména v biotechnologiích a farmacii (Guzmán-Chávez a kol., 2018).

Xylaria hypoxylon je dřevokazná houba, která se řadí do oddělení Ascomycety. Tuto houbu lze velice hojně nalézt na pařezech nebo spadlých větvích listnatých a jehličnatých stromů. Houba je rozšířená kosmopolitně, roste celoročně (Becker a kol., 2020).

Trametes versicolor je běžná polysporní houba, která se vyskytuje po celém světě. Roste běžně na kmenech nebo pařezech stromů. Řadí se do oddělení Basidiomyceta. Jde o známou tradiční léčivou houbu – výtažky z ní se používají v Číně, Japonsku a Koreji (Dou a kol., 2019)

Pleurotus ostreatus je dřevokazná houba řadící se mezi houby oddělené Basidiomyceta. Vyskytuje se na živých nebo odumřelých kmenech listnatých stromů. Jedná se o jedlou houbu, hojně využívanou v gastronomii. Využívá se také k léčebným účelům – *Pleurotus ostreatus* pozitivně ovlivňuje hladinu cholesterolu a zvyšuje odolnost proti infekcím (Thorn a kol., 1984).

2.5 Obrana semen proti půdním houbám

Tak jako vše v přírodě si i semena v půdní semenné bance vzájemným soužitím s patogeny vyvinula obranné mechanismy proti nim (Prokop, 2009). Jedná se o velké množství složitých a velice propracovaných mechanismů s cílem zabránění vniknutí patogenů do semen. Jde o mechanismy fyzikální, chemické i biochemické (Pollard, 2018).

2.5.1 Fyzikální mechanismy obrany semen

Mezi fyzikální obranné mechanismy můžeme zařadit husté ochlupení u některých semen a také silné obaly semen (osemení). Tyto mechanismy jsou důležité zejména u semen s dlouhodobou dormancí. Výsledky naznačují, že dormance chrání semena před napadením některými patogeny tím, že brání semenu vyklíčit. Ovšem ve chvíli, kdy semeno začne klíčit, se tato obrana ztrácí (Chen a kol., 2018).

2.5.2 Chemické a biochemické mechanismy obrany semen

Chemické obranné mechanismy zahrnují endogenní nízkomolekulární látky. Jedná se především o alkaloidy a fenolické látky. Tyto látky jsou přítomny již v semeni během vývoje a po interakci s patogeny se aktivují. Kupříkladu v osemení ječmene, který se vyvíjí, jsou přítomny flavonoidy. Jde o silné inhibitory *Fusarium spp.* Podobné příklady bychom našli i u ostatních obilných semen, u kterých je tento obranný mechanismus nejrozšířenější (Skadhauge a kol., 1997)

Biochemické mechanismy se od chemických značně liší, a to především ve využití vysokomolekulárních látek (bílkoviny a enzymy). Semena v půdní semenné bance zažívají velké výkyvy příznivých podmínek, ať už se jedná o střídání dostatku a nedostatku vody, změny teploty nebo různému složení půdní mikroflóry. Díky složitým biochemickým procesům jsou semena schopna setrvat v dormanci i po několik desítek let. Jde zejména o vysoce odolná semena plevelů, u nichž byla tato životaschopnost i po dlouhé době prokázána (Pollard, 2018).

2.5.4 Obranné enzymy semen

Velká část enzymů a proteinů se přímo podílí na obraně semen proti mikrobiálním patogenům. Výzkum Lászity (1999) ukazuje rozdělení pšeničných otrub na vnější, intermediální a vnitřní vrstvu, kdy v každé vrstvě zajišťují enzymy odlišné obranné funkce. Ve vnější vrstvě se nacházejí převážně enzymy související s obranou, které ovlivňují oxidační stres. Jde zejména o oxidázy a peroxidázy. Co se týče intermediální frakce, proteiny plnily velice podobné funkce, jako ve vnější vrstvě (tzn. funkce související s obranou a oxidačním stresem). Proteom v této vrstvě byl ovšem různorodější, než ve vnější vrstvě. Jsou zde přítomny také chitinázy a četné inhibitory houbových enzymů. Ve vnitřní vrstvě se rovněž nacházejí obranné enzymy, včetně chitináz a houbových inhibitorů (Pollard, 2018).

2.5.4.1 Polyfenoloxidáza

Polyfenoloxidáza (PPO) v širším pojetí zahrnuje tři enzymy – katecholázu, lakázu a tyrozinázu, podílejí se na oxidaci a následné polymeraci širšího spektra fenolických látek. PPO jsou velice různorodou skupinou enzymů, které se nacházejí v rostlinách, houbách i bakteriích. PPO oxidují fenolické sloučeniny na chinony. Společným znakem všech PPO je, že se jedná o metaloenzymy. Existuje několik možných způsobů, jak PPO napomáhá semenům bránit se proti houbám. Mezi tyto způsoby patří produkce toxických chinonů, snížení obsahu živin pomocí zesíťování molekul, lignifikace buněčných stěn nebo zapojení do tvorby reaktivních forem kyslíku (Pollard, 2018).

Tvorba PPO je indukována v semenech, která byla napadena houbovými patogeny. V experimentu byla provedena inokulace houby *Fusarium graminearum* na semena pšenice. V důsledku napadení houbou došlo ke zvýšení hladiny PPO. Tato hladina byla třikrát vyšší u rezistentních odrůd v porovnání s neinokulovanými kontrolami. To naznačuje, že indukce PPO v semenech pšenice by mohla být obrannou reakcí na napadení patogenem (Mohammadi a kol., 2002).

2.5.4.2 Lakáza

Enzym Lakáza obsahuje měď ve svém centru. Jejich funkcí je katalýza redukce kyslíku na vodu a zároveň i reakci opačnou – oxidace vody. Lakázy se vyskytují obvykle v rostlinách a houbách. Rostlinné lakázy se podílejí na radikálových mechanismech tvorby ligninových polymerů. Houbové lakázy mají širší úlohu, a to zejména co se týče morfogeneze, interakce mezi houbou a hostitelem nebo degradace ligninu (Baldrian, 2005).

2.6 Vliv půdních hub na přerušení dormance semen

Běžnou strategií rostlin přizpůsobit se nepředvídatelnému a drsnému prostředí je dormance. Semena dočasně pozastaví své fyziologické procesy a setrvávají do doby, než dojde k příznivým podmínkám pro růst a přežití rostliny (Procházka, 1998). V půdě však semena interagují s mikroorganismy, které mohou pomáhat při prolomení tohoto klidového období. Vliv mikroorganismů na ukončení dormance semen však není zcela novým tématem. Již v roce 1934 se objevují studie, která ukazuje, že mikroorganismy, konkrétně půdní houby, jsou pro klíčení semen nezbytné (Pfeiffer, 1934). Půdní houby rostou na osemení a narušují nebo způsobují praskání endokarpu. Tímto způsobem

mohou výrazně snižovat mechanickou odolnost semene při klíčení semen s fyziologickým typem dormance (Li a kol., 2019).

Experiment Delgado-Sánchez a kol. (2011) se zabýval testováním semen opuncie v suchém prostředí, tzn. pouštích a polopouštích. Testovaná semena byla různého stáří – jedna skupina semen byla čerstvě po dozrání, druhá skupina semen byla 9 let stará. V případě sterilizovaných semen obou skupin nebyla zjištěna žádná klíčivost. Oproti tomu klíčivost nesterilizovaných semen, které byly napadeny půdními houbami, byla mnohem vyšší, až 67% (u devítiletá semena) a 27% (u čerstvá semena). Tyto houbové kmeny byly izolovány, identifikovány a následně uměle naočkovány na semena. Inokulovaná semena měla podstatně vyšší klíčivost oproti kontrolám. U starších semen však byla klíčivost ještě vyšší, než u čerstvých. Bylo zjištěno, že tyto houbové kmeny narušily a snížily mechanickou odolnost poutka (Delgado-Sánchez a kol., 2011). Poutko (Funikulus) je zbytek stonku, kterým je semeno spojeno s placentou ve vaječníku a zastává tak funkci pupeční šňůry, která dodává semenu vodu a živiny z mateřské rostliny (Ayele a kol., 2009). Výsledky tohoto experimentu tedy dokazují, že se půdní houby podílejí na prolomení dormance semen. Účinek hub na semena je ovšem druhově specifický (Delgado-Sánchez a kol., 2011).

Eldredge (2007) provedl obdobný výzkum na semenech bobovité rostliny kozince (*Astragalus utahensis*), kdy tato semena vystavil působení půdních hub rodu *Alternaria* a *Aspergillus*. Pokusy prováděné ve skleníku odhalily pozitivní vliv houbových spor, kterými byla semena inokulována. Testy klíčivosti ukazují na významně zrychlenou klíčivost při ošetření osiva půdními houbami vybraných rodů. Kladná odezva byla zaznamenána také při polních pokusech, kdy kontrolní semena klíčila se 14,7% úspěšností, kdežto semena ošetřená sporami hub *Aspergillus* a *Alternaria* měla klíčivost 29,3% a 19,3%. Celkově z tohoto experimentu vyplývá, že rozdíly mezi ošetřeným a neošetřeným osivem jsou velké. Konkrétně u rodu *Aspergillus* osivo urychlilo klíčení o 35% a u rodu *Alternaria* dokonce až o 90% oproti kontrolnímu (neošetřenému) osivu (Eldredge, 2007).

Další výzkumy ukazují například působení *Streptomyces* na semena rýže, kdy tato půdní houba rovněž podporuje klíčivost (Koaze, 1957). U somatických embryí *Pinus sylvestris* bylo klíčení urychleno pomocí houby *Pisolithus tinctorius* (Niemi a kol., 2002).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Rostlinný materiál

V experimentální části byla použita semena různých vybraných genotypů hrachu setého (*Pisum sativum*).

- cv. **Arkta** (polní hrách - peluška) (SELGEN a.s., <https://selgen.cz>) semena vypěstovaná v polních podmínkách, sklizeň 2021

V případě tohoto genotypu se jedná o tzv. pelušku neboli hrách setý rolní. Jde o pigmentované polní hrachy, které se používají nejčastěji jako krmivo pro hospodářská zvířata. Arkta se vyznačuje dobrou přezimovací schopností a rychlým počátečním růstem. Jak již bylo výše zmíněno, jde o pigmentovaný typ hrachu, který se vyznačuje černou barvou hila. Arkta má funkční PPO gen.

- cv. **Arvika** (polní hrách - peluška) (SELGEN a.s., <https://selgen.cz>) semena vypěstovaná v polních podmínkách, sklizeň 2021

Stejně jako v případě genotypu Arkta, který byl popsán výše, se jedná o tzv. pelušku. Arvika je využívána na zelené krmení, senáž i zelené hnojení. Arvika je, stejně jako Arkta, pigmentovaným typem hrachu, avšak na rozdíl od Arkty se vyznačuje béžovou barvou hila. Arvika má rovněž funkční PPO gen.

- cv. **Trendy** (SELGEN a.s., <https://selgen.cz>) semena vypěstovaná v polních podmínkách, sklizeň 2021

Genotyp Trendy je nepigmentovaný typ hrachu. Semena jsou žlutá, elipsoidního tvaru. Semena se vyznačují velmi slabou dormancí, při kontaktu s vodou je dormance porušena obvykle do několika hodin. Nefunkční alela *ppo-1* genu.

- planý hrách, *Pisum sativum* subsp. *elatius* (**J11794**) (John Innes Pisum collection, Norwich, UK, <https://www.seedstor.ac.uk>) semena vypěstovaná ve skleníku katedry botaniky, PřF UP, sklizeň duben 2021.

Genotyp J11794 je typ planého hrachu. Tento genotyp se vyznačuje velmi silnou dormancí. Semena jsou menší velikosti, silné osemení, silně pigmentovaná. Funkční PPO gen.

- kulturní hrách *Pisum sativum* **J192** (polní hrách - peluška), krajová odrůda – Afghánistán, sklizeň 2021

Genotyp J192 je typ kulturního hrachu, který se řadí, stejně jako genotypy Arkta a Arvika, do skupiny polních hrachů, tzv. pelušek, z důvodu pigmentace osemení. Nefunkční PPO gen, alela *ppo-2*.

Semena byla uskladněna v sáčcích v laboratoři při teplotě přibližně 25°C.

Byly použity izoláty vybraných hub:

Alternaria chartarum CCF3421 (Sbírky CCF (Culture Collection of Fungi) - katedra botaniky PřF UK)

Aspergillus neoalliaceus CCF5433 (Sbírky CCF - katedra botaniky PřF UK)

Botrytis cinerea CCF3371 (Sbírky CCF - katedra botaniky PřF UK)

Fusarium solani CCF2967 (Sbírky CCF - katedra botaniky PřF UK)

Penicillium chrysogenum CCF1444 (Sbírky CCF - katedra botaniky PřF UK)

Pleurotus ostreatus CCBAS692 (Sbírka CCBAS - Mikrobiologický ústav AV ČR)

Trametes versicolor CCBAS612 (Sbírka CCBAS - Mikrobiologický ústav AV ČR)

Xylaria hypoxylon CCF3717 (Sbírky CCF - katedra botaniky PřF UK)

3.2 Materiál a metodika

3.2.1 Použité chemikálie a roztoky

V experimentální části byly použity následující chemikálie a roztoky:

Anilinová modř (CAS 61489-48-3)

Cryo-Gel (Leica, Švýcarsko, REF: 39475237)

Deionizovaná voda

Ethanol (70% a 96%)

Glycerol (20%)

ISORAPID spray (OCC, Švýcarsko, REF: CH-021013)

Malt extract agar Base (HIMEDIA, Česká republika, REF: M137-500G)

Soil extract agar (HIMEDIA, Česká republika, REF: M455-500G)

Toluidinová modř (CAS: 92-31-9)

3.2.2 Použité přístroje a nástroje

Analytické váhy

Autokláv

Filtrační papír (Whatman Grade 1, Cytiva, Čína, 17387984)

Kryomikrotom (Leica CM1950, 1491950C3EU)

Laminární box (Steril S.p.a., Helios 48, Itálie, 13485)

Lihový kahan

Mikroskop (Olympus CX31)

Pinzety

Termostat laboratorní ST2 (POL-EKO APARATURA, Polsko, 3227455)

3.2.3 Příprava média

Jednotlivé kmeny hub byly pěstovány na kultivačním médiu Soil extract agar (HIMEDIA, Česká republika, REF: M455-500G). Pro přípravu 1 l média bylo použito 34,25 g přípravku Soil extract agar, který obsahuje 1 g glukosy, 0,5 g hydrogenfosforečnanu draselného, 17,75 g půdního extraktu a 15 g agaru. Přípravek byl následně smíchán s 1 l deionizované vody. Roztok byl zamíchán a následně umístěn do autoklávu. Médium bylo ihned po vyjmutí z autoklávu rozlito v laminárním boxu na 90 mm Petriho misky, které byly následně zalepeny parafilmem a umístěny do lednice.

Pro uchování půdních hub bylo použito kultivační médium Malt extract agar Base (HIMEDIA, Česká republika, REF: M137-500G). Pro přípravu 1 l roztoku bylo použito 50 g přípravku Malt extract agar, který obsahuje 30 g sladového extraktu, 5 g mykologického peptonu a 15 g agaru. Přípravek byl následně smíchán s 1 l deionizované vody a poté umístěn do autoklávu. Ihned po vyjmutí z autoklávu bylo médium rozlito v laminárním boxu na Petriho misky a uskladněno v lednici.

3.2.4 Naočkování půdních hub

Pro každý vybraný druh půdní houby bylo v rámci jednoho pokusu vyhrazeno 12 Petriho misek. Pomocí aseptické techniky byla část půdní houby přeočkována z původní Petriho misky na Petriho misku s Soil extract agarem. Každá Petriho miska s nově naočkovanou půdní houbou byla následně pečlivě popsána, zalepena porézní fólií a uložena do inkubátoru. Zde byly uchovány po dobu 7 dní při 23°C.

3.2.5 Výsev semen

Pro každý experiment bylo použito 440 semen od každého genotypu. Semena byla sterilizována pomocí denaturovaného 70% ethanolu po dobu 10 minut. Následně byla semena promyta pomocí sterilní deionizované vody. Tento krok byl zopakován minimálně 3x. Semena byla poté pomocí sterilní pinzety uspořádána do kruhu na médium s příslušnou půdní houbou. Na každou misku bylo takto vysazeno 20 semen. 4 Petriho misky byly vyhrazeny pro kontrolní vzorky, to znamená, že semena byla vysazena na čistý Soil extract agar bez naočkované půdní houby. Každá miska byla poté řádně popsána, zalepena porézní fólií a umístěna zpět do inkubátoru, kde byla semena pěstována ve tmě při 23°C po dobu jednoho až dvou dní.

3.2.6 Hodnocení bobtnání a klíčení

Petriho misky byly kontrolovány a bylo zaznamenáváno případné bobtnání či následné klíčení semen. První 2 – 3 dny byl odečet prováděn denně, poté probíhal odečet každých 5 dní.

3.2.7 Testování životaschopnosti semen

Po 3 – 4 týdnech byla v případě genotypu JI1974 odebrána zbývající dormantní semena. Následně byla promyta ve sterilní deionizované vodě a nasazena do nových Petriho misek, které obsahovaly 2 vrstvy filtračního papíru Whatman Grade 1 dostatečně zvlhčené vodou. Petriho misky byly poté opět uloženy do inkubátoru (23°C). Následující dny bylo opět prováděno odečítání bobtnání a klíčení semen.

3.2.8 Řezy na kryomikrotomu a barvení vzorků

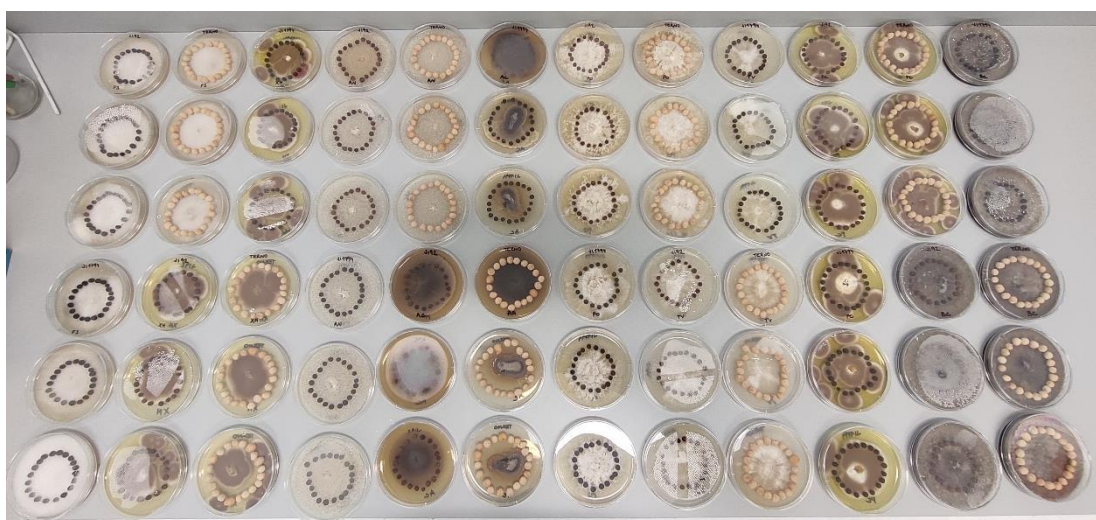
Vybraná testovaná semena nasazená na médiu s naočkovanou půdní houbou byla poté odebrána a nařezána na kryomikrotomu (Leica CM1950, 1491950C3EU). Byla vybrána vždy semena napadena půdní houbou (nabobtnaná), semena, která nevykazovala žádnou aktivitu a semena, která nebyla napadena patogenem (kontrolní vzorky). Ze semene byla odejmuta část osemení (poté i část osemení obsahující hilum), která byla následně vložena do Cryo-Gel (Leica, Švýcarsko, REF: 39475237), který byl nanesen na kovový terčík a následně umístěn do kryokomory. Vzorek byl zmrazen při teplotě -20°C a následně nařezán na řezy o tloušťce 5 µm. Jednotlivé řezy byly přeneseny na podložní sklo.

Řezy byly poté barveny dvojím způsobem. Jedna část vzorků byla nabarvena pomocí Anilinové modři, druhá část pomocí Toluidinové modři. U obou typů barvení byl postup totožný. Barevný roztok byl připraven navážením 0,5 g pigmentu a následným smícháním s 200 ml deionizované vody. Po důkladném promíchání byla barva nanesena na podložní sklo a ponechala se účinkovat – v případě Toluidinové modři 30 s, v případě Anilinové modři 5 minut. Poté byla barva opatrně odmyta pomocí pipety a deionizované vody. Následně byly vzorky zafixovány pomocí 20% glycerolu a překryty krycím sklíčkem. Takto nachystané vzorky byly později pozorovány pod mikroskopem, kde byly pořízeny také mikroskopické fotografie. Nakonec byla uskutečněna anatomická analýza osemení.

4 VÝSLEDKY

4.1 Inokulace semen hrachu – analýza bobtnání a klíčení

Na obrázcích 2 – 5 lze vidět kultivaci vybraných genotypů semen hrachu s jednotlivými kmeny půdních hub (doba kultivace s půdní houbou – 3 dny). Semena kulturního hrachu cv. Terno postrádají dormanci, proto lze zaznamenat bobtnání již po krátké době (viz obrázek 4). Oproti tomu semena planého hrachu JI1794 mají dormanci velmi silnou, zprostředkovanou nepropustným osemením. Z tohoto důvodu po tak krátké době kultivace (3 dny) ještě nelze zaznamenat bobtnání semen (viz obrázek 3). Genotyp JI92 se vyznačuje silnější dormancí než genotyp Terno, po 3 dnech však již lze zaznamenat pár nabobtnaných semen. Zároveň lze pozorovat semena již obrostlá půdní houbou *Aspergillus neoalliaceus* (viz obrázek 6). Na obrázku 7 již lze vidět klíčící semena planého hrachu po pětidenní kultivaci s příslušnými kmeny půdních hub.



Obrázek 2: Kultivace semen hrachu v přítomnosti jednotlivých kmenů půdních hub



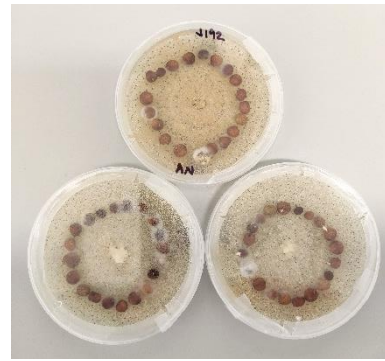
Obrázek 3: Kultivace semen hrachu JI1794 v přítomnosti *Penicillium chrysogenum*



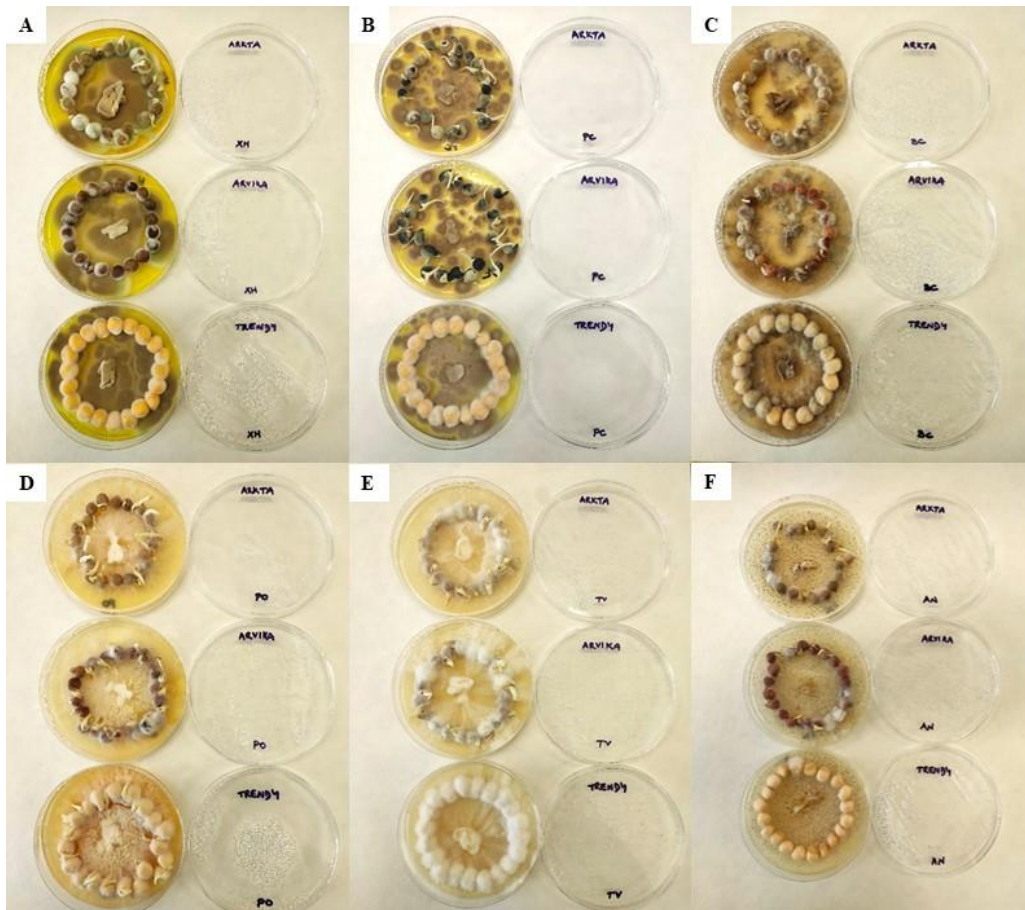
Obrázek 4: Kultivace semen hrachu cv. Terno v přítomnosti *Pleurotus ostreatus*



Obrázek 5: Kultivace semen hrachu cv. Terno v přítomnosti *Botrytis cinerea*



Obrázek 6: Kultivace semen hrachu JI92 v přítomnosti *Aspergillus neoalliaceus*

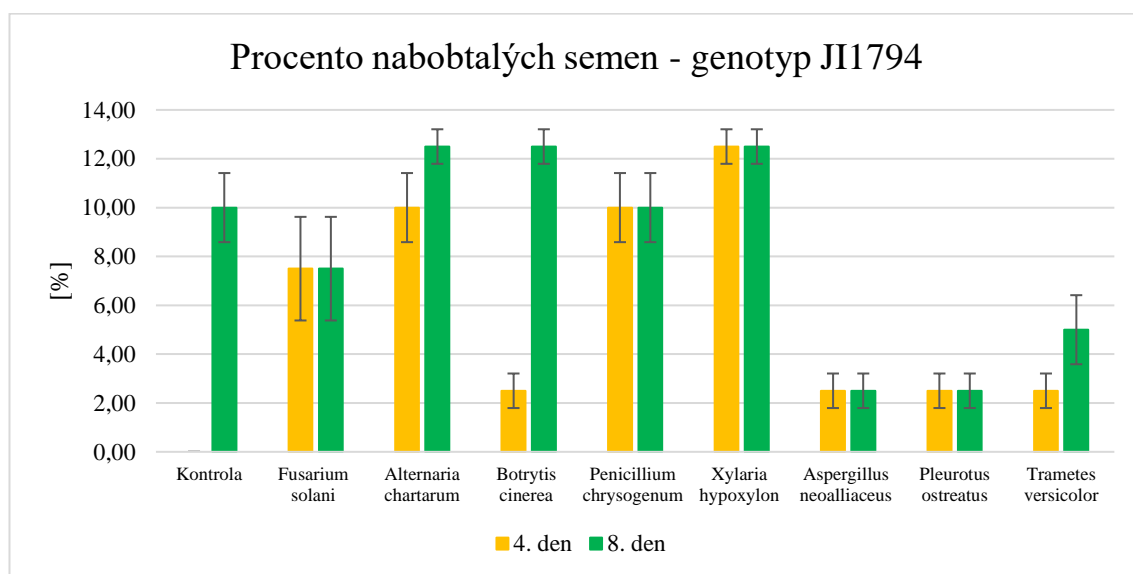


Obrázek 7: Kultivace semen hrachu setého (shora genotypy Arakta, Arvika, Trendy) s příslušnými kmeny půdních hub. Délka kultivace – 5 dní. (A) *Xylaria hypoxylon* (B) *Penicillium chrysogenum* (C) *Botrytis cinerea* (D) *Pleurotus ostreatus* (E) *Trametes versicolor* (F) *Aspergillus neoalliaceus*.

Byly uskutečněny tři experimenty. Nejprve byl sledován pouze planý hrách JI1794 (viz experiment 1). Cílem bylo narušení osemení působením hub, projevující se propustností, následně bobtnáním a nakonec přerušáním dormance. Později byly do testování zahrnuty i kulturní genotypy hrachu setého – Trendy, JI92, Arkta a Arvika. Účelem bylo testování obranyschopnosti semen s ohledem na pigmentaci osemení a rozdílnou funkčnost PPO genu (viz experiment 2 a experiment 3).

Experiment 1

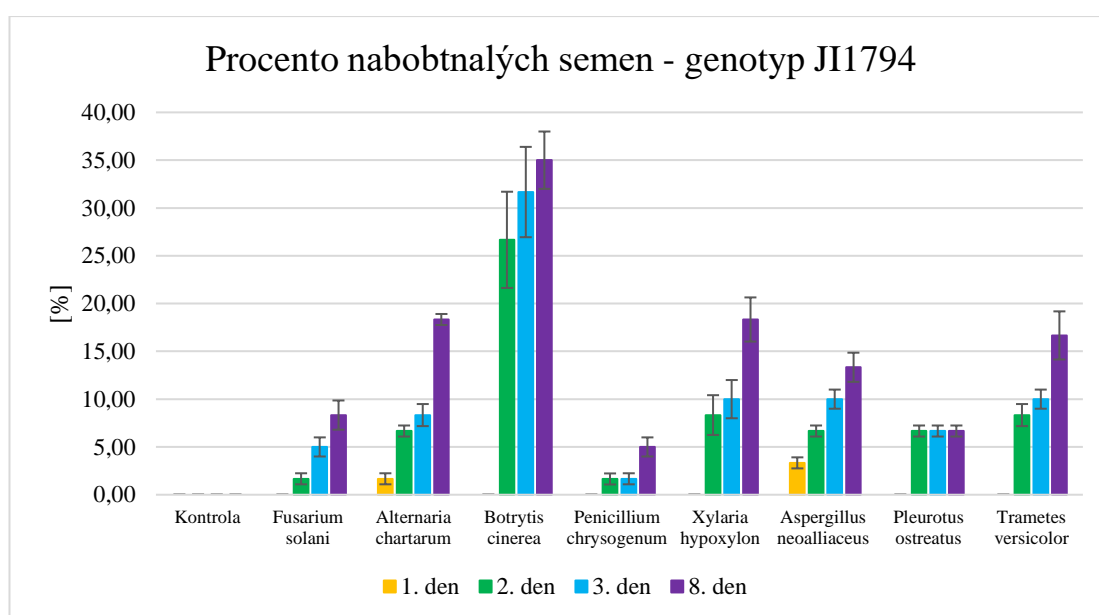
Na obrázku 8 můžeme vidět, že nejvyšší úspěšnost bobtnání měla semena planého hrachu JI1794 při kontaktu s půdní houbou *Alternaria chartarum* (po osmi dnech), *Botrytis cinerea* (po osmi dnech) a *Xylaria hypoxylon* (již po čtvrtém dni). U všech zmíněných byla úspěšnost bobtnání semen 12,5%. Oproti kontrolnímu vzorku, kdy po čtvrtém dni nabobtnalo 0% semen a po osmi dnech 10% semen, tak jde o mírné zvýšení počtu nabobtnalých semen. Naopak semena kultivovaná v přítomnosti hub *Aspergillus neoalliaceus*, *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor*, vykazovala menší procento (přibližně 3-5x méně) nabobtnalých semen ve srovnání s kontrolou v intervalu 8 dnů.



Obrázek 8: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu planého, genotyp JI1794, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 4 a 8 dní.

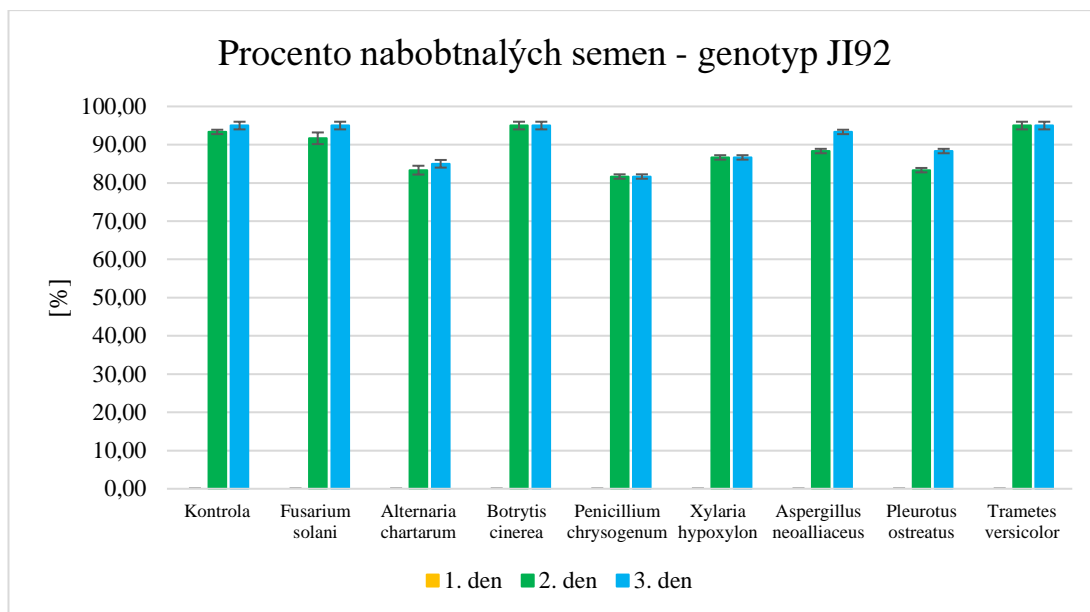
Experiment 2

Semena (genotyp JI1794) v kontaktu s *Botrytis cinerea* měly významně vyšší procentuální úspěšnost v počtu nabobtnalých semen – po dvou dnech kultivace 26,6%, po třech dnech kultivace 31,6% a po osmi dnech kultivace 35% (obrázek 9). Je tomu tak jak v porovnání s kontrolními vzorky, tak i v porovnání se semeny, která byla v kontaktu s jinými kmeny hub. Co se týče kontrolních vzorků, semena zůstala všechna dormantní. Zvýšené hodnoty nabobtnalých semen se objevovala i při kontaktu s houbami *Alternaria chartarum* (18,3%) a *Xylaria hypoxylon* (18,3%). Zde byly však hodnoty výrazněji zvýšeny až po osmidenní kultivaci.



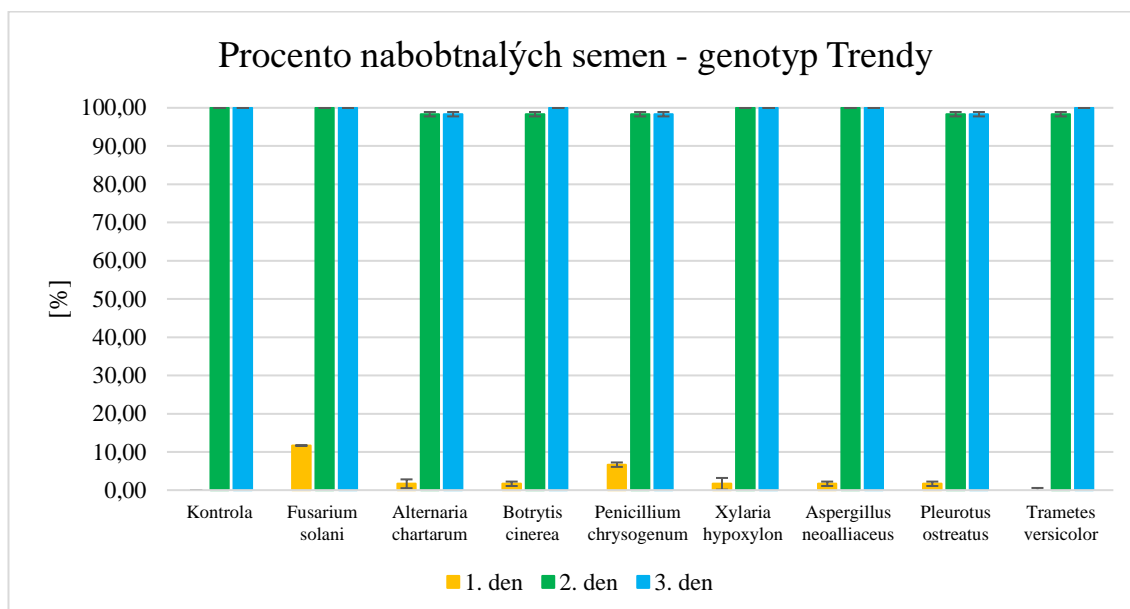
Obrázek 9: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu planého, genotyp JI1794, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 1, 2, 3 a 8 dní.

U genotypu kulturního nedormantního hrachu JI92 nebyly rozdíly v počtu nabobtnalých semen mezi kontrolními vzorky a mezi semeny v kontaktu s půdními houbami příliš patrné (viz obrázek 10). Semena v kontaktu s *Botrytis cinerea* a *Trametes versicolor* měla již druhý den kultivace procentuální úspěšnost 95%, zatímco kontrolní vzorky měly úspěšnost 93,3%. Klíčení však bylo po dvou dnech kultivace zaznamenáno pouze u semen v kontaktu s *Alternaria chartarum* (3,3%), *Pleurotus ostreatus* (8,3%) a *Trametes versicolor* (33,3%). U kontrolních vzorků byla zaznamenána klíčivost pouze u 20% semen. V dalších dnech kultivace se již klíčivost zvýšila. U kontrolních vzorků se klíčivost zvedla na 65%. Klíčivost nebyla zaznamenána pouze u semen v kontaktu s *Fusarium solani* a *Penicillium chrysogenum*.



Obrázek 10: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu setého, genotyp JI92, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 1, 2 a 3 dny.

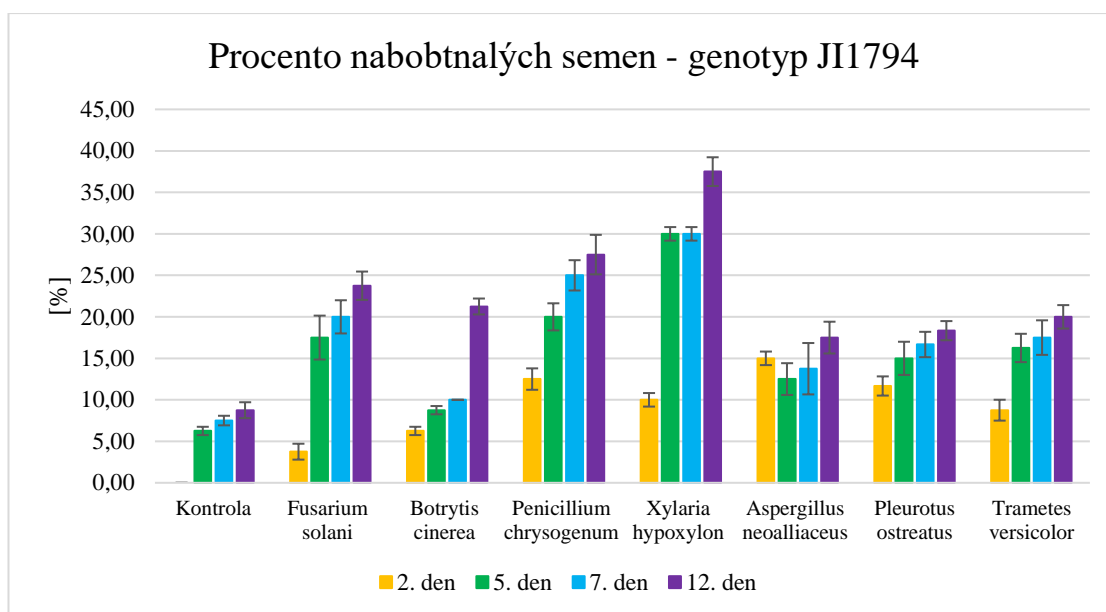
Genotyp Trendy měl nejvyšší úspěšnost bobtnání ze všech genotypů (viz obrázek 11). Většina semen zároveň nabobtnala velice rychle. Hodnoty byly téměř totožné jak u kontrolních vzorků, tak u semen v kontaktu s půdními houbami. Po dvou dnech kultivace byla zaznamenána u dvou třetin vzorků 100% úspěšnost. Po třetím dni však již nastala smrt semen. Ke klíčení nedošlo ani v jednom případě, včetně kontrolních vzorků.



Obrázek 11: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu setého, genotyp Trendy, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 1, 2 a 3 dny.

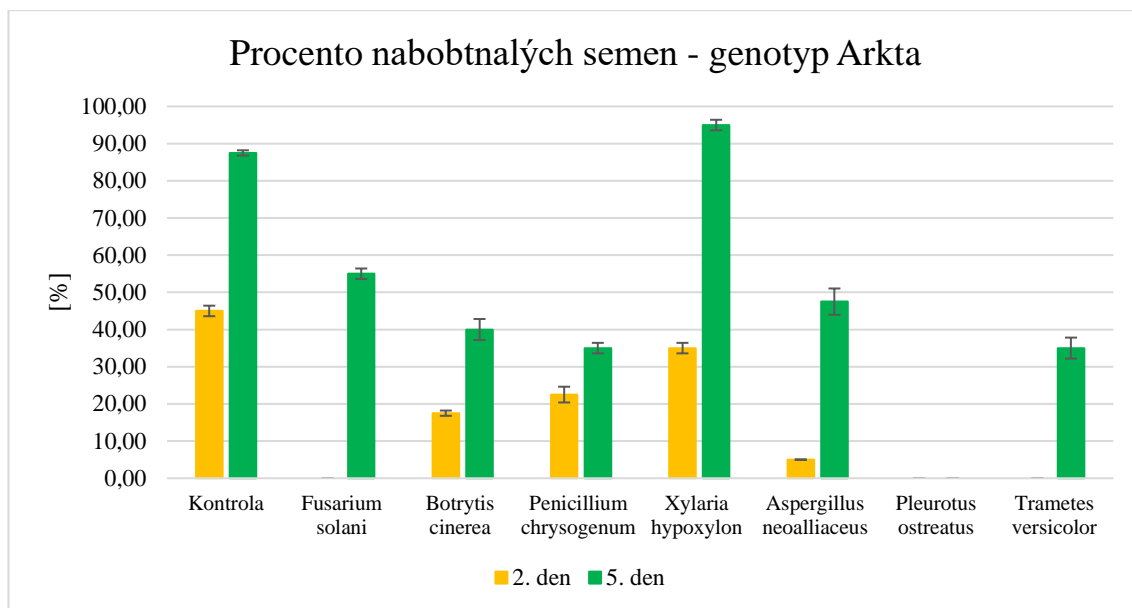
Experiment 3

Nejvyšší procentuální úspěšnost v počtu nabobtnalých semen vykazují semena v kontaktu s *Xylaria hypoxylon*, po pěti a sedmi dnech kultivace 30%, po dvanácti dnech kultivace 37,5% (viz obrázek 12). Výrazný nárůst počtu nabobtnalých semen oproti kontrolnímu vzorku po dvanácti dnech kultivace je zřejmý také u semen v kontaktu s *Penicillium chrysogenum* (27,5%), *Fusarium solani* (23,7%) a *Botrytis cinerea* (21,2%). Počet klíčících semen byl vždy přibližně 2x nižší, než počet nabobtnalých semen. V případě semen v kontaktu s *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum* a *Xylaria hypoxylon* byla zaznamenána změna zbarvení osemení – zčernání.



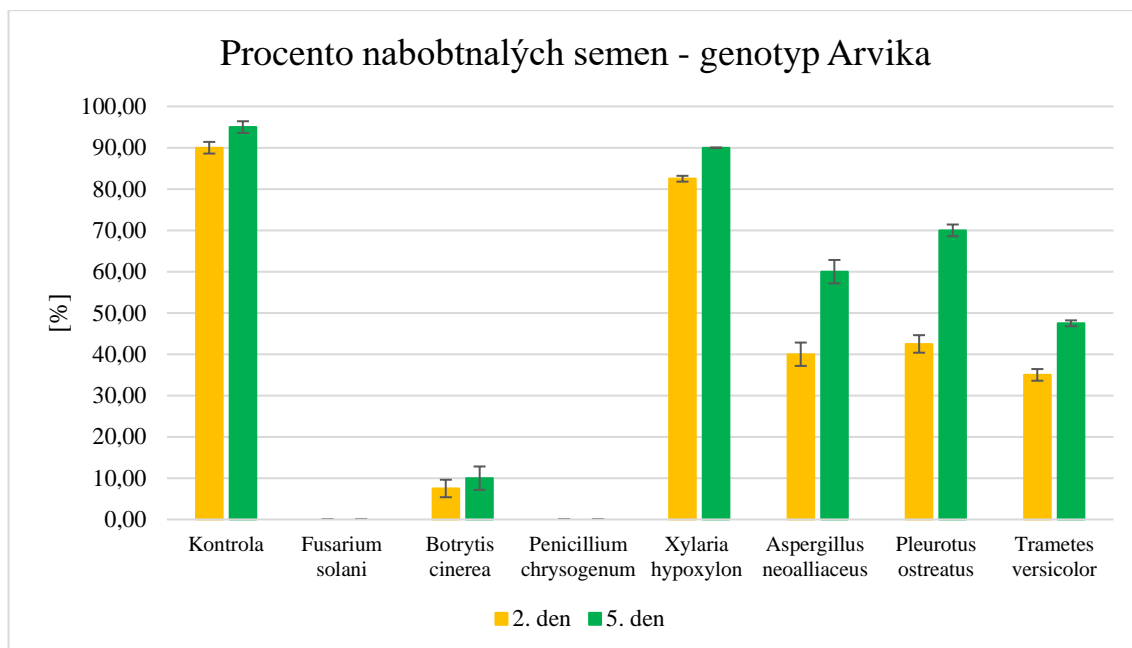
Obrázek 12: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu setého, genotyp JI1794, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 2, 5, 7 a 12 dní.

Na obrázku 13 můžeme vidět, že u genotypu Arkta jsou kontrolní vzorky v počtu nabobtnalých semen úspěšnější v porovnání se všemi ostatními, s výjimkou semen v kontaktu s *Xylaria hypoxylon*. Zde je procentuální úspěšnost po pěti dnech kultivace nepatrně vyšší (95%) oproti kontrolním vzorkům (87,5%). Klíčení bylo zaznamenáno u všech semen, kromě těch, které byly v kontaktu s *Xylaria hypoxylon*. V tomto případě byla semena zcela pokryta půdní houbou. Při kontaktu s *Pleurotus ostreatus* semena nenabobtnala vůbec. V případě semen v kontaktu s *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum* a *Xylaria hypoxylon* byla zaznamenána změna zbarvení osemení – zčernání.



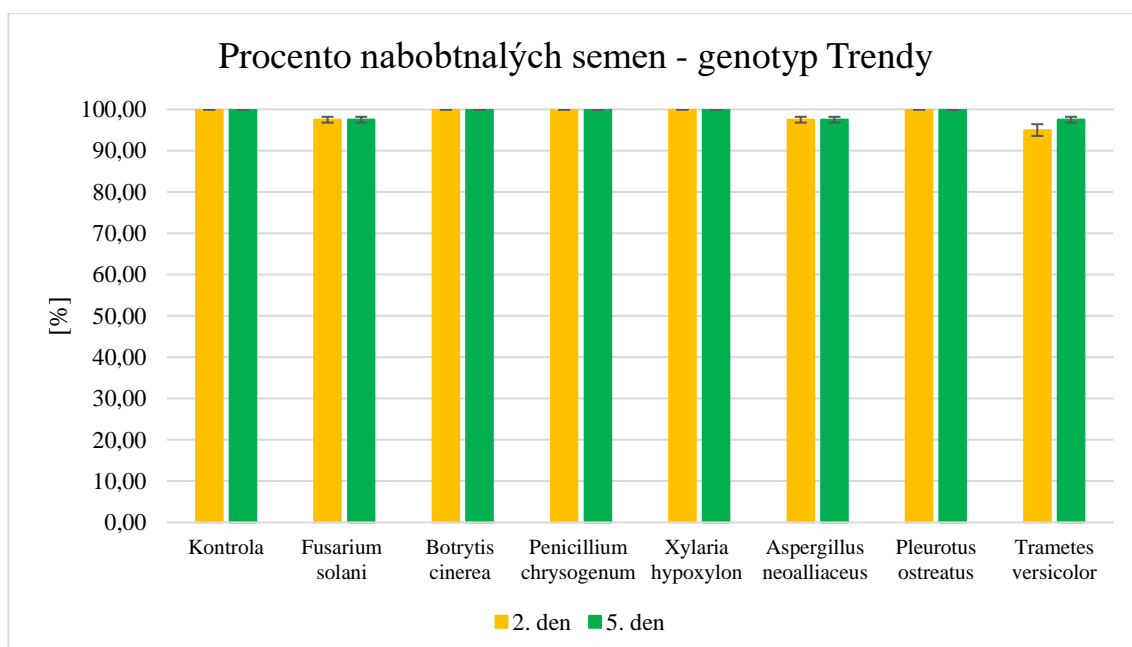
Obrázek 13: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu setého, genotyp Arkta, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 2 a 5 dní.

U genotypu Arvika mají největší úspěšnost v počtu nabobtnalých semen opět kontrolní vzorky (viz obrázek 14). Pátý den kultivace byla úspěšnost 90%. Co se týče semen při kontaktu s půdními houbami, vysokou úspěšnost měly semena v kontaktu s *Xylaria hypoxylon* (90%), *Pleurotus ostreatus* (70%) a *Aspergillus neoalliaceus* (60%). Klíčení bylo zaznamenáno u všech semen, kromě těch, které byly v kontaktu s *Penicillium chrysogenum*. V případě semen v kontaktu s *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum* a *Xylaria hypoxylon* byla zaznamenána změna zbarvení osemení – zčernání.



Obrázek 14: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu setého, genotyp Arvika, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 2 a 5 dní.

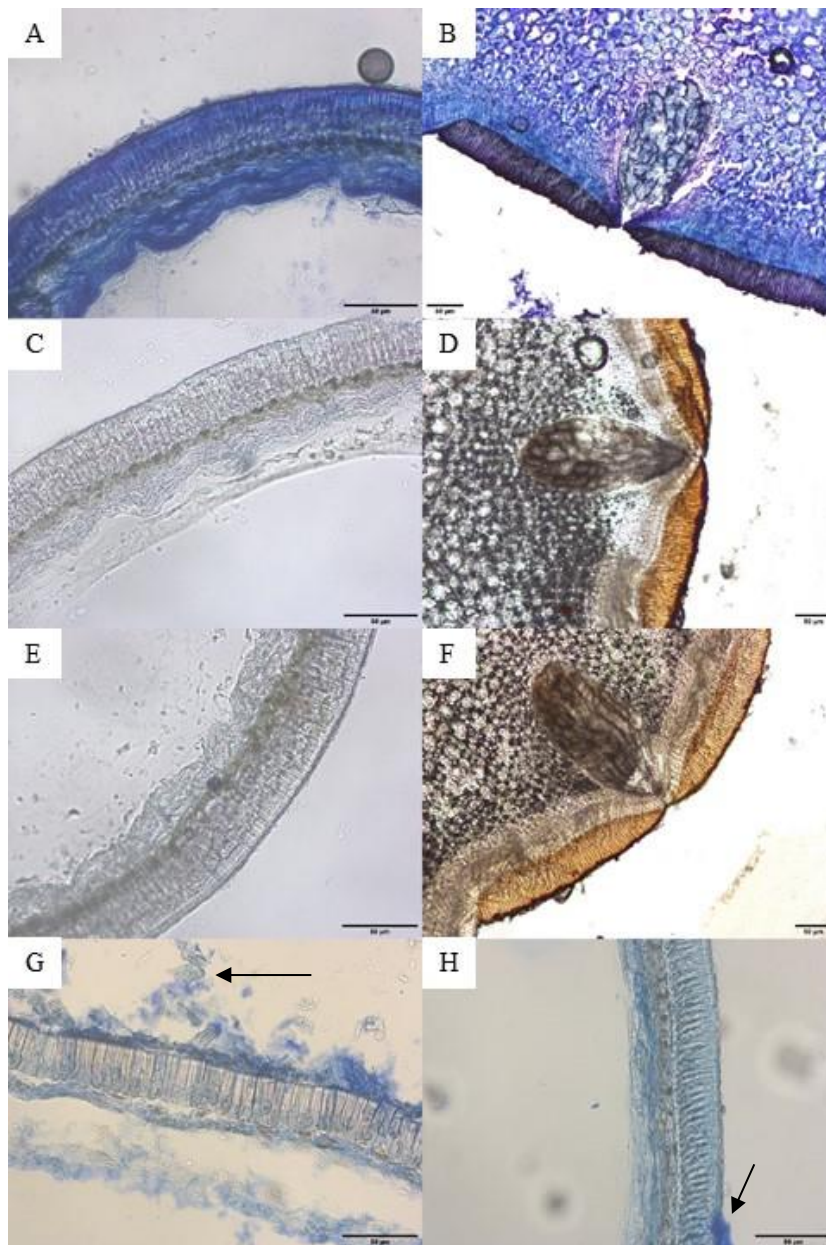
Genotyp Trendy má téměř ve všech případech 100% úspěšnost (viz obrázek 15). Co se týče klíčení, pátý den kultivace již všechna semena klíčila. Po pátém dni však již nastala smrt semen. Půdní houby semena zcela rozložily.



Obrázek 15: Procentuální úspěšnost nabobtnalých semen hrachu setého, genotyp Trendy, při kontaktu s jednotlivými kmeny půdních hub. Délka inkubace – 2 a 5 dní.

4.2 Anatomická analýza osemení

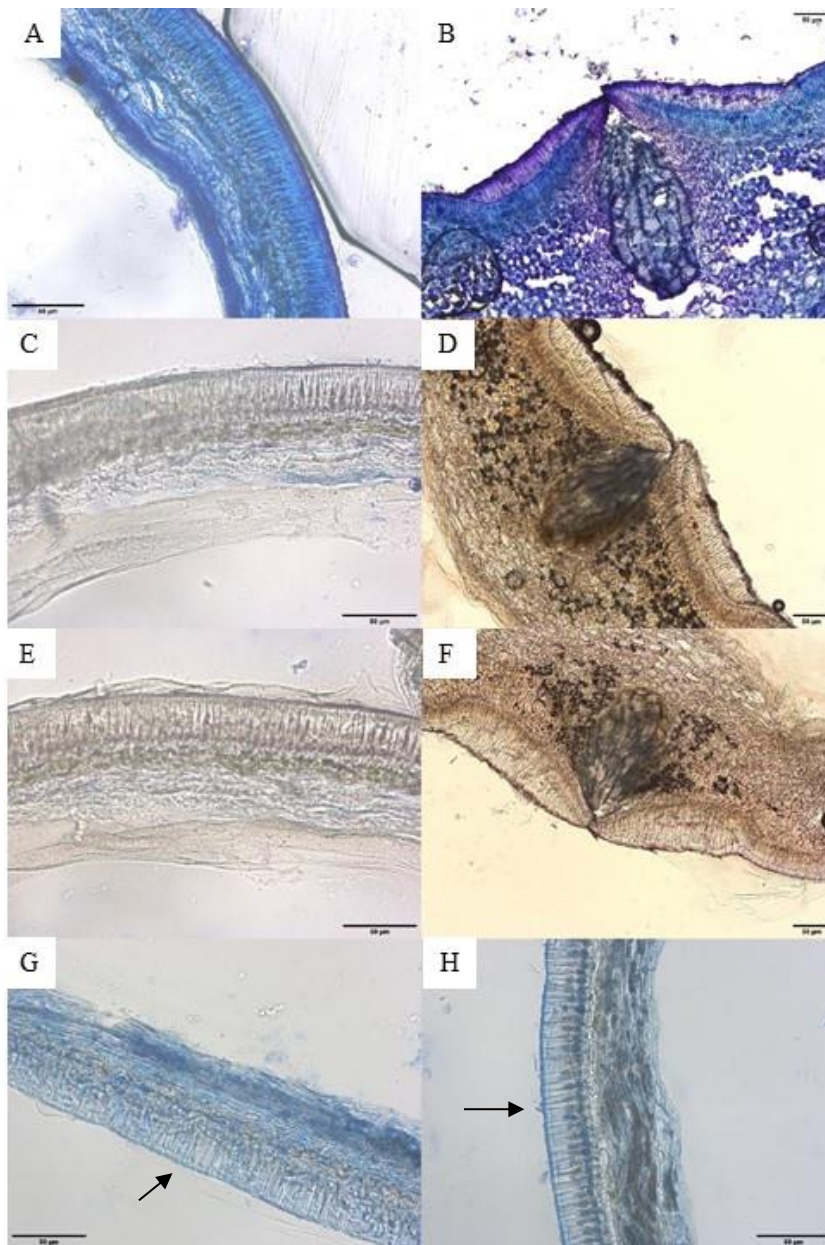
Na obrázku 16 je možno vidět příčné řezy osemením i osemením v oblasti hila *Pisum sativum* genotypu Arkta. Na obrázcích C – F lze vidět, že se zde nevyskytuje žádné mycelium půdní houby, přestože s ní semeno bylo v přímém kontaktu. Mycelium neprorostlo ani osemení v oblasti hila (obrázky D a F). Tato semena nebobtnala, ani se u nich neobjevila žádná viditelná reakce na přítomnou půdní houbu. Na obrázcích G a H však již můžeme vidět hojně se vyskytující mycelium půdních hub, které osemení z větší či menší části rozložilo.



Obrázek 16: Příčné řezy osemením hrachu setého (*Pisum sativum*), genotyp **Arkta**.

(A) Osemení semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (B) Oblast hila semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (C) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (D) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (E) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (F) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (G) Osemení semene po působení půdní houby (*Botrytis cinerea*), (H) Osemení semene po působení půdní houby (*Pleurotus ostreatus*), (A),(B) vzorky barveny Toluidinovou modří, (C) – (H) vzorky barveny Anilinovou modří, šipky označují přítomné mycelium.

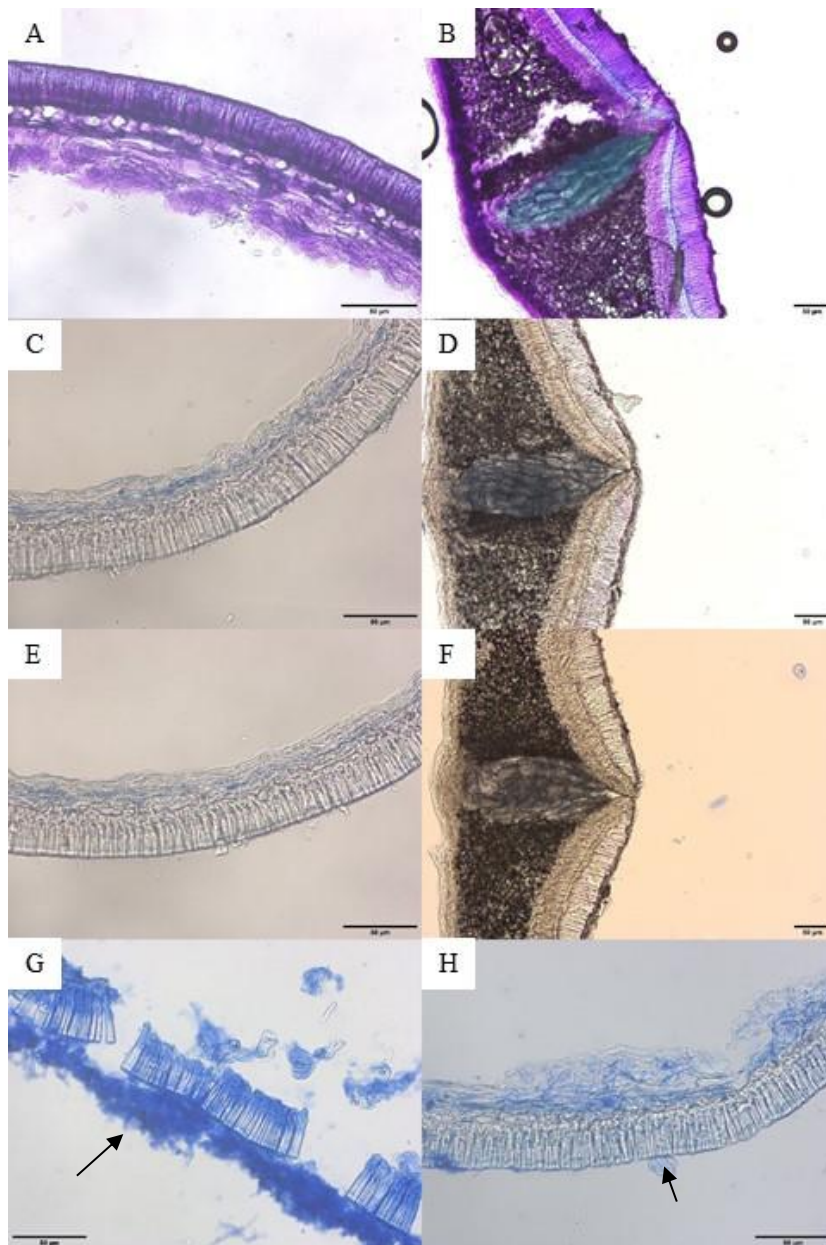
Na obrázku 17 je možno vidět příčné řezy osemením i osemením v oblasti hila *Pisum sativum* genotypu Arvika. Na obrázcích C – F lze vidět, že se zde nevyskytuje žádné mycelium půdní houby, přestože s ní semeno bylo v přímém kontaktu. Tato semena nijak nereagovala ani se u nich neobjevila žádná viditelná reakce na přítomnou půdní houbu. Mycelium neprorostlo ani osemení v oblasti hila (obrázky D a F). Na obrázcích G a H však již můžeme vidět hojně se vyskytující mycelium půdních hub, které osemení z menší části rozložilo.



Obrázek 17: Příčné řezy osemením hrachu setého (*Pisum sativum*), genotyp **Arvika**.

(A) Osemení semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (B) Oblast hila semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (C) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (D) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (E) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (F) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (G) Osemení semene po působení půdní houby (*Botrytis cinerea*), (H) Osemení semene po působení půdní houby (*Pleurotus ostreatus*), (A),(B) vzorky barveny Toluidinovou modří, (C) – (H) vzorky barveny Anilinovou modří, šipky označují přítomné mycelium.

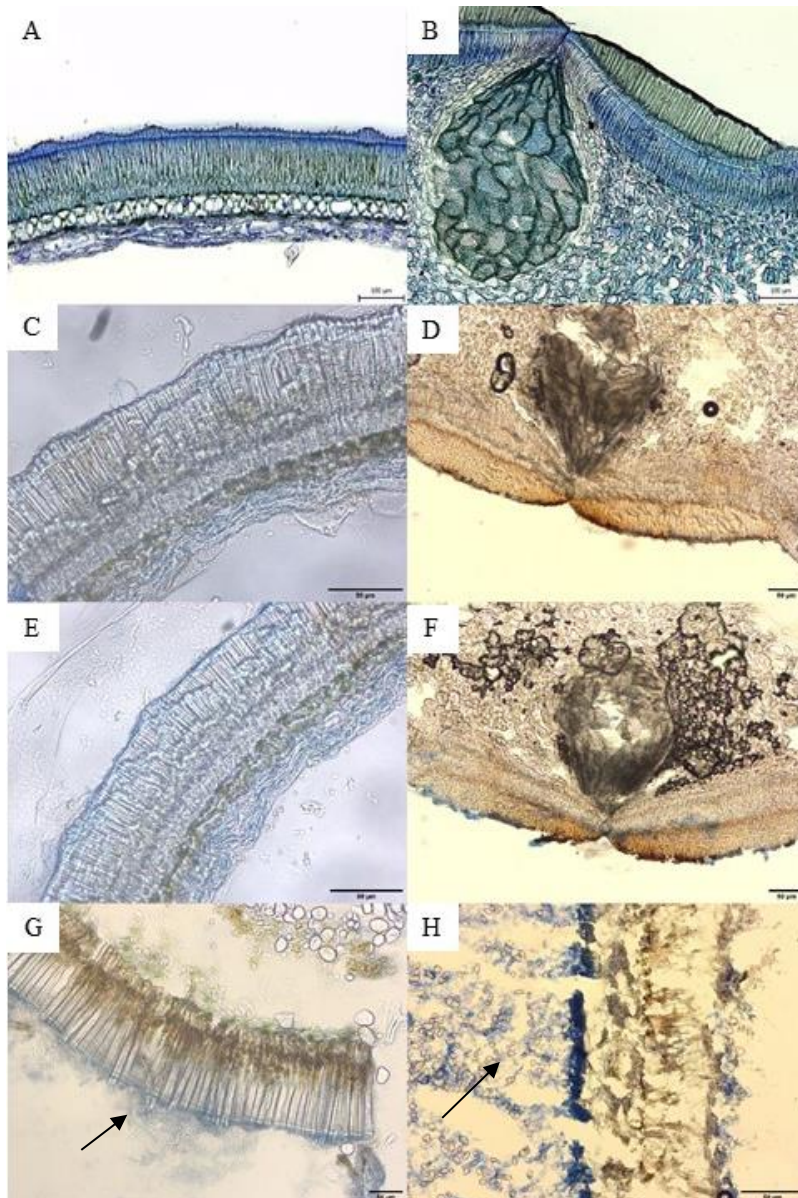
Na obrázku 18 je možno vidět příčné řezy osemením i osemením v oblasti hila *Pisum sativum* genotypu Trendy. Na obrázcích C – F lze vidět, že se zde nevyskytuje žádné mycelium půdní houby, přestože s ní semeno bylo v přímém kontaktu. Mycelium neprorostlo ani osemení v oblasti hila (obrázky D a F). Tato semena nebobtnala, ani se u nich neobjevila žádná viditelná reakce na přítomnou půdní houbu. Na obrázcích G a H však již můžeme vidět hojně se vyskytující mycelium půdních hub, které osemení v případě *Botrytis cinerea* osemení zcela rozložilo a degradovalo. V případě *Pleurotus ostreatus* není rozklad osemení tak výrazný.



Obrázek 18: Příčné řezy osemením hrachu setého (*Pisum sativum*), genotyp **Trendy**.

(A) Osemení semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (B) Oblast hila semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (C) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (D) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (E) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (F) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (G) Osemení semene po působení půdní houby (*Botrytis cinerea*), (H) Osemení semene po působení půdní houby (*Pleurotus ostreatus*), (A),(B) vzorky barveny Toluidinovou modří, (C) – (H) vzorky barveny Anilinovou modří, šipky označují přítomné mycelium.

Na obrázku 19 je možno vidět příčné řezy osemením i osemením v oblasti hila *Pisum sativum* genotypu JI1794. Na obrázcích C – F lze vidět, že se zde nevyskytuje žádné mycelium půdní houby, přestože s ní semeno bylo v přímém kontaktu. Mycelium neprorostlo ani osemení v oblasti hila (obrázky D a F). Tato semena nebobtnala, ani se u nich neobjevila žádná viditelná reakce na přítomnou půdní houbu. Na obrázcích G a H však již můžeme vidět hojně se vyskytující mycelium půdních hub, které osemení z větší či menší části rozložilo. Na obrázcích A, C a E lze vidět, že struktura osemení tohoto genotypu se výrazně liší od genotypů zmíněných výše. Osemení má větší tloušťku a je na povrchu nerovné. Je tomu tak z důvodu, že genotyp JI1794 je planý, kdežto předchozí genotypy jsou kulturní.



Obrázek 19: Příčné řezy osemením planého hrachu (*Pisum sativum* subsp. *elatius*), genotyp **JII1794**.

(A) Osemení semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (B) Oblast hila semene kultivovaného na čistém médiu bez půdní houby (kontrolní vzorek), (C) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (D) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Botrytis cinerea*), (E) Osemení dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (F) Oblast hila dormantního semene kultivovaného s půdní houbou (*Pleurotus ostreatus*), (G) Osemení semene po působení půdní houby (*Botrytis cinerea*), (H) Osemení semene po působení půdní houby (*Pleurotus ostreatus*), (A),(B) vzorky barveny Toluidinovou modří, (C) – (H) vzorky barveny Anilinovou modří, šipky označují přítomné mycelium.

5 DISKUZE

Dormance je zcela běžnou taktikou rostlin, co se týče přizpůsobení se nepříznivým podmínkám. Semena dočasně pozastaví či omezí své fyziologické procesy. Pro přerušení dormance jsou nutné vhodné podmínky (Procházka, 1998). V půdě však semena interagují s nejrůznějšími mikroorganismy, které k přerušení stavu dormance mohou také významně přispívat. Cílem této práce bylo zjištění, jak vybraná semena hrachu setého a planého reagují na vybrané kmeny půdních hub a to jak v kontextu obrany, tak i v ohledu na propustnost osemení a dormanci.

V práci bylo zjištěno, že *Botrytis cinerea* napomáhá v největší míře klíčení a přerušení stavu dormance u planého hrachu JI1794. Při kontaktu s touto půdní houbou bylo zaznamenáno po osmidenní kultivaci 35% nabobtnalých semen. U kontrolních vzorků nebyla zaznamenána žádná aktivita. Práce Have (2001) ukazuje, že *Botrytis cinerea* je pektinolytická půdní houba (z tohoto důvodu napadají dužnaté plody, jako jsou jahody apod.). Během napadení tedy vylučuje jednu nebo více forem pektináz a jiných pektinolytických enzymů, které štěpí pektiny. Faktem je, že makrosklereidy v osemení jsou spojeny právě látkami typu pektinu (Jánská a kol., 2019), což by naznačovalo, že při mechanismu degradace dochází k rozvolnění osemení a tím dochází i k ukončení dormance a zahájení klíčení.

Ve větší míře napomáhá přerušení dormance také půdní houba *Xylaria hypoxylon*. U semen v kontaktu s touto půdní houbou bylo zaznamenáno po dvanácti dnech kultivace až 37,5% nabobtnalých semen. Oproti tomu semena kultivovaná v přítomnosti hub *Aspergillus neoalliaceus*, *Pleurotus ostreatus* a *Trametes versicolor* vykazovala přibližně 3-5x menší procento nabobtnalých semen ve srovnání s kontrolou v intervalu 8 dnů. Tato různorodost při testování vlivu různých kmenů hub na semena byla zaznamenána i v experimentu Delgado-Sánchez a kol. (2010). Zde bylo na semenech opuncie ukázáno, že vliv půdních hub na semena je druhově specifický.

Dalším důvodem přerušení dormance by mohlo být působení lakáz, které jsou obsaženy právě v půdních houbách. Pierce a kol. (2019) ve svém experimentu dokázali na semenech vstavače (*Anacamptis morio*), že působení houbové lakázy stimuluje klíčení pomocí mechanismu rozkladu ligninu, který je obsažen v osemení semen hrachu. Lakázy tak rozvolňují osemení, díky čemuž je umožněn větší přívod vody do semene. To způsobuje bobtnání semen a následné klíčení. V experimentu byla na semena *in vitro*

aplikována lakáza a právě tato semena vykazovala dvojnásobné zvýšení klíčivosti v porovnání se sterilními semeny.

Co se týče kulturních genotypů hrachu setého, nebyly zde první tři až pět dní rozdíl mezi kontrolními vzorky a semeny, které byly kultivovány s půdními houbami, příliš patrné. Poté však půdní houby semena zcela usmrtila, což se týkalo zejména genotypu Trendy. Tento jev byl poté pečlivěji zkoumán v rámci anatomické analýzy osemení, kde lze vidět, že osemení při kontaktu s *Botrytis cinerea* je zcela rozloženo. Jedním z důvodů je fakt, že semena nemají pigmentované osemení. Byla prokázána pozitivní korelace mezi pigmentací osemení ve vztahu k dormanci (Werker a kol., 1978). Pigmentací osemení se rozumí přítomnost aktivních enzymů z fenylypropanodíni biosyntetické dráhy podílející se na syntéze metabolitů jako jsou antokyany, flavonoidy apod. Tento fakt potvrzuje i práce Hradilová a kol. (2019), ve které se zaměřují na souvislost antokyanidů a dormance. Bylo prokázáno, že celkový obsah antokyanidů je vyšší v osemení dormantních semen (průměrně 2,18 mg/g) v porovnání s nedormantními semeny (1,77 mg/g). Osemení Trendy je také velice tenké a náchylné k narušení.

Výsledky ukazují, že kulturní genotypy hrachu mají sníženou obranyschopnost v porovnání s planými genotypy hrachu. Jedním z možných důvodů je fakt, že u planého hrachu je přítomen funkční PPO gen, kdežto u kulturního hrachu nikoli. Práce Balarynová a kol. (2022) byla zaměřena na fakt, že gen pro PPO je rozdílně exprimován u planých a kultivovaných genotypů hrachu. Byla potvrzena až desetinásobně vyšší exprese tohoto genu u planě rostoucích hrachů v porovnání s kulturními. Důležitým aspektem je také fakt, že funkční gen pro PPO je spojen s pigmentací hila. Tento fakt byl potvrzen i v této práci. Semena genotypů Arkta a Arvika (hnědé až černé zbarvení hila) byla vůči půdním houbám odolnější než semena genotypu Trendy (krémové zbarvení hila).

6 ZÁVĚR

Dormance je velice důležitým jevem zejména v rostlinné říši. Jde o přechodné pozastavení nebo omezení fyziologických procesů v organismu. Správné načasování přerušení dormance semen a navození stavu klíčení je tak pro budoucnost rostliny velice důležité. Mimo jiné mohou při prolomení dormance napomáhat také mikroorganismy, např. půdní houby. Cílem této práce bylo využití půdních hub k narušení osemení a následně přerušení dormance u planého hrachu JI1794 a také testování obranyschopnosti semen kulturního hrachu setého (genotypy Arkta, Arvika, JI92, Trendy). Co se týče planého hrachu *P. elatius* (JI1794), k ukončení stavu dormance půdními houbami může docházet několika mechanismy. Jedním z nich je rozvolnění osemení působením pektinolytických enzymů (produkuje jej např. *Botrytis cinerea*). Dalším z možných mechanismů je působení lakáz, které rozkládají lignin přítomný v osemení semen. Naopak kulturní genotypy hrachu mají v porovnání s planými genotypy hrachu sníženou obranyschopnost, která patrně souvisí s funkčností PPO genu (přičemž plané genotypy hrachu mají funkční PPO gen, kulturní genotypy hrachu nikoli) a také pigmentací osemení. V konečném důsledku bylo dokázáno, že půdní houby napomáhají prolomení dormance, avšak vliv půdních hub na semena je druhově specifický.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ayeh K. O., Lee Y., Ambrose M. J., Hvoslef-Eide A. K. (2009). Characterization and structural analysis of wild type and a non-abscission mutant at the development funiculus (Def) locus in *Pisum sativum*. *Plant Biology* 9, 76
- Balarynová J., Klčová B., Sekaninová J., Koblíková L., Zajíčková M., Krejčí P. a kol. (2022). The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication. *New Phytologist*, 1-15
- Baldrian P. (2005). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews* 30, 215-242
- Baldrian P. (2009). Houby v lesní půdě a jejich ekologický význam. *Živa* 4, 150-152
- Becker K., Stadler M. (2020). Recent progress in biodiversity research on the *Xylariales* and their secondary metabolism. *The Journal of Antibiotics* 74, 1-23
- Delgado-Sánchez P., Ortega-Amaro M. A., Jiménez-Bremont J. F., Flores J. (2011). Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biology* 13, 154-159
- Dou H., Chang Y., Zhang L. (2019). *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 163, 361-381
- Eldredge S. D. (2007). Beneficial Fungal Interactions Resulting in Accelerated Germination of *Astragalus utahensis*, a Hard-Seeded Legume. 17-20
- Finkelstein R., Reeves W., Arizumi T., Steber C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Plant Biology* 59, 387-415
- Gallandt E. R. (2006). How can we target the weed seedbank? *Weed Science* 54, 588-596
- Guzmán-Chávez F., Zwahlen R. D., Bovenberg R. A. L., Driessen A. J. M. (2018). Engineering of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* as Cell Factory for Natural Products. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-2

- Have A., Oude Breuil W., Wubben J. P., Visser J., Kan J. A. L. (2001). *Botrytis cinerea* Endopolygalacturonase Genes Are Differentially Expressed in Various Plant Tissues. *Fungal Genetics and Biology* 33, 97-105
- Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E. a kol. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 5, 509-547
- Hradilová I., Duchoslav M., Brus J., Pechanec V., Hýbl M., Kopecký P. a kol. (2019). Variation in wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) seed dormancy and its relationship to the environment and seed coat traits. *PeerJ* 7, 9-15
- Hradilová I., Trněný O., Válková M., Čechová M., Janská A., Khan A. W. a kol. (2017). A combined comparative transcriptomic, metabolomic and anatomical analyses of two key domestication traits: pod dehiscence and seed dormancy in pea (*Pisum sp.*). *Frontiers in Plant Science* 8, 1-25
- Chen T., Nan Z., Zhang X., Hou F., Christensen M., Baskin C. (2018). Does dormancy protect seeds against attack by the pathogenic fungus *Fusarium tricinctum* in a semiarid grassland of Northwest China? *Plant Soil* 422, 155-168
- Janská A., Pecková E., Sczepaniak B., Smýkal P., Soukup A. (2019). The role of the testa during the establishment of physical dormancy in the pea seed. *Annals of Botany* 123, 815–829
- Koaze Y. (1957). Germination promotants for plant seed, produced by microorganisms. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 22, 91-97
- Kůrová J. (2014). Ke studiu půdní semenné banky. *Živa* 2, 66-67
- Lásztity R. (1999). *Cereal Chemistry*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 138-140
- Li Y. M., Shaffer J. P., Hall B., Ko H. (2019). Soil-borne fungi influence seed germination and mortality, with implications for coexistence of desert winter annual plants. *PLoS ONE* 14, 1-21
- Niemi K., Haggman H. (2002). *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in Scot's pine somatic embryos in-vitro. *Mycorrhiza* 12, 263-267

- Nováková A. (2017). Půdní houby. *Živa* 5, 218-221
- Nováková A. (2021). Půdní houby - významná komponenta půdní mikrobioty. *Ochrana přírody* 5, 8-11
- Pfeiffer N. E. (1934). Morphology of the seed of *Symphoricarpos racemosus* and the relation of fungal invasion of the coat to germinative capacity. *Contributions from the Boyce Thompson Institute* 6, 103-122
- Pierce S., Spada A., Caporali E., Ceriani R. M., Buffa G. (2019). Enzymatic scarification of *Anacamptis morio* (Orchidaceae) seed facilitates lignin degradation, water uptake and germination. *Plant biology* 21, 409-414
- Pimentel D., Zuniga R., Morrison D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52, 273-288
- Pollard A. (2018). Seeds vs fungi: An enzymatic battle in the soil seedbank. *Seed Science Research*, 28(3), 197-214
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. (1998). *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia
- Prokop M. (2009). Jak se rostliny brání napadení houbovými patogeny. *Živa* 4, 152-153
- Skadhauge B., Thomsen K. K., Wettstein D. (1997). The role of the barely testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas* 126, 147-160
- Smýkal P. (2019). Klíčit, nebo spát? *Vesmír* 98, 362-364
- Smýkal P., Vernoud V., Blair M. W., Soukup A., Thompson R. D. (2014). The role of the testa during development in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science* 5, 1–14
- Staats M., van Baarlen P., van Kan J. A. L. (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22, 333-346
- Thorn R. G., Barron G. L. (1984). Carnivorous mushrooms. *Science* 224, 76-78

Van Dongen J. T., Ammerlaan A. M., Wouterlood M., Van Aelst A. C., Borstlap A. C. (2003). Structure of the developing pea seed coat the post-pholem transport pathway of nutrients. *Annals of Botany* 93, 729-737

Werker E., Marbach I., Mayer A. M. (1979). Relation between the anatomy of the testa, water permeability and the presence of phenolics in the genus *Pisum*. *Annals of Botany* 43, 765-771

Woudenberg J. H. C., Groenewald J. Z., Binder M., Crous P. W. (2006). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75, 171-212

Zhang N., O'Donnell K., Sutton D. A., Nalim F. A., Summerbell R. C., Padhye A. A. a kol. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of clinical microbiology* 44, 2186-2190