

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Mykorhizní a endofytické houby, partnerství s
rostlinami**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Nela Brulíková
Studijní obor:	Biologie pro vzdělávání
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.

Olomouc 2024

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci sepsala samostatně pod dohledem vedoucího bakalářské práce Mgr. Pavla Matušinského, Ph.D. a že jsem uvedla všechnu použitou literaturu na konci práce.

V Olomouci dne

.....

Jméno a Příjmení

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Pavlu Matušinskému, Ph.D. za jeho vedení a podporu během mého bakalářského výzkumu. Děkuji za jeho trpělivost, ochotu, rady, pomoc a vedení, které mi během této práce poskytl. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Dominiku Blešovi za pomoc s výzkumem endofytu *Serendipita indica*.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Nela Brulíková
Název práce: Mykorhizní a endofytické houby, partnerství s rostlinami
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce: Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt:

Mykorhiza je symbiotické soužití hub s kořeny vyšších rostlin. Při tomto procesu může docházet buď k pronikání houbových vláken do kořenových buněk primární kůry, nebo houbová vlákna zůstávají pouze v mezibuněčném prostoru. Mykorhizní kolonizace rostlin může přinést značné výhody v podobě zlepšení růstu, příjmu živin a v některých případech i výnosu. Endofytické houby žijí uvnitř rostlinného těla a jsou spojeny přímo s jejich pletivou. Tyto houby se vyskytují jak v podzemních částech rostliny, tak i v částech nadzemních. Mohou být prospěšné, především jako ochrana vůči herbivorům a patogenům.

Teoretická část této práce se zaměřuje na popis mykorhizních a endofytických hub a jejich význam. Dále je zde uvedena charakteristika organismů *Microdochium bolleyi*, *Serendipita indica* a *Brachypodium distachyon*.

Cílem praktické části bylo založit skleníkové experimenty s modelovou rostlinou *Brachypodium distachyon*, studovat kolonizaci hostitelské rostliny a posoudit vliv endofytů na růstové a vývojové charakteristiky rostlin pomocí vizuálního hodnocení, vážení biomasy a využití mikroskopických a molekulárních technik, včetně qPCR. Byl zjištěn vliv použitých endofytů na růst a vývoj rostlin. Endofyty byly úspěšně detekovány pomocí kvantitativní Real-Time PCR a bylo také stanoveno relativní množství endofytu v kořenech rostlin *B. distachyon*. Přítomnost endofytů byla v jednotlivých kořenech pozorována i pomocí mikroskopu.

Klíčová slova: Mykorhizní houby, endofytické houby, *Microdochium bolleyi*, *Serendipita indica*, *Brachypodium distachyon*
Počet stran: 53
Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Nela Brulíková
Title: Mycorrhizal and endophytic fungi – partnership with plants
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Botany, Faculty of Science,
Palacký University Olomouc, Czech Republic
Supervisor: Mgr. Pavel Matušinský, Ph.D.
The year of presentation: 2024

Abstract:

Mycorrhiza is the symbiotic coexistence of fungi with the roots of higher plants. In this process, either fungal filaments penetrate the root cells of the primary cortex or fungal filaments remain only in the intercellular space. Mycorrhizal colonisation of plants can provide significant benefits in terms of improved growth, nutrient uptake and, in some cases, yield. Endophytic fungi live inside the plant body and are associated directly with its tissues. These fungi are found both in the underground parts of the plant and in the above-ground parts. They can be beneficial, especially as protection against herbicides and pathogens.

The theoretical part of this thesis focuses on the description of mycorrhizal and endophytic fungi and their importance. Furthermore, the characteristics of *Microdochium bolleyi*, *Serendipita indica* and *Brachypodium distachyon* are presented.

The aim of the practical part was to set up greenhouse experiments with the model plant *Brachypodium distachyon*, to study the colonization of the host plant and to assess the effect of endophytes on plant growth and developmental characteristics by visual assessment, biomass weighing and the use of microscopic and molecular techniques, including qPCR. The effect of the endophytes used on plant growth and development was determined. Endophytes were successfully detected by quantitative Real-Time PCR and the relative amount of endophyte in the roots of *B. distachyon* plants was also determined. The presence of endophytes was also observed in individual roots using a microscope.

Keywords: Mycorrhizal fungi, endophytic fungi, *Microdochium bolleyi*, *Serendipita indica*, *Brachypodium distachyon*
Number of pages: 53
Language: Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
	TEORETICKÁ ČÁST.....	3
3	Mykorhizní a endofytické houby	3
3.1	Mykorhiza a mykorhizní houby	3
3.1.1	Druhy mykorhiz	3
3.1.1.1	Endomykorhiza	3
3.1.1.2	Ektomykorhiza	3
3.1.1.3	Erikoidní mykorhiza.....	4
3.1.1.4	Orchideoidní mykorhiza.....	4
3.1.1.5	Arbuskulární mykorhiza.....	5
3.2	Endofytické houby	5
3.2.1	Dělení endofytů	6
3.3	Rozdíly mezi mykorhizními a endofytickými houbami	9
4	Význam mykorhizních a endofytických hub	9
5	Charakteristika organismů	10
5.1	<i>Microdochium bolleyi</i>	10
5.2	<i>Serendipita indica</i>	11
5.3	<i>Brachypodium distachyon</i>	12
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	13
6	Materiál a metody	13
6.1	Biologický materiál	13
6.2	Použité chemikálie a soupravy	13
6.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	13
6.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	14
6.4.1	Založení experimentu ve skleníku.....	14
6.4.1.1	Příprava inokula	14
6.4.1.2	Setí a odběr vzorků.....	14
6.4.2	Mikroskopování kořenů	16
6.4.3	Izolace DNA.....	17
6.4.4	Kvantitativní Real-time PCR (qPCR)	18
7	VÝSLEDKY	18

7.1	Odběr vzorků	18
7.2	Mikroskopování.....	25
7.3	qPCR – Kvantifikace v hostiteli	31
8	DISKUZE	34
9	ZÁVĚR	38
10	DIDAKTICKÁ ČÁST	39
11	SEZNAM OBRÁZKŮ	47
12	SEZNAM TABULEK	48
13	POUŽITÁ LITERATURA	49

1 ÚVOD

Mykorhizní houby navazují symbiotický vztah s kořeny vyšších rostlin. Tyto houby neprostupují přímo dovnitř do rostlinných pletiv. Houbová vlákna mykorhizních hub mohou pronikat buď do kořenových buněk primární kůry, nebo mohou zůstat pouze v mezibuněčných prostorech. Na základě tohoto prostupování můžeme rozlišovat dva typy mykorhizy, a to endomykorhizu a ektomykorhizu, které budou taktéž popsány v teoretické části. Symbiotický vztah mezi mykorhizními houbami a vyššími rostlinami může pomoci rostlinám zvyšovat savou plochu kořenů a tím lépe získávat důležité živiny.

Endofytické houby jsou druhy hub, které kolonizují vnitřní pletiva rostlinných hostitelů. Tento symbiotický vztah je nepatogenní, rostlinám nijak neškodí. Naopak rostlinným hostitelům endofyty přináší řadu výhod. Endofyty mají pro rostlinu význam především při ochraně vůči herbivorům a patogenům. Mohou se také podílet na výživě hostitele, zvyšování biomasy kořenů výhonků a semen a na ochraně vůči abiotickému a biotickému stresu. Endofytické houby můžeme řadit do čtyř tříd, které budou popsány v teoretické části této práce.

Brachypodium distachyon je jednoletá samosprašná tráva z čeledi *Poaceae*. Má vlastnosti typické pro modelové rostliny. Charakteristický je její poměrně malý vzrůst, krátký životní cyklus a možnost genetické transformace pomocí bakterie rodu *Agrobacterium*. Patří mezi C3 rostliny, stejně jako ostatní zástupci čeledi *Poaceae*. Stala se prvním druhem trávy z této čeledě, jejíž genom byl plně sekvenován. Její genom je jedním z nejmenších mezi diploidními travními genomy.

Microdochium bolleyi je nepatogenní endofytická houba, která kolonizuje kořeny pšenice a dalších obilovin. Patří mezi tzv. dark septate endophytes (DSE). Tento endofyt vykazuje supresi různých rostlinných patogenů obilovin, jakou jsou například *Oculimacila yallunda* a *Fusarium graminearum*.

Serendipita indica je taktéž endofytická houba kolonizující kořeny rostlin. Tento endofyt pomáhá rostlinám růst, přijímat živiny a zvyšuje odolnost rostlin vůči stresu. Může taktéž podporovat celkový růst a produkci semen.

V praktické části bakalářské práce bude proveden experiment, ve kterém bude pomocí různých metod sledován vliv endofytů *M. bolleyi* a *S. indica* na modelový organismus *B. distachyon*.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo provést literární rešerši zaměřenou na mykorhizní a endofytické houby a jejich význam v partnerství s rostlinami. Kromě toho byly charakterizovány organismy *M. bolleyi*, *S. indica* a *B. distachyon*, které byly použity při provádění experimentu.

Cílem praktické části bylo založit skleníkové experimenty s modelovou rostlinou *Brachypodium distachyon*, studovat kolonizaci hostitelské rostliny a posoudit vliv endofytů na růstové a vývojové charakteristiky rostlin pomocí vizuálního hodnocení, vážení biomasy a využití mikroskopických a molekulárních technik, včetně qPCR. Dalším cílem bylo porovnat účinky osmi kmenů *M. bolleyi* na růst a vývoj rostlin.

Cílem didaktické části bylo vytvořit pracovní listy, které by mohly být využity při výuce biologie, biologických praktik a biologických seminářů.

TEORETICKÁ ČÁST

3 Mykorhizní a endofytické houby

3.1 Mykorhiza a mykorhizní houby

Mykorhiza je symbiotické soužití hub s kořeny vyšších rostlin. Termín mykorhiza zavedl Albert Bernhard Frank pro popis symbiotického spojení kořenů rostlin a hub. Mykorhiza doslova znamená „houbový kořen“ (Bagyaraj, 2014). Při tomto procesu může docházet buď k pronikání houbových vláken do kořenových buněk primární kůry, pak tento proces nazýváme endomykorhiza, nebo houbová vlákna zůstávají pouze v mezibuněčném prostoru, tento případ nazýváme ektomykorhiza.

3.1.1 Druhy mykorhiz

3.1.1.1 Endomykorhiza

Při endomykorhize, někdy také endotrofní mykorhize, pronikají houbová vlákna dovnitř do kořenových buněk rostliny. Endomykorhiza se dělí do několika druhů, jejichž názvy jsou často odvozovány od skupiny rostlin, v níž tento proces probíhá. Nejčastějším druhem endomykorhizy je arbuskulární mykorhiza. Arbuskulární mykorhiza je tvořena neseptátními glomeromycetními houbami. Patří do oddělení *Mucoromycota*, který má tři třídy – *Glomeromycetes*, *Archaeosporomycetes* a *Paraglomeromycetes*, s pěti řády – *Glomerales*, *Diversisporales*, *Gigasporales*, *Paraglomerales* a *Archaeosporales*, čtrnácti čeleděmi a 26 rody. Běžně se vyskytující rody arbuskulárně mykorhizních hub jsou *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora* a *Entrophospora* (Bagyaraj, 2014).

3.1.1.2 Ektomykorhiza

Ektomykorhiza není tak častá, jako již zmíněná endomykorhiza. Většina ektomykorhizních hub patří mezi vřeckaté či stopkaté houby. Ektomykorhizy se nejčastěji vyskytují u lesních dřevin mírného pásma z čeledi *Pinaceae*, *Salicaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae* a *Tiliaceae* a také u některých zástupců *Rosaceae*, *Leguminaceae*, *Myrtaceae* a *Juglandaceae* (Bagyaraj et al., 2014). Tyto houby kolem kořene rostliny vytváří hyfový plášť, díky kterému je zvýšena savá plocha soustavy. Vlákna těchto mykorhizních hub vstupují mezi buňky primární kůry, kde vytváří soustavu vláken (Hartigovu síť). Další hyfy se větví v půdě, díky čemuž se opět zvyšuje savá plocha. Důsledkem tohoto zvýšení savé plochy kořeny s tímto typem mykorhizy zakrňuje,

vidličnatě se větví a tloustnou (Mohammadi et al., 2011). Tyto houby lze kultivovat v laboratoři na vhodných médiích a používat je k inokulaci lesních školek (Bagyaraj et al., 2014).

3.1.1.3 Erikoidní mykorrhiza

Erikoidní mykorrhizní houby navazují symbiotický vztah s rostlinami patřícími do čeledi *Ericaceae*, *Empetraceae* a *Epacridaceae*, které se často označují jako vřesovištní rostliny (např. azalky, rododendrony, borůvky a brusinky) (Bagyaraj et al., 2014). Rostliny, které vytvářejí erikoidní mykorrhizní asociace jsou rozšířené na nepříznivých stanovištích a díky tomuto symbiotickému vztahu mají schopnost kolonizovat znečištěné půdy (Cairney a Meharg, 2003). Toto symbiotické spojení houby a rostliny umožňuje rostlinám přijímat dusík a fosfor z půd často kyselých a chudých na živiny (Bagyaraj et al., 2014). Tyto houby jsou také schopné pomoci rostlinám zvládat stresové podmínky prostředí a vyvinout odolnost vůči kontaminaci toxickými kovy (Cairney a Meharg, 2003).

3.1.1.4 Orchideoidní mykorrhiza

Orchideje patří do čeledi vstavačovitých (*Orchidaceae*), která zahrnuje téměř 30000 druhů (Bagyaraj et al., 2014). Jejich semena obsahují velmi omezené zásoby ve formě škrobu nebo lipidů (Bagyaraj et al., 2014). V době klíčení tato semena absorbují vodu, nabobtnají a jejich obal praskne a odhalí epidermální chlupy, přičemž se tato struktura označuje jako protokorm (Bagyaraj et al., 2014). K tomu, aby se protokorm mohl vyvinout v rostlinu, musí být infikován mykorrhizní houbou (Bagyaraj et al., 2014). Pokud touto houbou není infikován, odumře, to znamená, že jsou orchideje na mykorrhizních houbách obligátně závislé (Bagyaraj et al., 2014). Orchideoidní mykorrhiza pravděpodobně ovlivňuje až 25000 druhů rostlin (Rasmussen H. a Rasmussen F, 2009). Histologicky se tato symbióza podobá jiným druhům endomykorrhizy, značné množství důkazů však naznačuje tomu, že se nejedná o obousměrný výměnný vztah, a tedy ani o potenciálně mutualistický vztah, jako je tomu u široce rozšířené endomykorrhizy (Rasmussen H. a Rasmussen F, 2009). Houbové hyfy pronikají do parenchymatických buněk protokormů a vytvářejí zde složité intracelulární hyfové závity, které se nazývají pelotony (Dearnaley et al., 2012). Předpokládá se, že tyto pelotony jsou místem přenosu živin mezi symbionty, což je nezbytné pro zachování orchidejí v jejich přirozeném prostředí (Dearnaley et al., 2012). Tyto interakce mají důležitý vliv na zachování genetické variability v populacích orchidejí, což je zásadní pro udržení biodiverzity a ochranu ohrožených druhů (Dearnaley et al., 2012).

3.1.1.5 Arbuskulární mykorrhiza

Arbuskulární mykorrhiza je symbióza mezi rostlinami a příslušníky oddělení Mucoromycota, zlepšuje zásobování hostitelské rostliny vodou a živinami, jako jsou fosfáty a dusík (Parniske, 2008). Na oplátku je houbě předáno až 20 % uhlíku vázaného v rostlině (Parniske, 2008). U většiny rostlin je tato mykorrhizní asociace arbuskulárního typu běžná (Bagyaraj et al., 2014). Vyskytuje se u většiny zemědělských plodin, většiny keřů, většiny tropických druhů stromů a některých druhů stromů mírného pásma (Bagyaraj et al., 2014). Mezi čeledi, které tvoří arbuskulární mykorrhizu, patří *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Orchidaceae*, *Fumariaceae*, *Commelinaceae*, *Urticaceae* a *Ericaceae* (Bagyaraj et al., 2014). Mezi čeledi, které zřídka tvoří arbuskulární mykorrhizu, patří *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Polygonaceae* a *Cyperaceae* (Bagyaraj et al., 2014). K přenosu živin dochází prostřednictvím symbiotických struktur uvnitř kořenových buněk rostlin známých jako arbuskule (Parniske, 2008). Vývoj arbuskulárních mykorrhizních hub je doprovázen výměnou signálních molekul mezi symbionty. Kořeny rostlin vylučují novou skupinu rostlinných hormonů známých jako strigolaktony, které stimulují metabolismus hub a jejich větvení a zároveň vyvolávají klíčení semen parazitických rostlin (Parniske, 2008). Symbiotická spojení mezi arbuskulárními mykorrhizními houbami a kořeny rostlin jsou v přírodě velmi rozšířená a mohou hostitelské rostlině přinášet řadu výhod. Patří mezi ně lepší výživa, zvýšená odolnost vůči půdním škůdcům a chorobám, lepší odolnost vůči suchu, tolerance vůči těžkým kovům a lepší struktura půdy (Gosling et al., 2006). Mnoho zemědělských postupů včetně používání hnojiv a biocidů, obdělávání půdy, monokultur a pěstování nemykorrhizních plodin arbuskulárním mykorrhizním houbám škodí. V důsledku toho jsou agroekosystémy ochuzeny o arbuskulární mykorrhizní houby a nemusí poskytovat plný rozsah přínosů pro plodiny (Gosling et al., 2006).

3.2 Endofytické houby

Endofytické houby jsou druhy hub, které žijí uvnitř rostlinného těla (Stone, 2004). Tyto houby jsou spojeny s rostlinnými pletivy, nezpůsobují příznaky nějaké nemoci, která by tímto spojením byla vyvolána, naopak tento vztah rostliny a houby může být vzájemně velmi prospěšný (Stone, 2004). U travních hostitelů (čeleď *Poaceae*) se slovo endofyt používá pro označení zvláštního typu systémové, nepatogenní symbiózy (Stone, 2004). Endofyty trav poskytují svým hostitelům řadu výhod, jako jsou například ochrana proti herbivorům a patogenům, které zvyšují jejich kondici (Stone, 2004). Taxonomicky jsou tyto houby především anamorfami rodu *Neotrophodium* z čeledi *Balansiae* (*Clavicitaceae*), hojně kolonizují pletiva

listů, stébel a kořenů druhů chladnomilných trav a přenášejí se semeny svých hostitelů (Stone, 2004). Sporulace na hostiteli je zcela potlačena a hostitel a houba fungují společně v podstatě jako jeden organismus (Stone, 2004). Tito bezpříznakoví endofyty jílků (*Lolium*), kastřav (*Festuca*) a dalších rodů chudokvětých trav jsou mezidruhovými hybridními kmeny odvozenými od druhů rodu *Epichloë*, které způsobují částečnou nebo úplnou sterilitu hostitele (Stone, 2004). Endofyty jsou důležitou součástí ekosystémů, jsou všudypřítomné a vyskytují se ve všech známých rostlinách, včetně široké škály hostitelů v různých ekosystémech, a proto hrají důležitou roli v přírodním prostředí (Sun a Guo, 2012). Odhaduje se, že existuje více než 1 milion druhů endofytických hub, přičemž se vychází z poměru cévnatých rostlin a druhů hub 1:4 nebo 1:5 (Sun a Guo, 2012).

Endofytické houby můžeme roztrždit do tří kategorií – obligátní endofyty, oportunistické endofyty a fakultativní endofyty (Błaszczyk et al., 2015, Hardoim et al., 2015, Saikkonen et al., 2010). Mezi obligátní endofyty řadíme ty endofytické houby, které pro dokončení svého životního cyklu potřebují hostitelskou rostlinu. Takovým endofytem jsou například houby rodu *Epichloë* (Błaszczyk et al., 2015). K oportunistickým endofytům řadíme ty endofytické houby, které dokážou žít převážně mimo vnitřní prostředí rostlin a jen ojediněle je můžeme najít v rostlinném těle (Hardoim et al., 2015). Fakultativními endofyty je většina endofytů. Endofytické houby tak dokážou žít nezávisle na rostlině, ale mohou část svého životního cyklu strávit uvnitř hostitele (Saikkonen et al., 2010).

3.2.1 Dělení endofytů

Obecně se rozlišují dvě hlavní skupiny endofytických hub, které odrážejí rozdíly v evoluční příbuznosti, taxonomii, rostlinných hostitelích a ekologických funkcích: C-endofyty (klavicipitální endofyty) a NC-endofyty (neklavicipitální endofyty) (Rodriguez et al., 2008). Druhy z čeledi Clavicipitaceae tvoří symbiózy téměř výhradně s travními hostiteli (Sieber, 2007). Travní endofyty kolonizují své hostitele kromě kořenů systematicky a některé druhy se přenášejí vertikálně semeny na další generaci hostitelů (Sieber, 2007). Travní endofyty zvyšují fitness hostitele produkcí alkaloidů, které inhibují herbivorii hmyzu, a metabolitů, které stimulují růst rostlin (Sieber, 2007). Oproti tomu kolonizace hostitele neklavicipitálními endofyty není systematické (Sieber, 2007). Neklavicipitální endofyty představují širokou škálu druhů z několika čeledí třídy *Ascomycetes* a pravděpodobně se vyskytují u všech druhů rostlin mírného pásu včetně trav (Sieber, 2007).

Tyto dvě hlavní skupiny Rodriguez et al., (2008) dále dělí na čtyři třídy. Endofyty první třídy spadají pod C-endofyty a stejně jako NC-endofyty rostou v rostlinných pletivech bez

příznaků nákazy. Jejich přenos je hlavně vertikální, což znamená, že mateřské rostliny přenášejí houby na potomstvo prostřednictvím semen. Endofyty druhé, třetí a čtvrté třídy patří mezi NC-endofyty. Endofyty druhé třídy mohou růst v pletivech nadzemních i podzemních částí rostliny, jsou také schopny rozsáhlé kolonizace těchto tkání. Jejich diverzita je v jednotlivých hostitelích poměrně omezená. Endofyty třetí a čtvrté třídy kolonizují pouze nadzemní tkáně a kořeny. Tyto dvě třídy se liší způsobem kolonizace. Endofyty třetí třídy jsou v rostlině vysoce lokalizované, naopak endofyty čtvrté třídy jsou, stejně jako endofyty druhé třídy, schopny rozsáhlé kolonizace.

Endofyty 1. třídy

Endofyty první třídy, nebo také C-endofyty byly poprvé zaznamenány evropskými badateli na konci 19. století v semenech *Lolium arvense*, *Lolium linicolum* a *Lolium remotum* (Rodriguez et al., 2008). Čeleď *Clavicipitaceae* zahrnuje volně žijící a symbiotické druhy spojené s hmyzem a houbami nebo travinami, rákosinami a ostřicemi. Velké množství druhů této čeledě produkuje alkaloidy, které jsou toxické jak pro zvířata, tak i pro člověka (Khiralla et al., 2016). Mycelium těchto endofytických hub se nachází v mezibuněčných prostorech listových pochev, stonků a oddenků (White et al., 1996). Většina těchto endofytů zvyšuje odolnost hostitelů vůči hmyzu, některé odrazují býložravce (Khiralla et al., 2008). Některé studie dokonce naznačují, že tyto druhy mají antinematodní aktivitu (Khiralla et al., 2008). V důsledku příznivých účinků těchto endofytů nyní šlechtitelé travníků nabízejí řadu kultivarů označených jako „endofyty obohacené“ (Rodriguez et al., 2008).

Endofyty 2. třídy

Endofyty druhé třídy zahrnují druhy patřící do skupiny *Dikarya*. Většina z nich patří do oddělení *Ascomycota*, menší část pak do oddělení *Basidiomycota*. (Rodriguez et al., 2008). Tyto endofyty se od ostatních NC-endofytů liší kolonizací kořenů, stonků a listů. Jsou schopny vytvářet rozsáhlé infekce v rostlinách – přenášejí se prostřednictvím obalů semen, nebo oddenků (Rodriguez et al., 2008). Tyto endofyty pomáhají rostlinám žít i ve stresových podmínkách, jako jsou sucho, vysychání, horko a salinita, dále také zvyšují biomasu kořenů a výhonků (Rodriguez et al., 2008).

Endofyty 3. třídy

Endofyty třetí třídy se od ostatních odlišují jejich výskytem, především v nadzemních tkáních, horizontálním přenosem, tvorbou vysoce lokalizovaných infekcí, potenciálem přinášet

výhody hostitelům, kteří nejsou nutně specifíční pro dané stanoviště a také vysokou biodiverzitou v rostlinách (Rodriguez et al., 2008). Tato třída zahrnuje hyperdiverzitní houby spojené s listy tropických stromů, ale také houby, které nalezneme ve spojení s nadzemními pletivy bezcévnatých rostlin, bezsemenných cévnatých rostlin, jehličnanů a dřevnatých i bylinných nahosemenných rostlin v biomech od tropických lesů po boreální a arktická či antarktická společenstva (Rodriguez et al., 2008). Endofyty třetí třídy se vyskytují také v květech, plodech, dřevě a vnitřní kůře (Rodriguez et al., 2008). Vyznačují se zejména vysokou diverzitou v rámci jednotlivých hostitelských pletiv, rostlin a populací. Například zdánlivě zdravé listy v nížinných tropických lesích obsahují spíše četné, nezávislé infekce, než systémový nebo jinak rozsáhlý růst hyf (Rodriguez et al., 2008).

Endofyty 4. třídy

Mezi endofyty čtvrté třídy řadíme tzv. „dark septate endofytes“ (DSE) (Rodriguez et al., 2008). Vyznačují se přítomností tmavě melanizovaných sept a omezením na kořeny rostlin. Obecně tyto endofyty řadíme mezi askomycetní houby, které jsou konidiální nebo sterilní a které tvoří melanizované struktury, jako jsou intercelulární a intracelulární hyfy a microsclerocia v kořenech (Rodriguez et al., 2008). Někteří zástupci mohou uvnitř kortikálních kořenů vytvářet chlamydospory, které jsou typické pro *M. bolleyi* (O'dell et al., 1993). DSE byly zaznamenány ve spojení s přibližně 600 rostlinami z arktického, antarktického, alpského, subalpského a mírného pásma, ale také z afrických pobřežních plání a nížin některých tropických oblastí (Rodriguez et al., 2008). Vzhledem k tomu, že tyto houby kolonizují živé rostlinné orgány bez jakýchkoli negativních účinků, můžeme říci, že jsou nepatogenní. (Rodriguez et al., 2008). Kolonizace DSE může hrát roli při potlačování patogenů tím, že minimalizuje množství dostupného uhlíku v rhizosféře. Vysoké hladiny melaninu se také mohou případně podílet na produkci sekundárních metabolitů toxických pro býložravce. Tyto faktory dávají rostlinám v symbióze s endofyty čtvrté třídy konkurenční výhodu (Rodriguez et al., 2008). U některých druhů bylo také zjištěno, že jsou schopny produkovat enzymy štěpící sacharidy, které degradují buněčnou stěnu rostlin, díky kterým by bylo endofytům umožněno rozkládat organický substrát a tím se podílet na výživě hostitele (Knapp et al., 2018).

3.3 Rozdíly mezi mykorhizními a endofytickými houbami

Endofytické houby se od mykorhizních liší především absencí lokalizovaného rozhraní specializovaných hyf, absencí synchronizovaného vývoje rostliny a houby a absencí přínosu přenosu živin pro rostlinu (Brundrett, 2006).

Rozdíly mezi endofytickými a mykorhizními houbami můžeme ukázat v několika bodech – umístění houby, funkce, výměna živin, specifikace hostitele, kontakt s rostlinou. Jak už bylo zmíněno, endofytické houby se nachází uvnitř rostlinných pletiv, kdekoliv v rostlinném těle. Funkcí tohoto spojení rostliny s houbou spočívá v tom, že houba rostlině poskytuje výhody, jako jsou odolnost vůči chorobám, nebo tolerance vůči stresu. U výměny nutrientů záleží na daném typu endofytické houby. Některé endofyty zvyšují schopnost rostliny přijímat živiny z půdy, jiné typy rostlině pomáhají s efektivním opětovným využitím živin v jejím vnitřním prostředí (tzv. recyklace živin). Tyto houby se mohou lišit v rámci hostitelské specifity. Některé druhy jsou vysoce specifické ohledně jejich hostitelů a jiné mají širší hostitelský okruh. V neposlední řadě můžeme rozdíly hledat přímo v kontaktu s rostlinou, především v druhu vstupu houby do rostliny. Endofyty do rostliny vstupují skrze stomata nebo rány v rostlině. Na druhé straně houby mykorhizní navazují symbiotický vztah s kořeny rostlin, neprostupují ovšem dovnitř do jejich pletiv. Tyto houby rostlině pomáhají především při získávání živin tím, že díky své hyfové síti rozšiřují svou plochu rostliny. Mykorhizní houby jsou mnohem specifičtější ohledně výběru svých hostitelů. Určité druhy vytvářejí symbiotické vztahy s určitými druhy rostlin. Co se vstupu do rostliny týče, nedochází k úplnému vstupu přímo dovnitř do rostlinných pletiv, ale v případě ektomykorhizy pronikají hyfy do mezibuněčného prostoru kořenů rostliny a v případě endomykorhizy do kořenových buněk rostliny.

4 Význam mykorhizních a endofytických hub

Hlavním přínosem mykorhizních hub je lepší příjem živin, zejména fosforu (St. John, 1993). Ektomykorhizní houby v některých případech přímo napomáhají příjmu vody a existují určité důkazy, že tak mohou činit i houby arbuskulárně mykorhizní (St. John, 1993). Některé druhy ektomykorhizních hub poskytují významnou ochranu před některými patogeny (St. John, 1993). V případě abiotického stresu jsou mechanismy adaptace arbuskulárních mykorhizních hub na tyto stresory obecně spojeny se zvýšenou hydrominerální výživou, selektivitou iontů, genovou regulací, produkcí osmolytů a syntézou fytohormonů a antioxidantů (Diagne et al., 2020).

Kaya a kolegové (2003) například zjistili, že u *Citrullus lanatus* (melounu vodního) mykorhizní kolonizace zlepšila nejen výnos rostlin a efektivitu využití vody, ale také kvalitu

plodů samotných. Podobných výsledků dosáhli i Bona a kolegové (2017) u rostlin rajčat, kde se v plodech zvýšila koncentrace cukrů, organických kyselin a vitamínu C. Dále bylo prokázáno, že arbuskulární mykorhizní houby zlepšily výkonnost sazenic *Prunus persica* (broskvoň obecná) v laboratorních podmínkách a také významně zvýšily koncentraci K, Mg, Fe a Zn v listech a kořenech, koncentraci Ca v listech a koncentraci Cu a Mn v kořenech (Wu et al., 2011).

Endofytické houby tvoří nepatogenní složky rostlinného mikrobiomu. (Bacon and White, 2016). Uvádí se, že endofyty se řadí do jedné nebo více ze tří hlavních funkčních skupin: 1) zmírňují abiotický stres hostitelské rostliny, 2) brání hostitelské rostliny před biotickými stresory a 3) podporují hostitele z hlediska výživy, a to buď zvýšením obsahu dusíku, fosforu, železa nebo vitaminů (Bacon and White, 2016). Tento funkční aspekt neptagenních endofytů zvyšuje potenciál pro návrh a konstrukci mikrobiomů pro plodiny s cílem zlepšit jejich pěstování s nižším přísunem agrochemikálií a s nižšími náklady (Bacon and White, 2016).

Endofyty mohou vytvářet různé sekundární metabolity, které potenciálně vykazují biologickou aktivitu proti škůdcům nebo patogenům (Kusari et al., 2012a). Mezi příklady bioaktivních metabolitů se řadí paklitaxel, podofylotoxin, deoxypodofylotoxin, kaptothecin a další látky (Kusari et al., 2012a). Endofytický druh *Eupenicillium parvum*, který byl izolován z rostliny *Azadirachta indica*, vytvářel přírodní insekticid azadirachtin, který se vyznačuje růst regulujícími vlastnostmi (Kusari et al., 2012b). Dále byl endofyt *Phialocephala fortinii*, izolovaný z oddenků rostliny *Podophyllum peltatum*, využit k extrakci lignanu podofylotoxinu, který představuje cenný klinický prekurzor pro protinádorová léčiva (Eyberger et al., 2006). Dále byly také identifikovány některé důležité prekurzory, jako je kamptothecin a 10-hydroxycamptothecin, pro protinádorová léčiva, z endofytického druhu *Fusarium solani* (Shweta et al., 2010).

5 Charakteristika organismů

5.1 *Microdochium bolleyi*

Taxonomické zařazení - říše: *Fungi* (houby), oddělení: *Ascomycota*, třída: *Sordariomycetes*, řád: *Xylariales* (dřevnatkotvaré)

Microdochium bolleyi, dříve *Idriella bolleyi*, je endofytická houba, která kolonizuje kořeny pšenice a dalších obilovin. *M. bolleyi* patří mezi tzv. tmavé septované endofyty. Tmavé septované endofyty (dark septate endophytes - DSE) tvoří skupina kosmopolitně rozšířených hub, většinou patřících mezi *Ascomycetes* zařazených do řádů jako *Helotiales*, *Pleosporales*,

Sordariales a *Xylariales*. Vyznačují se melanizovanými septovanými hyfami a mikroesklerotiiemi nebo chlamydosporami, které mohou kolonizovat parenchymatické tkáně kořenů, aniž by způsobovaly příznaky onemocnění na hostitelské rostlině (Rothen, 2018).

Matušinský et al. (2022) ve své práci uvádí, že *M. bolleyi* v kultuře vytváří jednobuněčné konidie půlměsíčitého tvaru a tmavě hnědé hyfy. Může též uvolňovat oranžový pigment. Dále také uvádí, že *M. bolleyi* vykazuje supresi různých rostlinných patogenů obilovin, jako je například *Oculimacula yallunda*. Bylo také dokázáno, že *M. bolleyi* výrazně snížilo účinky houbového rostlinného patogenu *Fusarium graminearum*. (Matušinský et al., 2022)

5.2 *Serendipita indica*

Taxonomické zařazení - říše: *Fungi* (houby), oddělení: *Basidiomycota*, třída: *Agaricomycetes* (stopkovýtrusné), řád: *Sebacinales*, čeleď: *Serendipitaceae*, rod: *Serendipita*

Serendipita indica, dříve *Piriformospora indica*, je endofytická houba kolonizující kořeny rostlin. Jakožto endofytická houba rostlinám pomáhá růst, přijímat živiny a zvyšuje odolnost rostlin vůči stresu. Tato houba taktéž mění sekundární metabolity mnoha hospodářských rostlin a podporuje celkový růst a produkci semen mnoha rostlin (Boorbori & Zhang, 2022).

S. indica je pravděpodobně nejznámějším endofytem. Byla poprvé izolována z *Prosopis juliflora* a *Ziziphus nummularia* v poušti Tharr, která se nachází v Rádžasthánu v Indii (Boorbori & Zhang, 2022). Je fylogeneticky podobná arbuskulárně mykorhizním houbám (AMF) a může kolonizovat mnoho hostitelských rostlin (Boorbori & Zhang, 2022). *S. indica* není přímo vázaná pouze na jeden druh hostitele. Mezi jejími hostiteli můžeme najít například suchovzdorné keře a stromy, letničky, trvalky, nahosemenné rostliny a mechorosty. Jak ve své práci Boorbori a Zhang (2022) uvádí, její hlavní výhodou je, že na rozdíl od arbuskulárních mykorhizních hub ji lze rychle pěstovat v umělém médiu, tudíž je užitečná též jako biohnojivo v zemědělských oblastech a zahradách.

Co se morfologie týče, Singhal a kolegové (2017) uvádí, že *S. indica* má bílé až téměř hyalinní, tenkostěnné hyfy o průměru 0,7-3,5 μm . Tyto hyfy jsou silně propletené provazce, které se nepravidelně větví. Na stěnách těchto hyf lze pozorovat vnější usazeniny, polysacharidy nebo hydrofobní proteiny. *S. indica* má velké výrazné chlamydospory, které se mohou objevovat jednotlivě, nebo ve shlucích. Tyto chlamydospory se mění v průběhu dozrávání. Zpočátku jsou tenkostěnné a hyalinní, ale v průběhu dozrávání, a především v době zralosti se stávají tlustostěnnými.

5.3 *Brachypodium distachyon*

Taxonomické zařazení – říše: *Plantae* (rostliny), oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné), třída: *Liliopsida* (jednoděložné), řád: *Poales* (lipnicotvaré), čeleď: *Poaceae* (lipnicovité), rod: *Brachypodium* (válečka)

Brachypodium distachyon je jednoletá samosprašná tráva s životním cyklem kratším než 4 měsíce (Draper et al., 2001). *B. distachyon* má vlastnosti typické pro modelové rostliny, má poměrně malý vzrůst (15-20 cm), 8-12 týdnů dlouhý životní cyklus, její genom je jedním z nejmenších mezi diploidními travními genomy (asi 300 Mbp) a lze ji geneticky transformovat pomocí bakterie *Agrobacterium* (Li et al., 2012). Patří mezi C3 rostliny, vytváří klásky, které obvykle obsahují kolem 10-12 semen, velikost jednoho semene je stejně jako u ostatních *Poaceae* asi 8x2 mm. Na jejich hladkém povrchu můžeme najít rýhy (tenké prohlubně) (Hong et al., 2011). Různé ekotypy vykazují řadu adaptací na prostředí, jako jsou například rozdíly v době kvetení, požadavcích na jarovizaci a odolnost vůči chorobám (Li et al., 2012). Charakteristickým rysem druhů podčeledi *Pooideae* je jejich adaptace na podmínky mírného pásma, to se odráží v celosvětovém rozšíření trav z čeledi *Poaceae* (Li et al., 2012).

B. distachyon se stal první druhem trávy z čeledi *Poaceae*, jehož genom byl plně sekvenován. Rod *Brachypodium* je fylogeneticky sesterskou skupinou k čeledi *Triticeae* (obiloviny) a *Poaeae*, které poskytly důvody pro sekvenování genomu *B. distachyon* za účelem vytvoření modelu vhodnějšího pro trávy mírného pásu než například *Oryza sativa* (rýže) (Li et al., 2012). Studie na *B. distachyon* přinesly nový pohled na strukturu a fyziologii rostlinných buněčných stěn, vývoji a chemické složení endospermu a genetický základ odolnosti vůči chladu (Kellogg, 2015). Kromě oblastí, ve kterých se v současnosti používá, je *B. distachyon* jedinečně vhodný pro studium vývoje květů, žilnatiny, kontroly trvalého a jednoletého habitatu a organizace genomu (Kellogg, 2015).

PRAKTICKÁ ČÁST

6 Materiál a metody

6.1 Biologický materiál

Osivo *Brachypodium distachyon* linie Bd21 z Joint Genome Institute (<https://jgi.doe.gov/>)
8 izolátů *Microdochium bolleyi* (Mb267, Mb295, Mb18-301, Mb263, Mb215, Mb123, Mb93, Mb101) pracovní sbírka katedry botaniky, izoláty získané z kořenů pšenice na územích ČR v letech 2018, 2019

Izolát *Serendipita indica* ze sbírky the CBS Collection of yeasts and filamentous fungi, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (WI-KNAW), the Netherlands

Výsevní substrát KLASSMAN Seedlingsubstrat (Modular Seed Substrate)

6.2 Použité chemikálie a soupravy

Použité chemikálie

- qPCR 2x SYBR Master Mix (Top Bio)
- Primery MbRT_ITS (Eastport)
- Primery BdFIM (Eastport)
- Deionizovaná nuclease free PCR voda
- 70% ethanol

Použité soupravy

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

6.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Cyclor Real-Time PCR CFX Connect (BIO-RAD)
- Spektrofotometr Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)
- Vortex 1 shaker
- Stolní centrifuga 541D (Eppendorf)
- ThermoCell heating block 202 (BIOER)
- Mikroskop BX60 (Olympus) s CDD kamerou DP73-1-51 WD
- Laboratorní autokláv VX-55 (Systec)

6.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

6.4.1 Založení experimentu ve skleníku

6.4.1.1 Příprava inokula

Inokula 8 izolátu *M. bolleyi* a 1 izolát *S. indica* byla kultivována na semenech prosa ve tmě po dobu tří týdnů při teplotě 20 °C. Před kultivací bylo do každého plastového sáčku vloženo 200 g semen prosa a 50 ml destilované vody. Následně byl tento obsah dvakrát sterilizován párou při 120 °C po dobu 20 minut. Každý z izolátů byl kultivován zvlášť. Kontrolní varianta byla kultivována bez přidaného kmene hub.



Obrázek 1: Ukázka přípravy inokula

6.4.1.2 Setí a odběr vzorků

Dne 9. 3. 2023 byl založen experiment ve skleníku. Nejdříve se provedl výsev *B. distachyon*. Při výsevu byla provedena inokulace endofyty *M. bolleyi* a *S. indica*. *B. distachyon* bylo vyseto po 10 obilkách do celkem 100 květináčů. Každá varianta inokula (2,5 g na květináč) byla aplikována do 10 květináčů (8x *M. bolleyi* – Mb267, Mb295, Mb18-301, Mb263, Mb215, Mb123, Mb93, Mb101, 1x *S. indica* - SI) a zbylých 10 květináčů bylo použito jako kontrolní vzorek bez endofytu (K). Do těchto kontrolních květináčů bylo přidáno pouze sterilní proso. Dne 23. 3. 2023 byly vzešlé rostliny prothány, aby v květináčích nedošlo k utlačování a všechny rostliny měly stejné podmínky. Po prothání v každém květináči zůstaly 4 rostliny. Následně se rostliny nechaly narůst a každý měsíc byl odebírán vzorek.

Každý odběr probíhal tak, že se ze sady odebralo deset květináčů (jeden z každé varianty). Rostliny byly vyjmuty z květináčů a kořeny byly umyty pod tekoucí vodou. Následně bylo

zaznamenáno, v jaké fázi růstu byly rostliny odebrány (fáze růstu byly určeny podle Hong et al., 2011) a byla změřena délka nadzemní části rostliny a délka jejich kořenů. Dvěma rostlinám z každé varianty byly zkráceny kořeny a následně byly vloženy do epruvety se 70% ethanolem. Kořeny uložené do epruvet s ethanolem byly využity pro mikroskopování. Zbylé dvě rostliny byly ponechány na usušení. Z těchto rostlin se později izolovala DNA. Vzorky byly takto odebrány po dobu pěti měsíců.

Nakonec zbylo 5 květináčů od každé varianty, tj. 20 rostlin každé varianty. Ty byly sklizeny a umístěny po 4 rostlinách do papírových sáčků. Vzorky byly sušeny při 50 °C 8 hodin, aby došlo k vyrovnání vlhkosti u všech variant a poté byla zvážena zvlášť hmotnost celkové nadzemní biomasy a semen. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí testů ANOVA a TUKEY vypracovaných díky softwaru Statistica.



Obrázek 2: Ukázka výsevu *Brachypodium distachyon*



Obrázek 3: Ukázka měření (vlevo – 1. odběr, varianta Mb267) a sušení (vpravo – 2. odběr, kontrolní varianta) rostlin *Brachypodium distachyon*



Obrázek 4: Kořeny *Brachypodium distachyon* v 70% ethanolu, 3. odběr

6.4.2 Mikroskopování kořenů

Kořeny *B. distachyon*, které byly odebrány a naloženy do ethanolu, byly mikroskopovány za účelem stanovit úspěšnost kolonizace endofyty *M. bolleyi* a *S. indica*. Za pomoci světelného mikroskopu byla vizuálně ohodnocena přítomnost hub v jednotlivých kořenech na základě preparátové metody (Giovanetti et Mosse, 1980) upravené podle Masarykovy univerzity – Metoda stanovení kolonizace kořenů, 2001. Tento proces je založen na zaznamenávání klastrů chlamydospor vytvořených endofyty *M. bolleyi* a *S. indica* v kortikálních buňkách kořenů *B. distachyon*. Jelikož *M. bolleyi* patří mezi dark septate endofytes, které vytvářejí chlamydospory tmavě hnědé barvy, bylo možné kořeny pozorovat i bez obarvení houbových hyf. U mikroskopování *S. indica* byly kořeny nejdříve zprůhledněny 2,5% hydroxidem draselným (KOH), poté byly okyseleny 1% kyselinou chlorovodíkovou (HCl) a nakonec byly obarveny 0,05% trypanovou modří v laktoglycerolu (Bleša et al., 2021). Pro účely pozorování byly kořeny nastříhány na segmenty o délce cca 1 cm. U každé rostliny naložené v ethanolu bylo z jednoho kořene mikroskopováno alespoň patnáct segmentů, které byly následně paralelně za sebou položeny na podložní sklíčko. Použité byly segmenty uštířené v blízkosti kořenového krčku. K nastříhaným segmentům bylo přidáno pár kapek destilované vody. Následně byl preparát překryt krycím sklíčkem. Segmenty byly dále pozorovány mikroskopem při zvětšení 200x. Při mikroskopování byla zaznamenávána přítomnost či nepřítomnost klastrů chlamydospor v kořenech v pozorovaných kořenových segmentech. Jednotlivé nálezy klastrů chlamydospor byly foceny pomocí mikroskopu BX60 (Olympus) s CDD kamerou. Ze zapsaných výsledků bylo stanoveno procentuální zastoupení kolonizovaných kořenů a výsledky byly následně porovnány se zjištěnou přítomností endofytů pomocí kvantitativní Real-time

PCR. Všechny zjištěné hodnoty byly analyzovány ANOVA a TUKEY testy vypracovaných díky softwaru Statistica.

6.4.3 Izolace DNA

DNA byla izolována z usušených kořenů rostlin *B. distachyon*. Pro účely izolace DNA byla odebrána stejná část kořenů jako pro mikroskopování. Z každé varianty v každém odběru byla izolována DNA ze 2 rostlin současně. Izolace DNA byla provedena pomocí DNeasy mericon Food Kit (50) podle pokynů protokolu: Standard Protocol (200 mg).

Vzorek byl umístěn do vychlazené a sterilizované třecí misky a poté byl homogenizován pomocí tloučku a tekutého dusíku na jemný prášek. Tento jemný prášek byl poté přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky.

Do rozdrčeného vzorku bylo dodáno 1000 μ l food lysis pufru a 2,5 μ l proteinázy K. Po přidání látek byl vzorek vortexován. Poté byl vzorek inkubován po dobu 30-50 minut na ThermoCell heating bloku při 60 °C. Během toho byl vzorek každých 5 minut vortexován. Vzorky byly dále schlazeny v namražené destičce na pokojovou teplotu. Lyzát byl centrifugován po dobu 5 minut při 2500 otáčkách. Do prázdné mikrozkušavky (typ Ependorf) bylo napipetováno 500 μ l chloroformu. Po centrifugaci byly vzorky opatrně vytaženy z centrifugy a ze supernatantu bylo 700 μ l přepipetováno do chloroformu tak, aby nedošlo k porušení sraženin. Roztok byl poté 15 sekund vortexován a následně byl centrifugován při maximálních otáčkách (14000 x g) po dobu 15 minut. Do další prázdné mikrozkušavky bylo napipetováno 350 μ l PB pufru (Binding buffer). Po centrifugaci z předchozího kroku bylo přepipetováno 350 μ l horní vodné vrstvy do mikrozkušavky s PB pufrem. Tento roztok byl promíchán opětovným nasáváním a vypouštěním pomocí pipety a následně byl celý roztok přepipetován do QIAquick Spin kolony umístěné do 2 ml sběrné zkumavky. Roztok v koloně byl centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 1 minuty. Po centrifugaci byl odstraněno to, co protéklo skrze membránu v koloně. Do kolony bylo napipetováno 500 μ l AW2 pufru a roztok byl opět centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 1 minuty. Po centrifugaci byl opět odstraněno to, co protéklo skrze membránu v koloně. Poté byla kolona opět centrifugována při maximálních otáčkách po dobu 1 minuty, aby se membrána v koloně vysušila. Kolona byla přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky. Na membránu bylo připipetováno 150 μ l EB pufru (Elution buffer) a proběhla inkubace při pokojové teplotě (15-25 °C) po dobu 1 minuty. Poté byla provedena centrifugace při maximálních otáčkách po dobu 1 minuty, při které došlo k uvolnění DNA. Koncentrace DNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop a byla dále ředěna na koncentraci 5 ng · nl⁻¹.



Obrázek 5: DNeasy mericon Food Kit (50)

6.4.4 Kvantitativní Real-time PCR (qPCR)

Během přípravy reakční směsi pro všechny qPCR byla smíchána jednotlivá chemická činidla (reagencie) – Nukleáz-prostá voda pro PCR, SYBR Green Master Mix, Primer F a Primer R. Koncentrace DNA vzorků pro každou reakci byla pečlivě stanovena pomocí spektrofotometru Nanodrop a následně byly vzorky zředěny na požadovanou koncentraci ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Připravená směs pro qPCR byla důkladně promíchána ve vortexu, poté centrifugována a následně rozpipetována do mikrozkušavek ve stripu, které byly umístěny do chladicího stojáčku. Do každé mikrozkušavky byly poté přidány $2 \mu\text{l}$ zředěného vzorku DNA (tj. $10 \text{ ng} \cdot \text{nl}^{-1}$). Součástí každé qPCR reakce byla také negativní kontrola, která obsahovala vodu místo DNA. Díky tomu bylo ověřeno, že žádné z reaktiv nebyly kontaminovány templátovou DNA.

Pomocí primerů MbRT_ITSF/R pro amplifikaci oblastí ITS rDNA (Matusínský et al., 2024) byla provedena kvantifikace endofytu *M. bolleyi* v rostlinách *B. distachyon*. Dále byly využity primery BdFIM pro amplifikaci referenčního genu *BdFIM* – *B. distachyon fimbrin-like protein gene* (Zhu et al., 2014). V reakci byly použity DNA vzorky izolované z rostlin *B. distachyon* ze všech pěti odběrů, za účelem sledování množství endofytu během pěti měsíců. Jako standard byl využit vzorek z předchozí analýzy využitý ve studii Matusínský et al., 2024 (kořen *B. distachyon* s kolonizací 23,4 % ověřenou mikroskopem).

7 VÝSLEDKY

7.1 Odběr vzorků

Každý měsíc (počínaje 6. 4. 2023) po dobu pěti měsíců byl prováděn odběr vzorků. Při každém odběru bylo zaznamenáno, v jaké fázi růstu byly rostliny odebrány a byla změřena délka nadzemní části rostliny a délka jejich kořenů. V souhrnné tabulce (tabulka 1) můžeme vidět zaznamenané hodnoty. Vzhledem k možnému přetržení kořenů je jejich zjištěná délka pouze orientační.

Tabulka 1: Průměrné délky rostlin a převládající fáze růstu jednotlivých odběrů, vždy využity 4 rostliny každé varianty

Varianta	ØRozměry/fáze	1. odběr	2. odběr	3. odběr	4. odběr	5. odběr
Kontrola	Výška rostliny [cm]	10,00	22,25	33,50	47,00	45,00
	Směrodatná chyba	0,00	0,75	1,85	1,08	0,71
	CL -95 %	10,00	24,64	39,38	50,44	47,25
	CL +95 %	10,00	19,86	27,62	43,56	42,75
	Délka kořene [cm]	9,50	16,25	19,00	14,75	11,25
	Směrodatná chyba	0,29	0,63	0,41	1,11	0,25
	CL -95 %	10,42	18,25	20,30	18,28	12,05
	CL +95 %	8,58	14,25	17,70	11,22	10,45
	Fáze růstu	22 odnožování	35 prodlužování	71 vývoj plodů	87 zrání	93 stárnutí
SI	Výška rostliny [cm]	9,75	24,75	36,50	39,00	47,50
	Směrodatná chyba	0,25	0,48	3,23	3,11	0,87
	CL -95 %	10,55	26,27	46,77	48,89	50,26
	CL +95 %	8,95	23,23	26,23	29,11	44,47
	Délka kořene [cm]	9,00	16,75	19,25	18,00	17,50
	Směrodatná chyba	0,00	0,85	1,31	1,47	1,55
	CL -95 %	9,00	19,47	23,43	22,68	22,45
	CL +95 %	9,00	14,03	15,07	13,32	12,55
	Fáze růstu	22 odnožování	35 prodlužování	73 vývoj plodů	85 zrání	93 stárnutí
Mb295	Výška rostliny [cm]	8,25	23,25	31,75	37,25	52,75
	Směrodatná chyba	0,75	0,25	0,48	3,82	0,63
	CL -95 %	10,64	24,05	33,27	49,39	54,75
	CL +95 %	5,86	22,45	30,23	25,11	50,75
	Délka kořene [cm]	8,50	13,25	18,00	14,75	16,00
	Směrodatná chyba	0,29	0,48	1,08	4,99	1,29
	CL -95 %	9,42	14,77	21,44	30,63	20,11
	CL +95 %	7,58	11,73	14,56	-1,13	11,89
	Fáze růstu	21 odnožování	34 prodlužování	53 metání	77 vývoj plodů	89 zrání
Mb267	Výška rostliny [cm]	10,50	22,25	38,25	44,75	49,50
	Směrodatná chyba	0,65	0,63	0,63	0,85	1,26
	CL -95 %	12,55	24,25	40,25	47,47	53,50
	CL +95 %	8,45	20,25	36,25	42,03	45,50
	Délka kořene [cm]	9,25	13,75	18,25	17,50	11,50
	Směrodatná chyba	0,48	0,63	1,38	2,72	2,02
	CL -95 %	10,77	15,75	22,63	26,17	17,93
	CL +95 %	7,73	11,75	13,87	8,83	5,07
	Fáze růstu	22 odnožování	34 prodlužování	71 vývoj plodů	77 vývoj plodů	Mrtvá rostlina

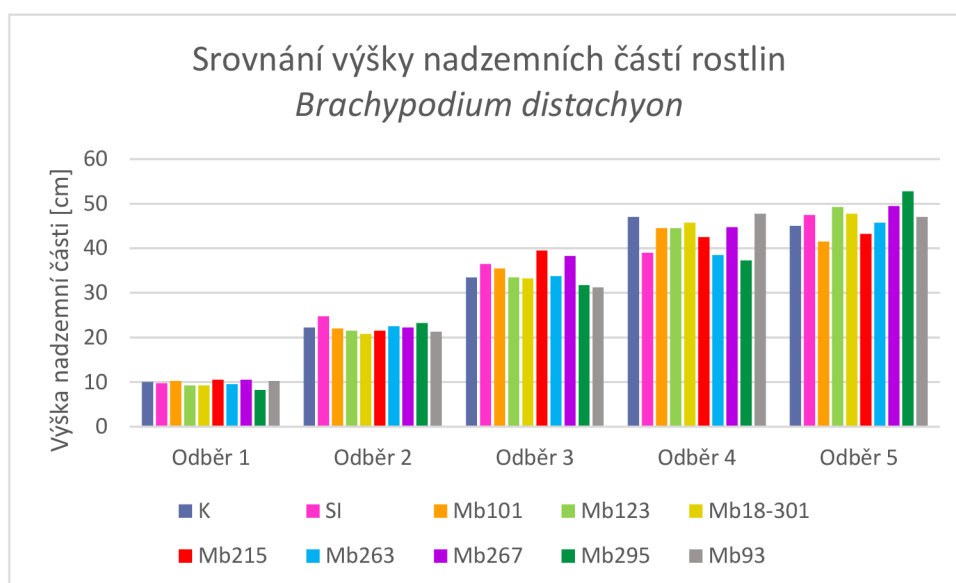
Mb18-301	Výška rostliny [cm]	9,25	20,75	33,25	45,75	47,75
	Standardní chyba	0,25	0,63	2,39	1,65	2,46
	CL -95 %	10,05	22,75	40,87	51,01	55,59
	CL +95 %	8,45	18,75	25,63	40,49	39,91
	Délka kořene [cm]	9,50	13,25	19,50	17,00	12,50
	Standardní chyba	0,65	0,85	1,04	1,58	2,25
	CL -95 %	11,55	15,97	22,81	6,61	19,68
	CL +95 %	7,45	10,53	16,19	11,97	5,32
Fáze růstu	22	35	69	89	89	
		odnožování	prodlužování	kvetení	zrání	zrání
Mb215	Výška rostliny [cm]	10,50	21,50	39,50	42,50	43,25
	Standardní chyba	0,29	0,87	1,94	1,32	2,84
	CL -95 %	11,42	24,26	45,66	46,71	52,29
	CL +95 %	9,58	18,74	33,34	38,29	34,21
	Délka kořene [cm]	9,25	15,75	18,00	17,25	13,50
	Standardní chyba	0,63	1,11	1,78	1,31	1,32
	CL -95 %	11,25	19,28	23,66	21,43	17,71
	CL +95 %	7,25	12,22	12,34	13,07	9,29
Fáze růstu	22	35	69	77	93	
		odnožování	prodlužování	kvetení	vývoj plodů	stárnutí
Mb263	Výška rostliny [cm]	9,50	22,50	33,75	38,50	45,75
	Standardní chyba	0,50	0,50	1,65	0,96	0,25
	CL -95 %	11,09	24,09	39,01	41,55	46,55
	CL +95 %	7,91	20,91	28,49	35,45	44,95
	Délka kořene [cm]	8,75	17,00	16,00	14,25	12,50
	Standardní chyba	0,48	1,47	0,41	1,80	3,84
	CL -95 %	10,27	21,68	17,30	19,97	24,72
	CL +95 %	7,23	12,32	14,70	8,53	0,28
Fáze růstu	21	35	57	87	Mrtvá	
		odnožování	prodlužování	metání	zrání	rostlina
Mb123	Výška rostliny [cm]	9,25	21,50	33,50	44,50	49,25
	Standardní chyba	0,48	0,65	0,65	1,04	0,48
	CL -95 %	10,77	23,55	35,55	47,81	50,77
	CL +95 %	7,73	19,45	31,45	41,19	47,73
	Délka kořene [cm]	9,75	21,00	17,50	17,25	11,75
	Standardní chyba	0,48	1,96	1,19	1,11	0,85
	CL -95 %	11,27	27,23	21,29	20,78	14,47
	CL +95 %	8,23	14,77	13,71	13,72	9,03
Fáze růstu	21	35	71	77	89	
		odnožování	prodlužování	vývoj plodů	vývoj plodů	zrání

Mb93	Výška rostliny [cm]	10,25	21,25	31,25	47,75	47,00
	Standardní chyba	0,25	0,48	0,95	2,43	2,61
	CL -95 %	11,05	22,77	34,26	55,48	55,32
	CL +95 %	9,45	19,73	28,24	40,02	38,68
	Délka kořene [cm]	8,75	15,00	17,25	15,25	10,25
	Standardní chyba	0,25	0,91	0,48	1,03	0,63
	CL -95 %	9,55	17,91	18,77	18,53	12,25
	CL +95 %	7,95	12,09	15,73	11,97	8,25
Fáze růstu	21	34	57	77	93	
	odnožování	prodlužování	metání	vývoj plodů	stárnutí	
Mb101	Výška rostliny [cm]	10,25	22,00	35,50	44,50	41,50
	Standardní chyba	0,25	0,91	0,87	0,87	2,18
	CL -95 %	11,05	24,91	38,26	47,26	48,44
	CL +95 %	9,45	19,09	32,74	41,74	34,56
	Délka kořene [cm]	8,75	13,00	15,25	17,00	11,50
	Standardní chyba	0,25	0,71	0,85	1,08	1,44
	CL -95 %	9,55	15,25	17,97	20,44	16,09
	CL +95 %	7,95	10,75	12,53	13,56	6,91
Fáze růstu	21	35	57	77	89	
	odnožování	prodlužování	metání	vývoj plodů	zrání	

Legenda: (SI) – *Serendipita indica*, (Mb295, Mb267, Mb18-301, Mb215, Mb263, Mb123, Mb93, Mb101) – kmeny *Microdochium bolleyi*, (CL -95 %, CL +95 %) - konfidenční limity
Fáze růstu určeny dle (Hong et al., 2011).

Ze zaznamenaných růstových fází u jednotlivých odběrů můžeme pozorovat, že při prvním a druhém odběru se fáze nijak zvlášť nelišily. Při prvním odběru byly všechny rostliny ve fázi odnožování a při druhém odběru byly všechny rostliny ve fázi prodlužování. Při třetím odběru můžeme pozorovat jisté odchylky. U kontrolních vzorků (vzorky bez endofytu), u rostlin, ke kterým byl přidán endofyt *S. indica* a u rostlin, kterým byly přidány endofyty *M. bolleyi*, konkrétně varianty Mb123 a Mb267, můžeme pozorovat fázi vývoje plodů (tzn. že tyto rostliny byly při tomto odběru zatím v nejvyšší dosažené fázi růstu). Naopak rostliny, ke kterým byly přidány varianty Mb101, Mb263, Mb295 a Mb93, se nacházely v nejnižší růstové fázi daného odběru, a to ve fázi metání. Při čtvrtém odběru svou růstovou fází vyčnívaly rostliny s variantami Mb18-301, Mb263, rostliny, ke kterým byla přidána *S. indica* a kontrolní vzorky. Všechny tyto rostliny se nacházely ve fázi zrání. Zbytek vzorků se nacházel ve fázi vývoje plodů. Dále také můžeme pozorovat, že při pátém a posledním odběru byly kontrolní vzorky, rostliny, ke kterým byla přidána *S. indica* a rostliny, ke kterým bylo přidáno *M. bolleyi* (varianty Mb215 a Mb93) ve fázi stárnutí. Rostliny, ke kterým byly přidány varianty Mb263 a Mb267 byly již mrtvé. Zbytek rostlin byl ve fázi zrání.

Co se výšky nadzemní části rostliny týče (jak můžeme vidět na obrázku 6) rozdíly u jednotlivých rostlin nebyly nijak výrazné.



Obrázek 6: Srovnání výšky nadzemních částí rostlin (*Brachypodium distachyon*)

Zbýlých 200 rostliny (20 rostlin každé varianty) bylo využito pro sušení a následné zvážení hmotnosti celkové nadzemní biomasy a hmotnosti semen. Jak můžeme pozorovat v tabulce 2, největší hmotnost celkové nadzemní biomasy měla kontrola (varianta bez endofytů), zatímco nejmenší hmotnost měla varianta Mb263. Varianta, ke které byla přidána *S. indica* měla třetí nejmenší hmotnost celkové nadzemní biomasy. Co se hmotnosti semen týče, nejvyšší hmotnost semen měla opět kontrola a nejmenší opět varianta Mb263. Varianta s přidanou *S. indica* měla opět třetí nejmenší hmotnost. Tyto výsledky můžeme pozorovat v tabulce 3.

Z naměřených záznamů byly všechny hodnoty následně analyzovány pomocí testů ANOVA a TUKEY. Pomocí ANOVA testu jsme zjišťovali, zda existuje statisticky významný rozdíl v hmotnosti celkové nadzemní biomasy a hmotnosti semen mezi různými variantami. Díky tomu, že u obou variant testů byly p-hodnoty menší, než námi zvolená hladina významnosti (0,05), můžeme říct, že existuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými variantami. Výsledky testu ANOVA můžeme vidět v tabulkách 4 a 6. Jelikož ANOVA test odhalil významný rozdíl, bylo nutné provést také TUKEY test, který nám pomohl určit, které varianty se od sebe statisticky lišily. Výsledky tohoto testu můžeme pozorovat v tabulkách 5 a 7.

Tabulka 2: Hmotnost celkové nadzemní biomasy rostlin *Brachypodium distachyon*, N=20

Varianta	Hmotnost celkové biomasy [g]	Směrodatná odchylka	Standardní chyba	CI +95%	CI -95%
Kontrola	4,82	0,76	0,34	3,87	5,77
SI	3,99	0,72	0,32	3,09	4,89
Mb295	4,69	0,47	0,21	4,11	5,27
Mb267	4,33	0,41	0,18	3,82	4,84
Mb18-301	4,53	0,76	0,34	3,59	5,46
Mb215	3,75	1,09	0,49	2,39	5,11
Mb263	3,01	0,61	0,27	2,26	3,77
Mb123	4,31	0,62	0,28	3,54	5,09
Mb93	4,71	0,53	0,24	4,05	5,37
Mb101	4,42	0,67	0,30	3,59	5,25

Tabulka 3: Hmotnost semen rostlin *Brachypodium distachyon*, N=20

Varianta	Hmotnost semen [g]	Směrodatná odchylka	Standardní chyba	CI +95%	CI -95%
Kontrola	1,43	0,23	0,10	1,15	1,72
SI	1,12	0,32	0,14	0,73	1,52
Mb295	1,38	0,13	0,06	1,22	1,55
Mb267	1,38	0,06	0,03	1,31	1,45
Mb18-301	1,13	0,20	0,09	0,88	1,38
Mb215	1,04	0,54	0,24	0,37	1,71
Mb263	0,72	0,39	0,17	0,24	1,14
Mb123	1,30	0,25	0,11	0,99	1,60
Mb93	1,31	0,36	0,16	0,87	1,76
Mb101	1,34	0,24	0,11	1,04	1,65

Legenda: (SI) – *Serendipita indica*, (Mb295, Mb267, Mb18-301, Mb215, Mb263, Mb123, Mb93, Mb101) – kmeny *Microdochium bolleyi*, (N) – počet vážených rostlin každé varianty

Tabulka 4: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti celkové nadzemní biomasy u jednotlivých variant *Brachypodium distachyon*

	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	p
Vzorek	13,4661	9	1,4962	3,047	0,008186
Opakování	1,3476	4	0,3369	0,686	0,606344
Chyba	17,6805	36	0,4911		

Tabulka 5: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti celkové nadzemní biomasy 20 ks rostlin u jednotlivých variant, $\alpha=0,05$,

Varianta	Celková biomasa [g]	
K	4,820	a
Mb93	4,708	a
Mb295	4,688	a
Mb18-301	4,526	a
Mb101	4,420	a b
Mb267	4,330	a b
Mb123	4,314	a b
SI	3,986	a b
Mb215	3,746	a b
Mb263	3,014	b

Tabulka 6: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti semen u jednotlivých variant *Brachypodium distachyon*

	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	p
Vzorek	2,11300	9	0,23478	2,4515	0,027165
Opakování	0,16357	4	0,04089	0,4270	0,788133
Chyba	3,44775	36	0,09577		

Tabulka 7: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti semen 20 ks rostlin u jednotlivých variant, $\alpha=0,05$

Varianta	Celková biomasa [g]	
K	1,434	a
Mb295	1,384	a
Mb267	1,376	a b
Mb101	1,344	a b
Mb93	1,312	a b
Mb123	1,298	a b
Mb18-301	1,132	a b
SI	1,122	a b
Mb215	1,040	a b
Mb263	0,724	b

7.2 Mikroskopování

Pomocí mikroskopování bylo zjišťováno, zda se v kořenech rostlin *B. distachyon* jednotlivých sběrů nacházejí shluky chlamydospor, což naznačuje přítomnost endofytů *M. bolleyi* a *S. indica*. Pro mikroskopické pozorování byly použity segmenty odebrané poblíž kořenového krčku, neboť v této oblasti byla kolonizace endofyty kořenů nejvýraznější. Morfologii pozorovaných chlamydospor lze pozorovat na obrázcích 7, 8 a 9. Porovnání všech výsledků v průběhu pěti měření můžeme pozorovat na obrázku 10. Při pátém odběru můžeme pozorovat masivní kolonizaci buněk kořenů. Zjištěná přítomnost či nepřítomnost klastrů chlamydospor v kořenech *B. distachyon* jednotlivých odběrů můžeme vidět zaznamenaný v tabulce 8. U pátého odběru si můžeme všimnout kolonizace u kontrolních vzorků (vzorků bez endofytů).

Z naměřených záznamů byly opět všechny hodnoty následně analyzovány pomocí testů ANOVA a TUKEY, kde jsme zjišťovali, zda existuje statisticky významný rozdíl v procentuálním zastoupení kolonizovaných kořenů mezi různými variantami. Díky tomu, že p-hodnota (0,000000) byla menší, než námi zvolená hladina významnosti (0,05), můžeme říct, že existuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými variantami. Výsledky testu ANOVA můžeme vidět v tabulkách 9 a 12. Jelikož ANOVA test odhalil významný rozdíl, bylo nutné provést také TUKEY test, který nám pomohl určit, které varianty se od sebe statisticky lišily. Výsledky tohoto testu můžeme pozorovat v tabulkách 10, 11, 13 a 14.



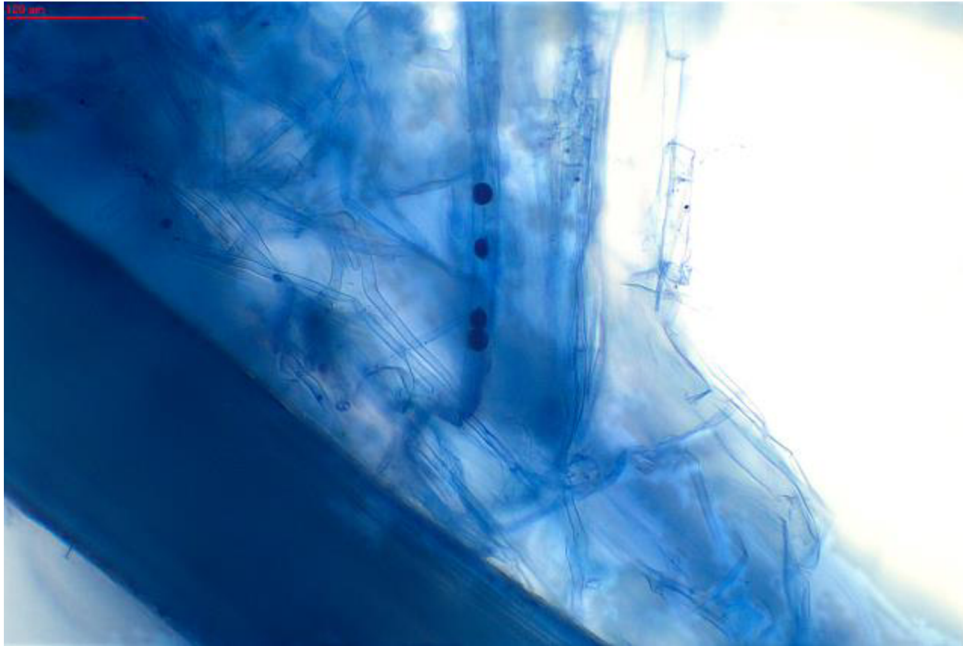
100 µm

Obrázek 7: Klastry chlamydospor *Microdochium bolleyi* v kořenech *Brachypodium distachyon* pátého odběru, varianta Mb263, Z: 200x

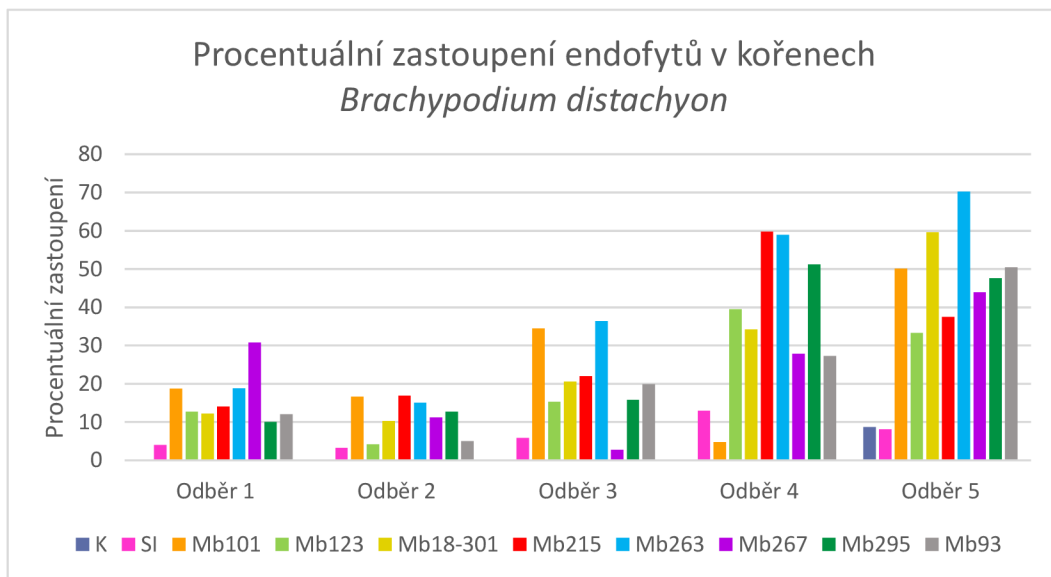


100 µm

Obrázek 8: Klastry chlamydospor *Microdochium bolleyi* v kořenech *Brachypodium distachyon* pátého odběru, varianta Mb215, Z: 200x



Obrázek 9: Spory *Serendipita indica* v kořenech *Brachypodium distachyon*, 5. odběr, Z: 400x, foto: Mgr. Dominik Bleša



Obrázek 10: Procentuální zastoupení 8 kmenů *Microdochium bolleyi* a 1 kmene *Serendipita indica* v kořenech *Brachypodium distachyon*, zjišťováno mikroskopicky

Tabulka 8: Kolonizace kořenů *Brachypodium distachyon* endofytními houbami *Microdochium bolleyi* a *Serendipita indica*

Varianta	Odběr	Procentuální zastoupení průměr	Procentuální zastoupení směr. odchylka	Procentuální zastoupení std. chyba	Procentuální zastoupení CL -95%	Procentuální zastoupení CL +95%
Kontrola	1. odběr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2. odběr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3. odběr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4. odběr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5. odběr	8,73	3,63	2,10	-0,30	17,75
SI	1. odběr	4,04	3,51	2,02	-4,67	12,76
	2. odběr	3,25	2,82	1,63	-3,75	10,26
	3. odběr	5,90	0,35	0,20	5,03	6,76
	4. odběr	13,00	2,18	1,26	7,58	18,41
	5. odběr	8,09	3,18	1,84	0,18	16,00
Mb295	1. odběr	10,00	10,00	5,77	-14,84	34,84
	2. odběr	12,73	6,30	3,64	-2,92	28,37
	3. odběr	15,82	4,60	2,65	4,41	27,23
	4. odběr	51,18	19,10	11,02	3,75	98,61
	5. odběr	47,60	14,65	8,46	11,20	84,00
Mb267	1. odběr	30,74	8,91	5,15	8,60	52,88
	2. odběr	11,20	1,25	0,72	8,10	14,32
	3. odběr	2,78	4,81	2,78	-9,17	14,73
	4. odběr	27,88	3,77	2,18	18,52	37,24
	5. odběr	43,87	10,27	5,93	18,37	69,38
Mb18-301	1. odběr	12,22	10,72	6,19	-14,40	38,84
	2. odběr	10,32	9,01	5,20	-12,07	32,71
	3. odběr	20,61	2,23	1,29	15,08	26,14
	4. odběr	34,17	8,04	4,64	14,20	54,13
	5. odběr	59,63	19,11	11,03	12,15	107,10

Mb215	1. odběr	14,07	7,06	4,07	-3,46	31,60
	2. odběr	16,93	10,08	5,82	-8,11	41,97
	3. odběr	22,02	8,44	4,87	1,06	42,99
	4. odběr	59,83	6,66	3,85	43,28	76,39
	5. odběr	37,48	13,13	7,58	4,87	70,08
Mb263	1. odběr	18,84	4,09	2,36	8,67	29,01
	2. odběr	15,08	14,35	8,29	-20,57	50,73
	3. odběr	36,40	14,66	8,47	-0,03	72,83
	4. odběr	59,00	15,77	9,10	19,82	98,16
	5. odběr	70,27	3,19	1,84	62,35	78,20
Mb123	1. odběr	12,73	11,06	6,39	-14,75	40,20
	2. odběr	4,17	7,22	4,17	-13,76	22,09
	3. odběr	15,34	8,83	5,10	-6,59	37,27
	4. odběr	39,44	18,28	10,56	-5,97	84,86
	5. odběr	33,29	13,80	7,97	-0,99	67,57
Mb93	1. odběr	12,04	0,80	0,46	10,05	14,03
	2. odběr	5,00	4,41	2,55	-5,95	15,95
	3. odběr	19,93	1,15	0,67	17,07	22,80
	4. odběr	27,22	11,82	6,83	-2,15	56,60
	5. odběr	50,40	28,88	16,67	-21,33	122,13
Mb101	1. odběr	18,70	7,03	4,06	1,23	36,18
	2. odběr	16,67	3,33	1,92	8,39	24,95
	3. odběr	34,44	5,09	2,94	21,80	47,09
	4. odběr	4,76	8,25	4,76	-15,73	25,25
	5. odběr	50,08	18,30	10,57	4,62	95,54

Legenda: (SI) – *Serendipita indica*, (Mb295, Mb267, Mb18-301, Mb215, Mb263, Mb123, Mb93, Mb101) – kmeny *Microdochium bolleyi*, (CL -95 %, CL +95 %) - konfidenční limity

Tabulka 9: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů *Brachypodium distachyon* různými kmeny *Microdochium bolleyi*

	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	p
Odběr	22399,54	4	5599,89	30,5177	0,000000
Opakování	191,88	2	95,94	0,5228	0,594174
Varianta	12294,47	8	1536,81	8,3751	0,000000
Chyba	22019,59	120	183,50		

Tabulka 10: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů *Brachypodium distachyon* endofytem *Microdochium bolleyi* – procentuální zastoupení u jednotlivých kmenů, $\alpha=0,05$

Varianta	Procentuální zastoupení	
K	1,746	a
Mb123	20,993	b
Mb93	22,919	b
Mb267	23,295	b
Mb101	24,931	b c
Mb18-301	27,389	b c
Mb295	27,465	b c
Mb215	30,068	b c
Mb263	39,916	c

Tabulka 11: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů *Brachypodium distachyon* endofytem *Microdochium bolleyi* – procentuální zastoupení u jednotlivých odběrů, $\alpha=0,05$

Odběr	Procentuální zastoupení	
2	10,232	a
1	14,371	a
3	18,594	a
4	33,720	b
5	44,594	c

Tabulka 12: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů *Brachypodium distachyon* endofytem *Serendipita indica*

	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F	p
Odběr	91,5789	4	22,8947	3,41774	0,025616
Opakování	14,7363	2	7,3682	1,09992	0,350518
Varianta	352,5533	1	352,5533	52,62931	0,000000
Chyba	147,3736	22	6,6988		

Tabulka 13: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů *Brachypodium distachyon* endofytem *Serendipita indica* – procentuální zastoupení u jednotlivých variant, $\alpha=0,05$

Varianta	Procentuální zastoupení
K	0,000 a
SI	6,856 b

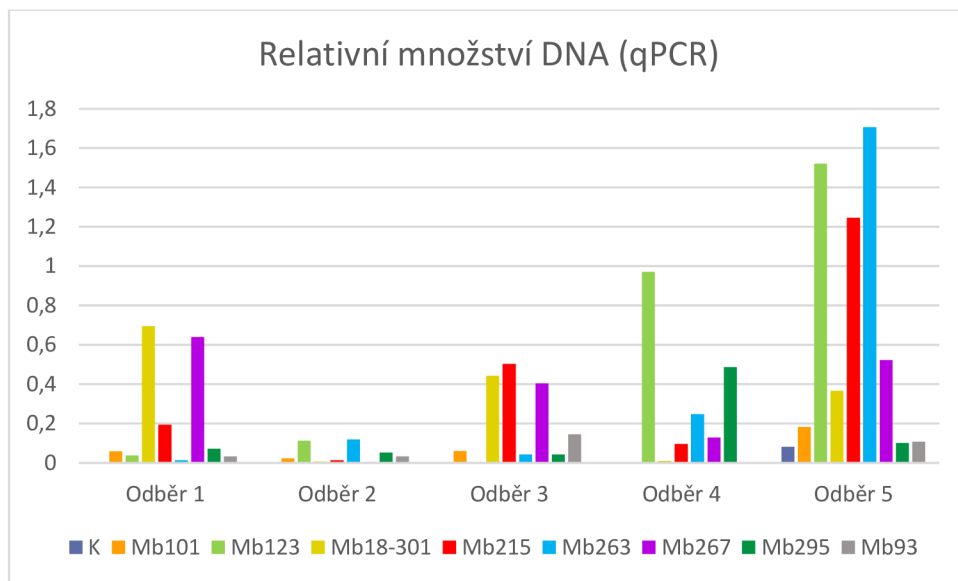
Tabulka 14: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů *Brachypodium distachyon* endofytem *Serendipita indica* – procentuální zastoupení u jednotlivých odběrů, $\alpha=0,05$

Odběr	Procentuální zastoupení
2	3,25 a
1	4,04 a
3	5,89 a
5	8,09 a b
4	12,99 b

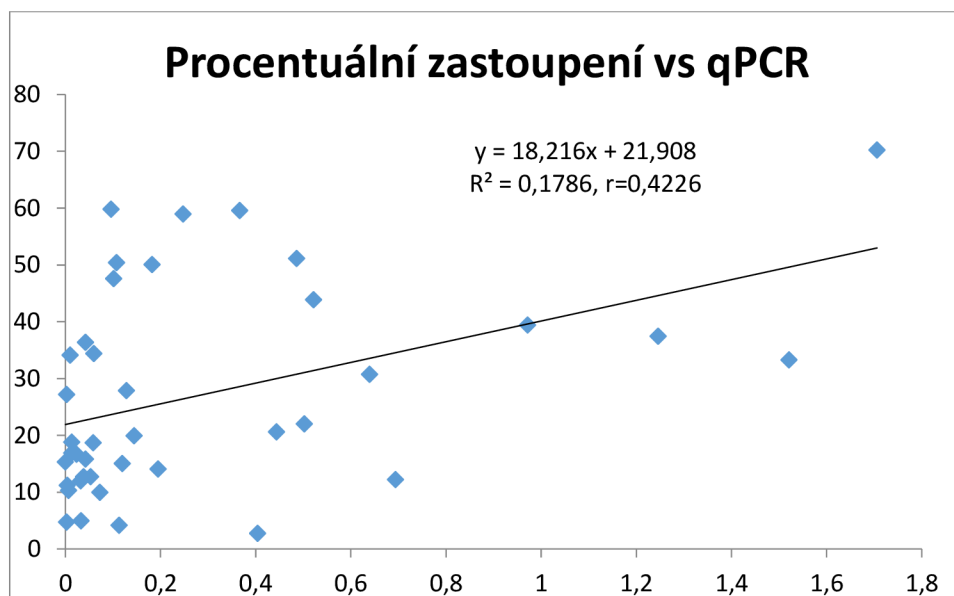
7.3 qPCR – Kvantifikace v hostiteli

Dynamika kolonizace endofytem *M. bolleyi* byla sledována pomocí Real-time PCR, což umožnilo zhodnocení změn obsahu tohoto endofytu v rostlinném hostiteli v pětíměsíčním období a pozorování jednotlivých kmenů. Výsledky jsou zaznamenány na obrázku 11. Můžeme pozorovat, že v prvním odběru největší míra kolonizace proběhla u variant Mb18-301 a MB267, ve druhém rozdíl v množství kolonizace nebyly tak patrné, ve třetím odběru opět převyšovala varianta Mb18-301 a Mb267, k nim se ovšem přidala i varianta Mb215. Ve čtvrtém a pátém odběru byly míry kolonizace markantnější, ve čtvrtém odběru byla nejvyšší míra kolonizace u varianty Mb123 a u pátého odběru byla míra kolonizace nejvyšší u variant Mb101, Mb215 a Mb263. Po provedení

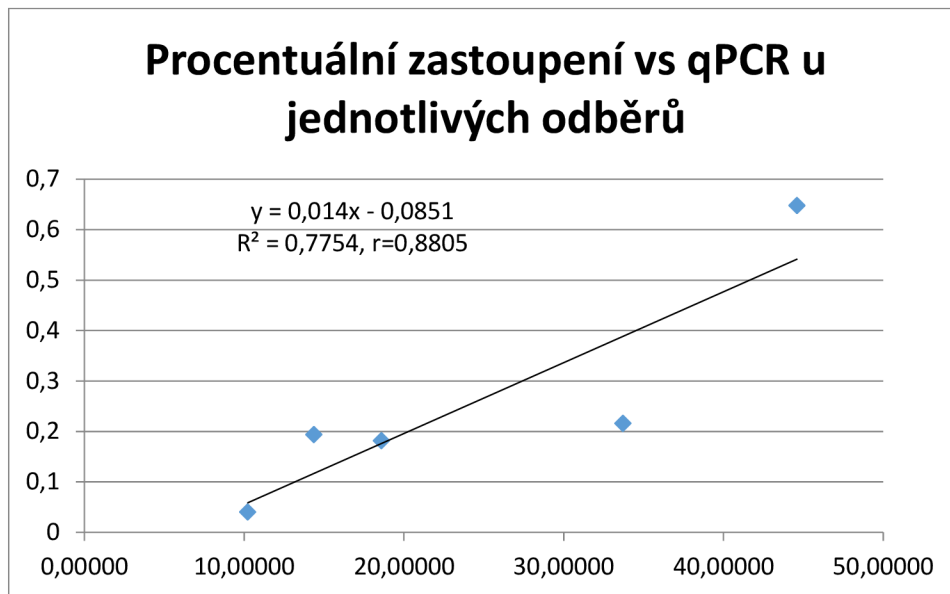
kvantitativní Real-time PCR jsme dosáhli podobných výsledků jako při mikroskopování. Tímto byly původní výsledky z mikroskopu potvrzeny. Při výzkumu korelace mezi hodnotami získanými mikroskopováním a hodnotami získanými qPCR analýzou jsme zjistili, že celková korelace není těsná korelace, zatímco korelace mezi procentuálním zastoupením kolonizace kořenů zjištěným pomocí mikroskopování a výsledky z qPCR u jednotlivých odběrů je velmi těsná korelace. To jsme zjistili pomocí velikosti korelačního koeficientu (celková korelace $r=0,4226$, korelace jednotlivých odběrů $r=0,8805$). Tyto korelace jsou znázorněny na obrázcích 12 a 13.



Obrázek 11: Relativní množství DNA *Microdochium bolleyi* v rostlinách *Brachypodium distachyon* jednotlivých odběrů



Obrázek 12: Celková korelace mezi procentuálním zastoupením kolonizace kořenů a výsledky qPCR



Obrázek 13: Korelace mezi procentuálním zastoupením kolonizace kořenů a výsledky qPCR u jednotlivých odběrů

8 DISKUZE

Mykorhiza je symbiotické soužití hub s kořeny vyšších rostlin. Termín mykorhiza zavedl Albert Bernhard Frank pro popis symbiotického spojení kořenů rostlin a hub (Bagyaraj, 2014). Při tomto procesu může docházet buď k pronikání houbových vláken do kořenových buněk primární kůry, pak tento proces nazýváme endomykorhiza, nebo houbová vlákna zůstávají pouze v mezibuněčném prostoru, tento případ nazýváme ektomykorhiza (Chilvers et al., 1987). Mykorhizní kolonizace rostlin může přinést značné výhody z hlediska růstu, příjmu živin a v některých případech i výnosu (Gosling et al., 2006). Endofytické houby žijí uvnitř rostlinného těla a jsou spojeny přímo s jejich pletivou (Stone, 2004). Tyto houby se vyskytují jak v podzemních částech rostliny (kolonizace kořenů), tak i v částech nadzemních (Fierer and Jackson, 2006). Bylo prokázáno, že endofytické houby nezpůsobují v rostlinném těle příznaky nemoci, naopak mohou být rostlinám prospěšné, především jako ochrana vůči herbivorům a patogenům (Stone, 2004).

Význam jak mykorhizních, tak endofytických hub byl prokázán hned v několika výzkumech. Pokud jde o endofytické houby, Bacon a White (2016) prokázali, že tyto houby poskytují svému hostiteli zvýšenou odolnost vůči hmyzu a škůdcům. Freeman a Rodriguez (1993) předpokládají, že endofyty obývající rostliny ovlivňují rostlinné patogeny, a tím mění závažnost onemocnění. Studie Kaya a kolegů (2003) a Bona a kolegů (2017) například ukazují, že mykorhizní kolonizace u melounu vodního a rajčat zlepšuje výnos rostliny, efektivitu využití vody a kvalitu plodů. Dále bylo také prokázáno, že arbuskulární mykorhizní houby zlepšují výkonnost broskvoňových sazenic a zvyšují koncentrace důležitých minerálů v listech a kořenech (Wu et al., 2011). Jak zjistil Kusari a kolegové (2012a, 2012b) endofyty jsou schopny produkovat různé sekundární metabolity, které mohou vykazovat biologickou aktivitu proti škůdcům nebo patogenům. Krom toho ale také Eyberger a kolegové (2006) a Shweta se svým týmem (2010) zjistili, že díky endofytům můžeme nalézt různé prekurzory pro protinádorová léčiva.

V této práci jsem se zabývala zkoumáním endofytických hub *M. bolleyi* a *S. indica* a jejich partnerství s rostlinami *Brachypodium distachyon*. Byly zahájeny skleníkové experimenty, studována kolonizace hostitelské rostliny a byl posouzen vliv endofytů na růstové a vývojové charakteristiky rostlin pomocí vizuálního hodnocení, vážení biomasy a využití mikroskopických a molekulárních technik, včetně qPCR. Dále byly porovnány účinky osmi kmenů *M. bolleyi* na růst a vývoj rostlin. Podobné experimenty už prováděli například Radková (2023), Matušinský a kolegové (2024), Starošítková (2022) a Polnická (2022).

Pomocí metody mikroskopování se podařilo zachytit kolonizaci kořenů rostlin *B. distachyon* endofyty *M. bolleyi* a *S. indica*. Kolonizace s každým uběhlým měsícem mezi jednotlivými odběry v rostlinách narůstala. Nejvyšší míra kolonizace byla nalezena v kořenech pátého odběru. Tato data byla poté potvrzena i pomocí qPCR analýzy, při které došlo k obdobným výsledkům.

U mikroskopického pozorování došlo k jednomu problému, a to přesně v nalezení klastrů chlamydospor uvnitř kořenů kontrolních vzorků pátého odběru. K těmto rostlinám nebyl přidán žádný endofyt, tudíž by nemělo dojít k žádné kolonizaci. Tuto skutečnost ovšem potvrdila i právě již zmiňovaná qPCR analýza. Domníváme se, že došlo ke křížové kontaminaci vzorků v důsledku zalévání rostlin při skleníkové části mého experimentu. Z počátku experimentu byly rostliny opatrně zalévány konví s kropítkem tak, aby se neponičily tehdy malé rostliny. Proto také u prvních čtyřech odběrů nemůžeme u rostlin kontrolní varianty pozorovat kolonizaci. Po čtvrtém odběru byly již ale rostliny zalévány méně opatrně hadicí a mohlo tak díky odražení kapek vody od substrátu dojít ke křížové kontaminaci, a proto můžeme v pátém odběru pozorovat kolonizaci v kontrolním vzorku. Dalším možným důvodem by mohla být také nedostatečná velikost samotných květináčů, ve kterých byly rostliny vysazeny. Květináče byly poměrně malé, což ovšem z počátku experimentu nedělalo nijak velký problém. Po čtvrtém odběru už ale rostliny byly poměrně velké a těžké a to způsobilo, že se některé rostliny převracely a padaly. Tak opět mohlo dojít ke křížové kontaminaci, neboť rostliny byly blízko u sebe a část substrátu z jednoho květináče mohl dopadnout do jiného. V případě provádění budoucího podobného experimentu by se musela provést opatření, aby se nestalo to stejné.

M. bolleyi je jedním z endofytických druhů hub. Kolonizuje kořeny pšenice a dalších obilovin (Rothen, 2018). Patří mezi takzvané Dark septate endophytes (DSE) – tmavé septované endofyty (Rothen, 2018). Může kolonizovat parenchymatické tkáně kořenů, aniž by způsobovala příznaky onemocnění na hostitelské rostlině (Rothen, 2018). Tato houba vykazuje supresi různých rostlinných patogenů obilovin, jako je například *Oculimacula yallunda* (Matušinský et al., 2022). V této práci bylo pozorováno partnerství *B. distachyon* s 8 kmeny *M. bolleyi* – Mb123, Mb18-301, Mb215, Mb263, Mb267, Mb295 a Mb93. Jak dokázalo mikroskopické pozorování a následná qPCR analýza, kolonizace kořenů modelové rostliny *B. distachyon* těmito 8 kmeny *M. bolleyi* bylo úspěšné. Kolonizace se objevila již ve vzorcích prvního odběru. Ve vzorcích pátého odběru jsme již mohli pozorovat masivní kolonizaci kořenů. Při skleníkových experimentech jsme pozorovali vliv 8 kmenů tohoto endofytu na růst modelových rostlin. Byla měřena délka kořenů, výška nadzemní části rostlin a byla zjišťována růstová fáze, ve které se rostliny zrovna nacházely. Dále bylo také provedeno vážení celkové

nadzemní biomasy a vážení semen. Potvrdili jsme, že endofyt *M. bolleyi* (alespoň 8 vybraných kmenů) nijak neznehodnocoval růst a vývoj jednotlivých rostlin. Na rostlinách nebyly pozorovány žádné nekrózy v důsledku kolonizace endofytem. Z počátku rostliny si bez přidaného endofytu rostly podobnou rychlostí a nebyly zřejmé žádné větší rozdíly ve výškách nadzemních částí. Ve třetím odběru jsme mohli pozorovat jemné odchylky, a to přesně u kmenů Mb215 a Mb267, u kterých výška nadzemní části převyšovala nad ostatními. I ve čtvrtém a pátém odběru jsme mohli pozorovat určité rozdíly ve výšce nadzemních částech rostlin. Veškeré naměřené rozdíly mezi naměřenými hodnotami se pohybovaly v rozmezí od 1 do 10 cm. Při pozorování růstových fází si můžeme povšimnout, že v prvních dvou odběrech byla u všech variant stejná převládající růstová fáze. Ve třetím, čtvrtém a pátém odběru už můžeme pozorovat rozdíly mezi jednotlivými růstovými fázemi, ovšem nemůžeme říct, že by se rostliny s přidaným *M. bolleyi* výrazně odlišovaly od kontrolní varianty. Při pátém odběru si můžeme povšimnout, že u variant Mb263 a Mb267 převládaly rostliny mrtvé. Co se týče hmotnosti celkové nadzemní biomasy a hmotnosti semen, nemůžeme říct, že by přidáním endofytu *M. bolleyi* byla zvýšena hmotnost. Největší vypočítané hmotnosti totiž dosahovala samotná kontrolní varianta, tedy samotná rostlina bez přidaných endofytů. Oproti mým výsledkům stojí například Radková (2023), která pozorovala, že přítomnost endofytu *M. bolleyi* v kořenových pletivech *B. distachyon* urychluje jeho růst a celkový vývoj. Rostliny s přidaným endofytem se nacházely v pozdější růstové fázi a měly delší jak nadzemní, tak podzemní části než rostliny bez endofytu. Také Starošítková (2022) pozorovala, že přítomnost endofytu *M. bolleyi* urychluje růst a vývoj jak pšenice, tak i *B. distachyon*. Shadmani a kolegové (2018) taktéž vypočítávali, že *M. bolleyi* účinně podpořilo délku nadzemní části o 7,21 % a hmotnost sušiny nadzemní části o 38,60 % u rostlin ječmene.

S. indica je pravděpodobně nejznámější endofytická houba kolonizující kořeny rostlin (Boorbori & Zhang, 2022). Rostlinám pomáhá přijímat živiny, zvyšuje rostlinnou odolnost vůči stresu a mění sekundární metabolity mnoha hospodářských rostlin a podporuje celkový růst a produkci semen (Boorbori & Zhang, 2022). Mezi jejími hostiteli můžeme najít například suchovzdorné keře a stromy, letničky, trvalky, nahosemenné rostliny a mechorosty (Boorbori & Zhang, 2022). V této práci bylo pozorováno partnerství *B. distachyon* s 1 kmenem *S. indica*. Pomocí mikroskopického pozorování byla prokázána úspěšná kolonizace kořenů *B. distachyon* tímto endofytem. Při skleníkových experimentech byl, stejně jako při práci s *M. bolleyi*, pozorován vliv *S. indica* na růst a vývoj modelových rostlin. Potvrdili jsme, že *S. indica* nijak neznehodnocovala růst a vývoj jednotlivých rostlin, na rostlinách nebyly pozorovány žádné nekrózy. Při zkoumání růstových fází *B. distachyon* v průběhu 5 měsíců bylo zjištěno, že *S.*

indica pravděpodobně neměla žádný urychlující vliv na vývoj rostlin. V každém odběru byly rostliny ošetřené *S. indica* ve stejné růstové fázi jako rostliny kontrolní, které nebyly nijak ošetřené. Můžeme tedy říct, že *S. indica* neurychlila vývoj rostlin *B. distachyon*, ale zároveň jej taky nijak nezpomalovala nebo dokonce neznemožňovala. Při měření výšky nadzemní části rostlin bylo zjištěno, že rostliny ošetřené endofytem *S. indica* mají, až na 4. odběr, větší délku nadzemní části než kontrolní rostliny. Co se vážení celkové nadzemní biomasy a semen týče, tak rostliny s přidáním endofytem *S. indica* měly menší hmotnost celkové nadzemní biomasy (3,99 g) než rostliny kontrolní (4,82 g). U vážení semen došlo k velmi podobnému výsledku. Rostliny se *S. indica* měly menší hmotnost semen (1,12 g) než rostliny kontrolní (1,43 g). Můžeme tedy říct, že v mém případě nemělo přidání endofytu vliv na zvýšení hmotnosti celkové nadzemní biomasy a semen. Saleem a kolegové (2023), stejně tak i Sherameti a kolegové (2005) získaly obdobné výsledky na odlišných rostlinách jako mnou provedený experiment na *B. distachyon*. Saleem a kolegové (2023) prováděli experiment na rostlinách salátu a zjistili, že ošetření rostlin salátu endofytem *S. indica* zvýšilo výšku rostlin v porovnání s kontrolou v substrátu. Pokud jde o počet listů, ošetření *S. indica* vykazovalo zlepšení počtu listů, ale ne významně. Sherameti a kolegové (2005) uvádí, že *S. indica* zlepšuje růst semenáčků *Arabidopsis* a tabáku. Liu a kolegové (2019) prokázali, že u semenáčků *Lolium multiflorum* inokulovaných *S. indica* byl pozorován silný nárůst kořenových vlásků, který vedl ke křovinatému fenotypu.

9 ZÁVĚR

V literárním přehledu byly popsány charakteristiky mykorhizních a endofytických hub. Dále byl popsán vztah mezi houbami a rostlinami a jejich případné praktické využití. V experimentální části byl hodnocen vliv dvou druhů endofytických hub *S. indica* a *M. bolleyi*.

Zjistili jsme, že *S. indica* má vliv na růstové charakteristiky rostlin. Výška rostlin *B. distachyon* byla ovlivněna inokulací *S. indica* a to tak, že ošetřené rostliny dosahovaly větší výšky nadzemní části než rostliny bez endofytu. Růstové fáze rostlin nebyly nijak ovlivněny přidaným endofytem. Při zkoumání hmotnosti celkové nadzemní biomasy a hmotnosti semen bylo prokázáno, že rostliny bez přidaného endofytu měly vyšší hmotnost celkové nadzemní biomasy a semen, než rostliny ošetřené *S. indica*.

U zkoumání vlivu 8 kmenů *M. bolleyi* jsme zjistili, že *M. bolleyi* má vliv na růstové charakteristiky rostlin. Rostliny, které byly ošetřené kmeny Mb263 a Mb267, odumřely dříve, než ostatní rostliny (ať už kontrolní, nebo ošetřené jinými kmeny *M. bolleyi*). Výška rostlin *B. distachyon* byla ovlivněna ošetřením *M. bolleyi* a to tak, že rostliny ošetřené kmenem Mb295 dosahovaly nejvyšší naměřené výšky ze všech vzorků. Při zkoumání hmotnosti celkové nadzemní biomasy a hmotnosti semen bylo prokázáno, že rostliny bez přidaného endofytu měly vyšší hmotnost celkové nadzemní biomasy a semen, než rostliny ošetřené *M. bolleyi*. Kmeny Mb215 a Mb263 výrazně snížily hmotnost celkové nadzemní biomasy i hmotnost semen.

Mikroskopování prokázalo úspěšnou kolonizaci kořenů rostlin *B. distachyon* oběma druhy endofytů, jak *M. bolleyi*, tak *S. indica*. To bylo následně potvrzeno i pomocí qPCR analýzy.

10 DIDAKTICKÁ ČÁST

V didaktické části této práce jsem se zaměřila na tvorbu výukových pracovních listů na témata práce v laboratoři, mykorhizní a endofytické houby a na práci s chybou při tvorbě experimentu. Tyto pracovní listy byly vytvořeny s ohledem na tři věkové kategorie žáků/studentů – 6.-7. ročník 2. stupně základní školy, 1.-2. ročník čtyřletého gymnázia a 3.-4. ročník čtyřletého gymnázia. Jednotlivé pracovní listy byly zaměřeny na postupy a znalosti, se kterými se budou žáci či studenti v průběhu studijních let seznamovat.

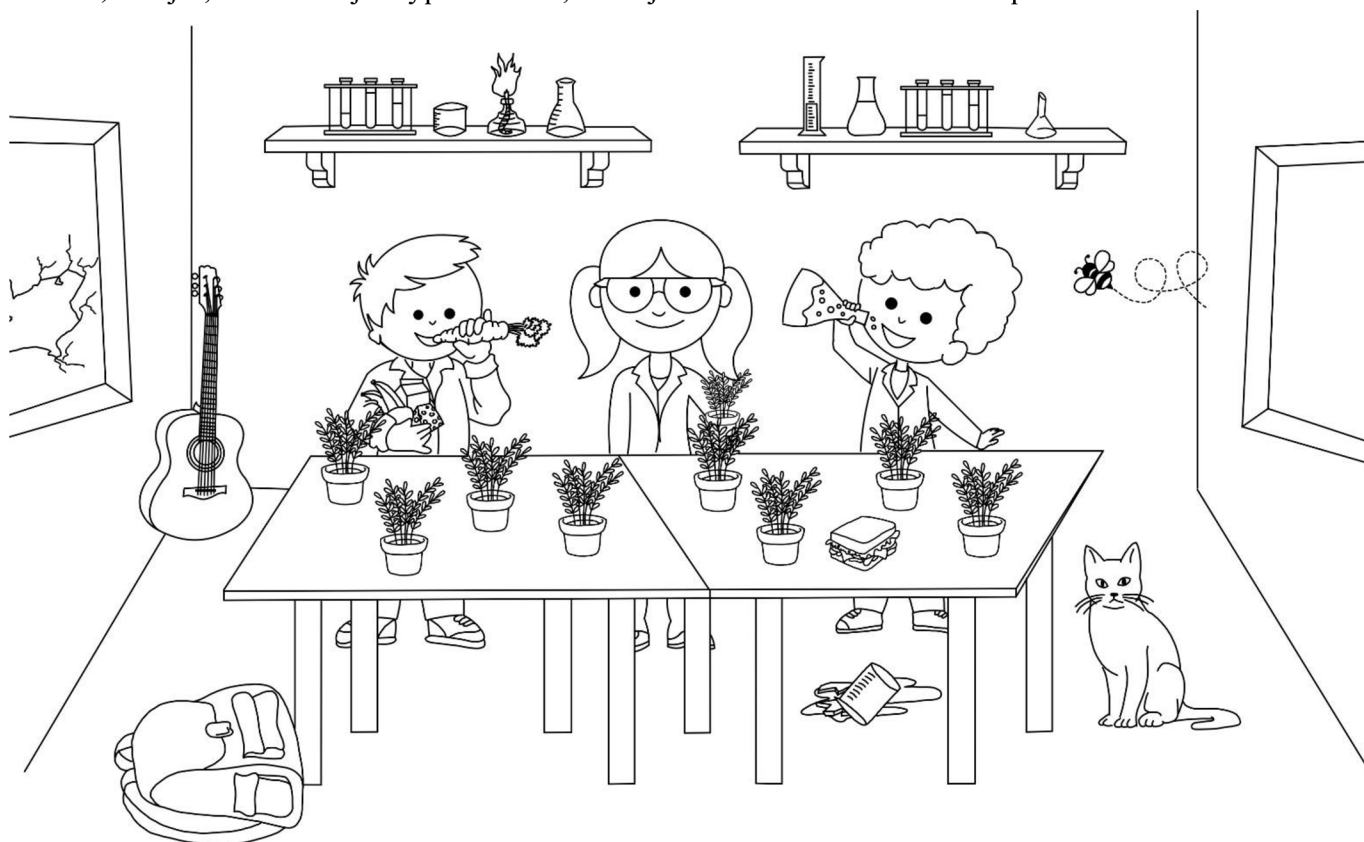
První pracovní list – Práce v laboratoři – byl vytvořen s myšlenkou vytvořit jednoduchý pracovní list, ve kterém by si žáci 6.-7. tříd druhého stupně základní školy procvičili své znalosti o tom, jak se chovat/nechovat v laboratořích, co je v těchto laboratořích bezpečné a co naopak není a také s jakými typy pomůcek by se mohli v laboratořích setkat. Tento pracovní list byl koncipován spíše pro výuku přírodovědných praktik než pro výuku jednotlivých samostatných přírodovědných předmětů. Jednotlivé úkoly jsou podány spíše hravou formou, právě s ohledem na věk žáků, kteří jej budou vyplňovat. Pracovní list by měl učitelé poskytnout nahlédnutí k tomu, zda žáci rozumí pravidlům pro bezpečnost v laboratoři, a proto bych navrhovala jeho použití ještě před začátkem jakýchkoliv experimentů ve výuce.

Druhý pracovní list – Mykorhizní a endofytické houby – byl vytvořen pro 1.-2. ročníky čtyřletého gymnázia. Tento pracovní list je spíše koncipovaný jako opakování již probraného učiva, nebo jako doplněk k nově probírané látce. V druhém případě bych doporučila, aby žáci pracovní list vyplňovali s pomocí učebnic, zápisů nebo internetu.

Poslední pracovní list – Práce s chybou (nejen) v experimentu – byl vytvořen pro 3.-4. ročníky čtyřletého gymnázia. V těchto ročnících se studenti účastní výběrových seminářů, ve kterých píšou různé seminární práce, při kterých musí vytvářet experimenty. Při těchto experimentech může dojít k chybám a může to tak ovlivnit jimi získané výsledky. Tento pracovní list by měl studentům poskytnout návod na to, jak přistoupit k tomu, když se nějaká taková chyba v experimentu vyskytne.

PRÁCE V LABORATOŘI

1) Najdi, zakroužkuj a vypiš 10 věcí, které jsou na obrázku laboratoře špatně.

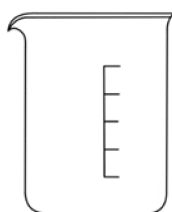


_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

2) V osmisměrci najdi slova z nápovědy

C	V	E	S	Q	A	J	C	Z	J	R	F	Z	M
W	T	T	F	K	Z	K	Y	A	R	Q	Ž	P	E
D	O	H	Z	H	A	U	V	P	E	G	I	Z	C
P	N	Ů	Ž	K	Y	L	O	A	X	H	L	G	I
O	O	H	A	U	H	M	P	Y	M	R	E	Y	V
K	G	I	U	U	N	V	Z	E	I	U	T	G	A
S	N	O	N	U	Ť	K	B	N	L	D	K	M	K
O	V	T	Z	Š	Á	W	A	F	H	H	A	Z	U
R	K	L	Á	D	F	T	R	D	F	N	U	I	R
K	T	L	I	C	E	P	I	N	Z	E	T	A	E
I	P	N	I	P	T	Á	R	A	P	E	R	P	W
M	K	B	I	C	Z	A	D	Z	G	N	T	G	O
A	K	P	Z	K	N	M	V	Q	C	J	L	U	U
A	K	S	I	M	O	H	I	R	T	E	P	W	R

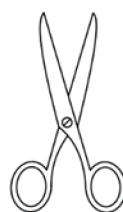
Nápověda:



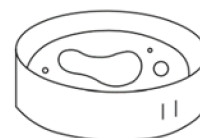
KÁDINKA



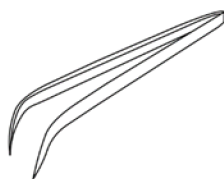
MIKROSKOP



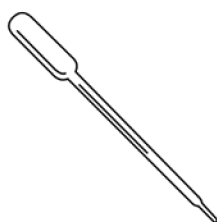
NŮŽKY



PETRIHO MISKA



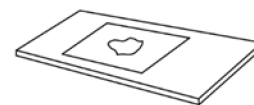
PINZETA



PIPETA



PLÁŠŤ



PREPARÁT



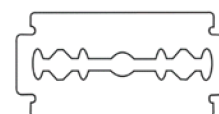
RUKAVICE



SKALPEL



ZKUMAVKA



ŽILETKA

MYKORHIZNÍ A ENDOFYTICKÉ HOUBY

1) Doplň chybějící pojmy

MYKORHIZNÍ HOUBY

Mykorrhiza je symbiotické soužití hub s kořeny rostlin. Při tomto procesu může docházet buď k pronikání houbových vláken do kořenových buněk primární kůry, pak tento proces nazýváme....., nebo houbová vlákna zůstávají pouze v mezibuněčném prostoru, tento případ nazýváme..... Endomykorrhiza se dělí do několika druhů, jejichž názvy jsou často odvozovány od skupiny rostlin, v níž tento proces probíhá. Nejčastějším druhem endomykorrhizy je..... mykorrhiza. Ektomykorrhiza není tak častá, jako již zmíněná endomykorrhiza. Většina ektomykorrhizních hub patří mezi či stopkaté houby.

ENDOFYTICKÉ HOUBY

Endofytické houby jsou druhy hub, které žijí..... rostlinného těla. Tyto houby jsou spojeny s Tento vztah rostliny a houby může být vzájemně velmi prospěšný. Endofytické houby můžeme rozřadit do tří kategorií – endofyty, endofyty a endofyty. Mezi obligátní endofyty řadíme ty endofytické houby, které pro dokončení svého životního cyklu..... K..... endofytům řadíme ty endofytické houby, které dokážou žít převážně mimo vnitřní prostředí rostlin a jen ojediněle je můžeme najít v rostlinném těle. Fakultativními endofyty je..... endofytů.

2) Roztříd' jednotlivé názvy hub mezi houby mykorrhizní a endofytické, pokud to dokážeš, přepiš jejich latinské názvy na názvy české

Epichloë, Amanita citrina, Microdochium bolleyi, Boletus badius, Tricholoma sulphureum, Serendipita indica, Russula integra, Phialocephala fortinii

Mykorrhizní houby	Endofytické houby

PRÁCE S CHYBOU (NEJEN) V EXPERIMENTU

CHYBA OBECNĚ

Co je to chyba?

- Chyba je přirozenou součástí učebního procesu.

Proč jsou chyby v našem učení důležité?

- Díky tomu, že uděláme chybu, můžeme zlepšit své rozpoznávací schopnosti, pomáhá nám růst a zlepšovat se.

Na chybu nesmíme nahlížet jako na špatnou věc. Naopak, pokud zjistíme, že jsme udělali chybu a odhalíme ji, jsme schopni si ji lépe zapamatovat než správné řešení a díky tomu můžeme lépe porozumět problému a předejít stejným nebo podobným chybám v budoucnu.

CHYBA V EXPERIMENTU

Jak správně postupovat v případě, že nalezneme chybu v experimentu?

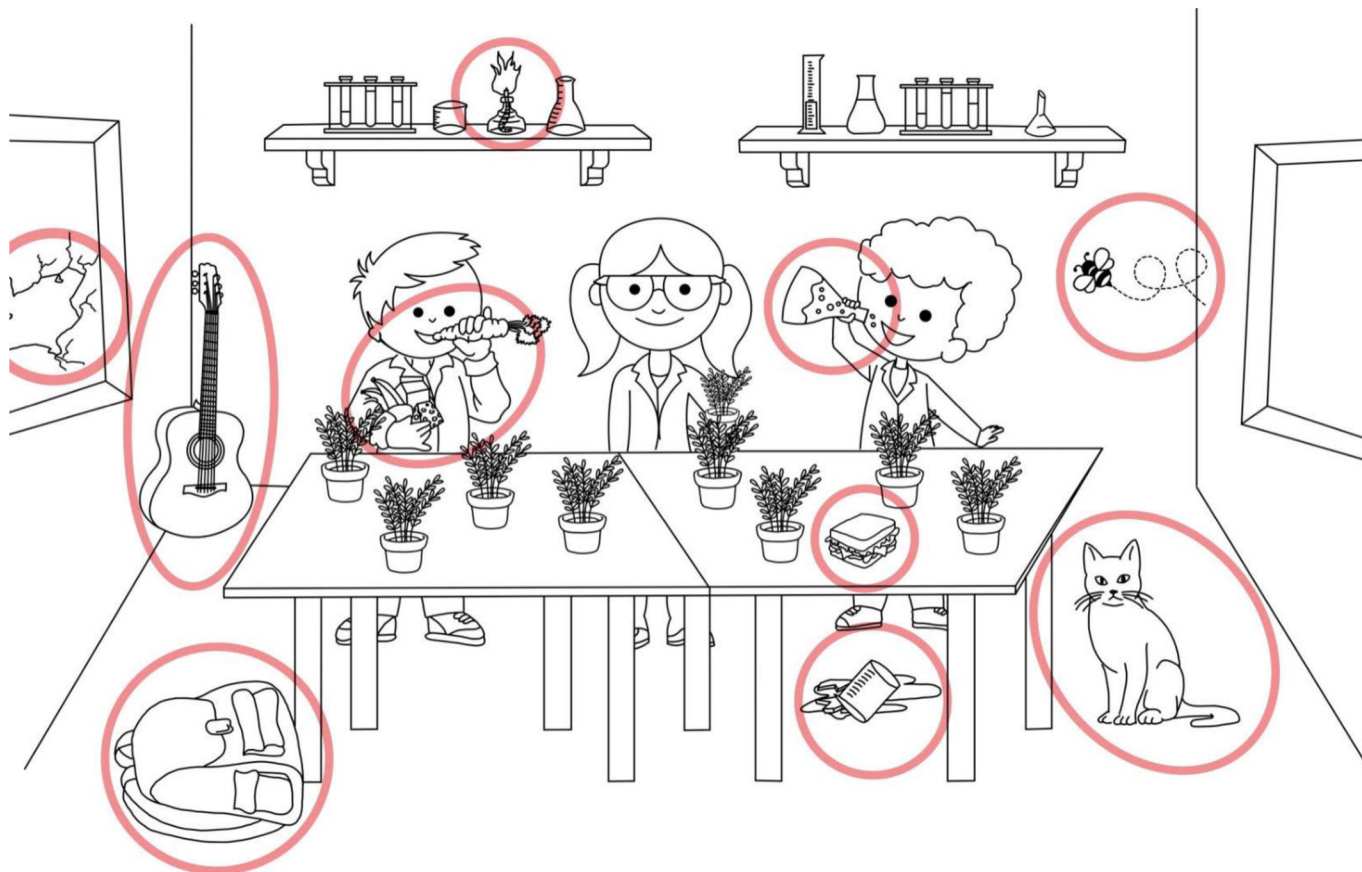
- 1) Musíme zjistit, jaká chyba kde nastala – potřebujeme určit, co je vlastně špatně
- 2) Zjistíme, jakým způsobem k chybě došlo
- 3) Navrhne, jak by se dalo chybu opravit a opravíme ji
- 4) Vše zdokumentujeme – dokumentace chyby může zabránit jejímu opakování v budoucnu

CVIČENÍ

Vytvořil jsi experiment, abys mohl sledovat, jak endofytické houby ovlivňují růst rostlin. Ne všechny rostliny, které jsi ve skleníku nechal růst byly ošetřeny použitými endofyty, jedna skupina rostlin byla využita jako kontrola. Po tom, co rostliny určitou dobu rostly jsi odebral vzorky kořenů pro účely mikroskopování. Při mikroskopickém pozorování kořenů rostlin jsi ale našel kolonizaci i na kontrolních rostlinách. Jak budeš postupovat při nalezení této chyby?

PRÁCE V LABORATOŘI - ŘEŠENÍ

3) Najdi, zakroužkuj a vypiš 10 věcí, které jsou na obrázku laboratoře špatně.



ZAPÁLENÝ
NESTŘEŽENÝ KAHAN

JÍDLO V
LABORATOŘI

NEPOŘÁDEK/BATOH

ROZBITÉ OKNO

POŽITÍ CHEMIKÁLIÍ

NEPOŘÁDEK/ROZBITÁ
KÁDINKA

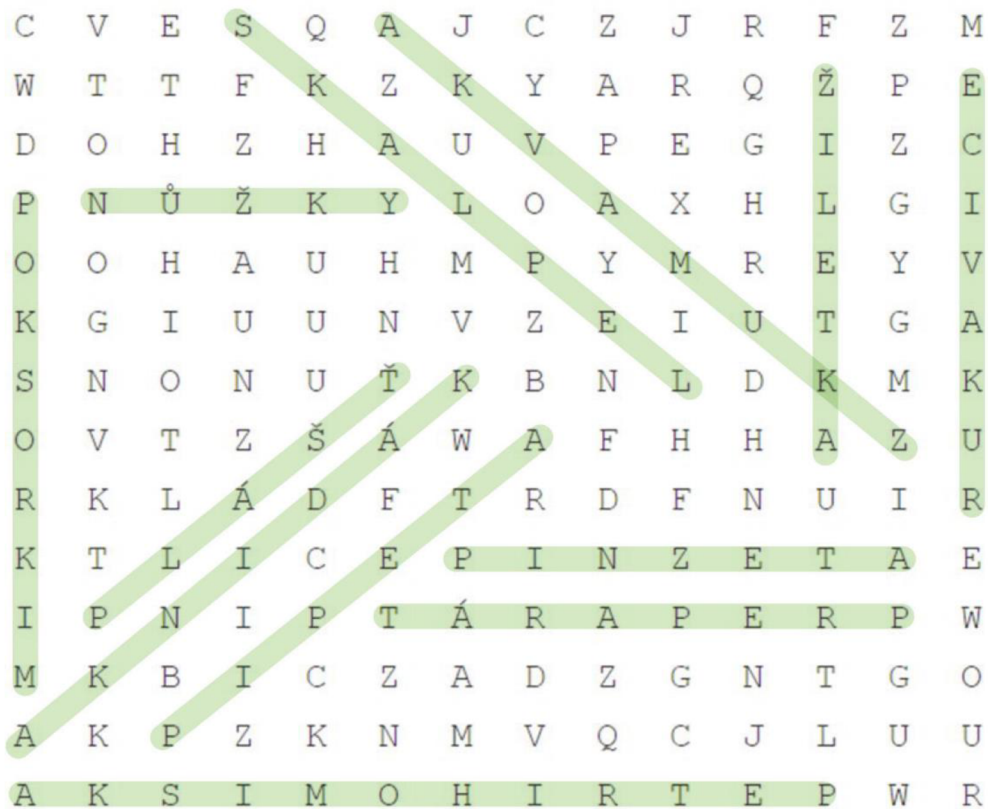
NEPOŘÁDEK/KYTARA

VČELA/ZVÍŘE V
LABORATOŘI

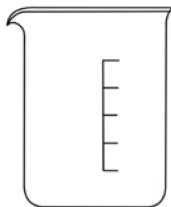
KOČKA/ZVÍŘE V
LABORATOŘI

JÍDLO NA PRACOVNÍ
PLOŠE

4) V osmisměrci najdi slova z nápovědy



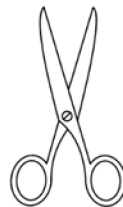
Nápověda:



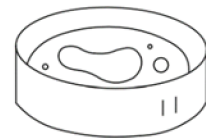
KÁDINKA



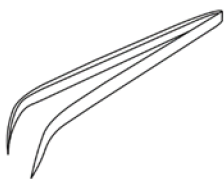
MIKROSKOP



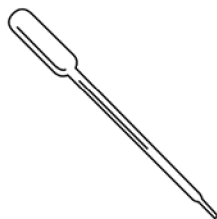
NŮŽKY



PETRIHO MISKA



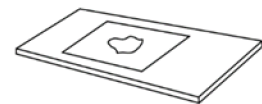
PINZETA



PIPETA



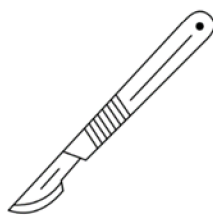
PLÁŠŤ



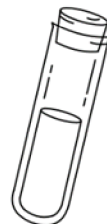
PREPARÁT



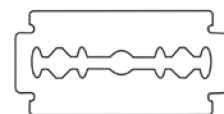
RUKAVICE



SKALPEL



ZKUMAVKA



ŽILETKA

MYKORHIZNÍ A ENDOFYTICKÉ HOUBY - ŘEŠENÍ

1) Doplň chybějící pojmy

MYKORHIZNÍ HOUBY

Mykorhiza je symbiotické soužití hub s kořeny vyšších rostlin. Při tomto procesu může docházet buď k pronikání houbových vláken do kořenových buněk primární kůry, pak tento proces nazýváme endomykorhiza, nebo houbová vlákna zůstávají pouze v mezibuněčném prostoru, tento případ nazýváme ektomykorhiza. Endomykorhiza se dělí do několika druhů, jejichž názvy jsou často odvozovány od skupiny rostlin, v níž tento proces probíhá. Nejčastějším druhem endomykorhizy je arbuskulární mykorhiza. Ektomykorhiza není tak častá, jako již zmíněná endomykorhiza. Většina ektomykorhizních hub patří mezi vřeckaté či stopkaté houby.

ENDOFYTICKÉ HOUBY

Endofytické houby jsou druhy hub, které žijí uvnitř rostlinného těla. Tyto houby jsou spojeny s rostlinnými pletivy. Tento vztah rostliny a houby může být vzájemně velmi prospěšný. Endofytické houby můžeme rozřadit do tří kategorií – obligátní endofyty, oportunistické endofyty a fakultativní endofyty. Mezi obligátní endofyty řadíme ty endofytické houby, které pro dokončení svého životního cyklu potřebují hostitelskou rostlinu. K oportunistickým endofytům řadíme ty endofytické houby, které dokážou žít převážně mimo vnitřní prostředí rostlin a jen ojediněle je můžeme najít v rostlinném těle. Fakultativními endofyty je většina endofytů.

2) Rozříd' jednotlivé názvy hub mezi houby mykorhizní a endofytické, pokud to dokážeš, přepiš jejich latinské názvy na názvy české

Epichloë, *Lactarius rufus*, *Microdochium bolleyi*, *Boletus badius*, *Amanita citrina*,
Serendipita indica, *Russula integra*, *Phialocephala fortinii*

Mykorhizní houby	Endofytické houby
<i>Lactarius rufus</i> (ryzec ryšavý)	<i>Epichloë</i>
<i>Boletus badius</i> (hřib hnědý)	<i>Microdochium bolleyi</i>
<i>Amanita citrina</i> (muchomůrka citronová)	<i>Serendipita indica</i>
<i>Russula integra</i> (holubinka celokrajná)	<i>Phialocephala fortinii</i>

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Ukázka přípravy inokula.....	14
Obrázek 2: Ukázka výsevu <i>Brachypodium distachyon</i>	15
Obrázek 3: Ukázka měření (vlevo – 1. odběr, varianta Mb267) a sušení (vpravo – 2. odběr, kontrolní varianta) rostlin <i>Brachypodium distachyon</i>	15
Obrázek 4: Kořeny <i>Brachypodium distachyon</i> v 70% ethanolu, 3. odběr	16
Obrázek 5: DNeasy mericon Food Kit (50).....	18
Obrázek 6: Srovnání výšky nadzemních částí rostlin (<i>Brachypodium distachyon</i>)	22
Obrázek 7: Klastry chlamydospor <i>Microdochium bolleyi</i> v kořenech <i>Brachypodium distachyon</i> pátého odběru, varianta Mb263, Z: 400x.....	26
Obrázek 8: Klastry chlamydospor <i>Microdochium bolleyi</i> v kořenech <i>Brachypodium distachyon</i> pátého odběru, varianta Mb215, Z: 400x.....	26
Obrázek 9: Spory <i>Serendipita indica</i> v kořenech <i>Brachypodium distachyon</i> , 5. odběr, Z: 400x, foto: Mgr. Dominik Bleša	27
Obrázek 10: Procentuální zastoupení 8 kmenů <i>Microdochium bolleyi</i> a 1 kmene <i>Serendipita indica</i> v kořenech <i>Brachypodium distachyon</i> , zjišťováno mikroskopicky	27
Obrázek 11: Relativní množství DNA <i>Microdochium bolleyi</i> v rostlinách <i>Brachypodium distachyon</i> jednotlivých odběrů	32
Obrázek 12: Celková korelace mezi procentuálním zastoupením kolonizace kořenů a výsledky qPCR.....	32
Obrázek 13: Korelace mezi procentuálním zastoupením kolonizace kořenů a výsledky qPCR u jednotlivých odběrů.....	33

12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Průměrné délky rostlin a převládající fáze růstu jednotlivých odběrů, vždy využity 4 rostliny každé varianty	19
Tabulka 2: Hmotnost celkové nadzemní biomasy rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> , N=20	23
Tabulka 3: Hmotnost semen rostlin <i>Brachypodium distachyon</i> , N=20	23
Tabulka 4: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti celkové nadzemní biomasy u jednotlivých variant <i>Brachypodium distachyon</i>	24
Tabulka 5: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti celkové nadzemní biomasy 5 ks rostlin u jednotlivých variant, $\alpha=0,05$,	24
Tabulka 6: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti semen u jednotlivých variant <i>Brachypodium distachyon</i>	24
Tabulka 7: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na naměřených hodnotách hmotnosti semen 5 ks rostlin u jednotlivých variant, $\alpha=0,05$	25
Tabulka 8: Kolonizace kořenů <i>Brachypodium distachyon</i> endofytickými houbami <i>Microdochium bolleyi</i> a <i>Serendipita indica</i>	28
Tabulka 9: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů <i>Brachypodium distachyon</i> různými kmeny <i>Microdochium bolleyi</i>	30
Tabulka 10: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů <i>Brachypodium distachyon</i> endofytem <i>Microdochium bolleyi</i> – procentuální zastoupení u jednotlivých kmenů, $\alpha=0,05$	30
Tabulka 11: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů <i>Brachypodium distachyon</i> endofytem <i>Microdochium bolleyi</i> – procentuální zastoupení u jednotlivých odběrů, $\alpha=0,05$	30
Tabulka 12: Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů <i>Brachypodium distachyon</i> endofytem <i>Serendipita indica</i>	31
Tabulka 13: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů <i>Brachypodium distachyon</i> endofytem <i>Serendipita indica</i> – procentuální zastoupení u jednotlivých variant, $\alpha=0,05$	31
Tabulka 14: Výsledné hodnoty testu TUKEY provedeného na procentuálních hodnotách kolonizace kořenů <i>Brachypodium distachyon</i> endofytem <i>Serendipita indica</i> – procentuální zastoupení u jednotlivých odběrů, $\alpha=0,05$	31

13 POUŽITÁ LITERATURA

BACON, C. W.; WHITE, J. F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. *Symbiosis*, 2016, roč. 68, s. 87-98.

BAGYARAJ, D. J. Mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 2014, roč. 80, č. 2, s. 415-428.

BŁASZCZYK, L.; SALAMON, S.; MIKOŁAJCZAK, K. Fungi inhabiting the wheat endosphere. *Pathogens*, 2021, roč. 10, č. 10, s. 1288.

BLEŠA, D.; MATUŠINSKÝ, P.; SEDMÍKOVÁ, R.; BALÁŽ, M. The potential of Rhizoctonia-like fungi for the biological protection of cereals against fungal pathogens. *Plants*, 2021, roč. 10, č. 2, s. 349.

BONA, E.; CANTAMESSA, S.; MASSA, N.; MANASSERO, P.; MARSANO, F.; COPETTA, A.; LINGUA, G.; D'AGOSTINO, G.; GAMALERO, E.; BERTA, G. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza*, 2017, roč. 27, s. 1-11.

BOORBOORI, M. R.; ZHANG, H. Y. The role of *Serendipita indica* (*Piriformospora indica*) in improving plant resistance to drought and salinity stresses. *Biology*, 2022, roč. 11, č. 7, s. 952.

BRUNDRETT, M. C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: *Microbial root endophytes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, s. 281-298.

CAIRNEY, J. W. G.; MEHARG, A. A. Ericoid mycorrhiza: a partnership that exploits harsh edaphic conditions. *European Journal of Soil Science*, 2003, roč. 54, č. 4, s. 735-740.

DEARNALEY, J. D. W.; MARTOS, F.; SELOSSE, M. S. Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. *Fungal Associations*, 2012, s. 207-230

DIAGNE, N.; NGOM, M.; DJIGHALY, P. I.; FALL, D.; HOCHER, V.; SVISTOONOFF, S. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: Importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity*, 2020, roč. 12, č. 10, s. 370.

DRAPER, J.; MUR, L. A. J.; JENKINS, G.; GHOSH-BISWAS, G. C.; BABLAK, P.; HASTEROK, R.; ROUTLEDGE, A. P. M. *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant physiology*, 2001, roč. 127, č. 4, s. 1539-1555.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of natural products*, 2006, roč. 69, č. 8, s. 1121-1124.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, roč. 103, č. 3, s. 626-631.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*, 1993, roč. 260, č. 5104, s. 75-78.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytologist*, 1980, s. 489-500.

GOSLING, P.; HODGE, A.; GOODLASS, G.; BENDING, G. D. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, ecosystems & environment*, 2006, roč. 113, č. 1-4, s. 17-35.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2015, roč. 79, č. 3, s. 293-320.

HONG, S. Y.; PARK, J. H.; CHO, S. H.; YANG, M. S.; PARK, C. M. Phenological growth stages of *Brachypodium distachyon*: codification and description. *Weed Research*, 2011, roč. 51, č. 6, s. 612-620.

CHILVERS, G. A.; LAPEYRIE, F. F.; HORAN, D. P. Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New Phytologist*, 1987, roč. 107, č. 2, s. 441-448.

JOHN, T. St. The importance of mycorrhizal fungi and other beneficial microorganisms in biodiversity projects. *Proceedings, Western Forest Nursery Association, September 14-18, 1992, Fallen Leaf Lake, CA*, 1993, roč. 221, s. 99.

KAYA, C.; HIGGS, D.; KIRNAK, H.; TAS, I. Mycorrhizal colonisation improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions. *Plant and soil*, 2003, roč. 253, s. 287-292.

KELLOGG, E. A. *Brachypodium distachyon* as a genetic model system. *Annual Review of Genetics*, 2015, roč. 49, s. 1-20.

KHIRALLA, A.; SPINA, R.; YAGI, S.; MOHAMED, I.; LAURAIN-MATTAR, D. Endophytic fungi: occurrence, classification, function and natural products. *Endophytic fungi: diversity, characterization and biocontrol*, 2016, s. 1-19.

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. Comparative genomics provides insights into the lifestyle and reveals functional heterogeneity of dark septate endophytic fungi. *Scientific reports*, 2018, roč. 8, č. 1, s. 6321.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & biology*, 2012a, roč. 19, č. 7, s. 792-798.

KUSARI, S.; VERMA, V. C.; LAMSHOEFT, M.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012b, roč. 28, č. 3, s. 1287-1294.

LI, C.; RUDI, H.; STOCKINGER, E. J.; CHENG, H.; CAO, M.; FOX, S. E.; MOCKLER, T. C.; WESTERENG, B.; FJELLHEIM, S.; ROGNLI, O. A.; SANDVE, S. R. Comparative analyses reveal potential uses of *Brachypodium distachyon* as a model for cold stress responses in temperate grasses. *BMC Plant Biology*, 2012, roč. 12, s. 1-15.

LIU, B.; LIU, X.; LIU, F.; MA, H.; MA, B.; ZHANG, W.; PENG, L. Growth improvement of *Lolium multiflorum* Lam. induced by seed inoculation with fungus suspension of *Xerocomus badius* and *Serendipita indica*. *AMB Express*, 2019, roč. 9, s. 1-11.

MATUŠINSKY, P.; FLOROVÁ, V.; SEDLÁKOVÁ, B.; MLČOCH, P.; BLEŠA, D. Colonization dynamic and distribution of the endophytic fungus *Microdochium bolleyi* in plants measured by qPCR. *Plos one*, 2024, roč. 19, č. 1, e0297633.

MATUŠINSKY, P.; SEDLÁKOVÁ, B.; BLEŠA, D. Compatible interaction of *Brachypodium distachyon* and endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *Plos one*, 2022, roč. 17, č. 3, e0265357.

MOHAMMADI, K.; KHALESRO, S.; SOHRABI, Y.; HEIDARI, G. A review: Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *J. Appl. Environ. Biol. Sci*, 2011, roč. 1, č. 9, s. 310-319.

O'DELL, T. E.; MASSICOTTE, H. B.; TRAPPE, J. M. Root colonization of *Lupinus latifolius* AGARDH. and *Pinus contorta* DOUGL. by *Phialocephala fortinii* WANG & WILCOX. *New Phytologist*, 1993, roč. 124, č. 1, s. 93-100.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, roč. 6, č. 10, s. 763-775.

POLNICKÁ, P. Využití modelového organismu *Brachypodium distachyon* v rostlinolékařství se zaměřením na houbové patogeny Online. Bakalářská práce. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 2022.

RADKOVÁ, A. Expres genů zapojených do obrany rostlin proti patogenům u *Brachypodium distachyon* Online. Diplomová práce. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 2023.

RASMUSSEN, H. N.; RASMUSSEN, F. N. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 2009, roč. 118, č. 3, s. 334-345.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 2008, roč. 182, s. 314-330.

ROTHEN, C.; MIRANDA, V.; FRACCHIA, S.; GODEAS, A.; RODRÍGUEZ, A. *Microdochium Bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Physiological characterization and structural features of its association with wheat. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 2018, roč. 53, č. 2, s. 1-10.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P. R.; HELANDER, M. Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *Plos one*, 2010, roč. 5, č. 6, e11395.

SALEEM, S.; RAGASOVA, L. N.; TEKIELSKA, D.; FIDURSKI, M.; SEKARA, A.; POKLUDA, R. *Serendipita indica* as a Plant Growth Promoter and Biocontrol Agent against Black Rot Disease in Cabbage Grown in a Phytotron. *Agriculture*, 2023, roč. 13, č. 11, s. 2048.

SALEEM, S.; SEKARA, A.; POKLUDA, R. *Serendipita indica*—A Review from Agricultural Point of View. *Plants*, 2022, roč. 11, č. 24, s. 3417.

SHADMANI, L.; JAMALI, S.; FATEMI, A. Biocontrol activity of endophytic fungus of barley, *Microdochium bolleyi*, against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Mycologia Iranica*, 2018, roč. 5, č. 1, s. 7-14.

SHERAMETI, I.; SHAHOLLARI, B.; VENUS, Y.; ALTSCHMIED, L.; VARMA, A.; OELMÜLLER, R. The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, roč. 280, č. 28, s. 26241-26247.

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B. T.; PRITI, V.; KUMAR, P. M.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R.; SHAANKER, R. U. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*, 2010, roč. 71, č. 1, s. 117-122.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal biology reviews*, 2007, roč. 21, č. 2-3, s. 75-89.

SINGHAL, U.; PRASAD, R.; VARMA, A. *Piriformospora indica* (*Serendipita indica*): The novel symbiont. *Mycorrhiza-function, diversity, state of the art*, s. 349-364.

STAROŠTÍKOVÁ, B. Optimalizace diagnostiky houby *Microdochium bolleyi* v rostlinném hostiteli pomocí molekulárních metod. Olomouc, 2022. bakalářská práce (Bc.). Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. Endophytic fungi. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*, 2004, s. 241-270.

SUN, X.; GUO, L. D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 2012, roč. 3, č. 1, s. 65-76

WHITE JR, J. F.; MARTIN, T. I.; CABRAL, D. Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phylloplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia*, 1996, roč. 88, č. 2, s. 174-178.

WU, Q. S.; LI, G. H.; ZOU, Y. N. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient acquisition of peach (*Prunus persica* L. Batsch) seedlings, 2011.

ZHU, H.; WEN, F.; LI, P.; LIU, X.; CAO, J.; JIANG, M.; MING, F.; CHU, Z. Validation of a reference gene (*BdFIM*) for quantifying transgene copy numbers in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2014, roč. 172, s. 3163-3175.