

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Využití modelového organismu *Brachypodium distachyon* v rostlinolékařství se zaměřením na houbové patogeny**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Pavla Polnická</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2022

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Pavla Polnická
Název práce	Využití modelového organismu <i>Brachypodium distachyon</i> v rostlinolékařství se zaměřením na houbové patogeny
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra botaniky
Vedoucí práce	Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

Předložená bakalářská práce se zabývá modelovou rostlinou *Brachypodium distachyon* a dvěma houbovými organismy, *Fusarium culmorum* a *Microdochium bolleyi*, jejichž vzájemná interakce byla na modelovém organismu zkoumána.

V teoretické části jsem se snažila charakterizovat *B. distachyon*, také pak nepatogenní endofytický organismus *M. bolleyi*. Pozornost byla zaměřena i na *F. culmorum*, patogenní houbu způsobující choroby pat stébel obilovin, nekrózy listů, klasů a jiná poškození rostlin, která mohou zapříčinit významné zemědělské ztráty. Byly popsány také změny, jež u rostliny, bránící se patogenu, probíhají na úrovni genové exprese.

V experimentální části práce jsem se snažila prokázat, zda endofytické houbové organismy mohou ovlivnit patogenní účinky chorob způsobených zástupci rodu *Fusarium*. Tyto poznatky, získané studiem vlivů *M. bolleyi* společně s *F. culmorum* na *B. distachyon*, by pak ideálně mohly být aplikovány na ochranu rostlin proti fusariovým chorobám pšenice, ječmene, kukuřice a dalších jednoděložných zemědělských plodin.

Klíčová slova	<i>Brachypodium distachyon</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , onemocnění obilovin, <i>Microdochium bolleyi</i> , endofytismus, obrana rostlin
Počet stran	76
Počet příloh	11
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Pavla Polnická
Title of thesis	Using of model organism <i>Brachypodium distachyon</i> in phytopathology with a focus on fungal pathogens
Type of thesis	Bachelor
Department	Departement of Botany
Supervisor	Mgr. Pavel Matušinsky, Ph.D.
The year of presentation	2022

### Abstract

The presented bachelor thesis deals with the model plant *Brachypodium distachyon* and two fungal organisms, *Fusarium culmorum* and *Microdochium bolleyi*, whose mutual interaction was investigated on the model organism.

In the theoretical part, I tried to characterize *B. distachyon* and non-pathogenic endophytic organism *M. bolleyi*. Attention was also focused on *F. culmorum*, a pathogenic fungus causing diseases of cereal stalks, necrosis of leaves, ears and other plant damage, which can cause significant agricultural losses. Changes that occur at the gene expression level in the plant that resists the pathogen have also been described.

In the experimental part of the work, I tried to prove whether endophytic fungal organisms can affect the pathogenic effects of diseases caused by members of the genus *Fusarium*. These findings, obtained by studying the effects of *M. bolleyi* together with *F. culmorum* on *B. distachyon*, could then ideally be applied to plant protection against *Fusarium* diseases of wheat, barley, maize and other monocotyledonous agricultural crops.

Keywords	<i>Brachypodium distachyon</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , cereal diseases, <i>Microdochium bolleyi</i> , endofytism, plant defense system
Number of pages	76
Number of appendices	11
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně  
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne .....

Pavla Polnická

#### Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlu Matušinskému, Ph. D., vedoucímu mojí práce, za ochotu, vstřícnost, trpělivost, věnovaný čas a odborné vedení. Dále bych ráda poděkovala Oddělení fytopatologie na Katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí vybavení a zázemí.

# OBSAH

Seznam symbolů a zkratek .....	9
1 ÚVOD.....	11
2 CÍLE PRÁCE .....	13
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	14
3.1 Charakterizace organismu <i>Brachypodium distachyon</i> .....	14
3.1.1 Taxonomie a nomenklatura.....	14
3.1.2 Genom .....	15
3.2 <i>Brachypodium distachyon</i> jako modelový organismus .....	15
3.3 <i>Brachypodium distachyon</i> v rostlinolékařství .....	17
3.3.1 Vybraná onemocnění obilnin prokázaná u organismu <i>Brachypodium</i> .....	17
3.3.1.1 Rzivost .....	17
3.3.1.2 Rice blast .....	18
3.3.1.3 Černání kořenů a báze stébel obilnin .....	18
3.3.1.4 Antraknóza.....	18
3.3.1.5 Stéblolam.....	18
3.3.1.6 Tmavohnědá skvrnitost ječmene .....	18
3.4 Charakterizace mikroorganismů rodu <i>Fusarium</i> .....	19
3.4.1 Vybraní zástupci rodu <i>Fusarium</i> .....	21
3.4.2 Vybraná onemocnění obilnin způsobená <i>Fusarium</i> spp. ....	21
3.4.2.1 Růžovění klasů .....	22
3.4.2.2 Padání a spála klíčnicích rostlin .....	22
3.4.2.3 Kořenová hniloba.....	23
3.4.2.4 Krčková hniloba .....	23
3.5 Charakterizace rostlinného mikrobiomu .....	23
3.5.1 Charakterizace mykorrhizy .....	23
3.5.2 Charakterizace endofytismu.....	23
3.5.2.1 Charakterizace mikroorganismu <i>Microdochium bolleyi</i> (R. Sprague) de Hoog et Herm.-Nijh., 1977 .....	24
3.6 Obrana rostlin vůči patogenům .....	25
3.6.1 Pattern-triggered immunity .....	26
3.6.1.1 MAMP-triggered immunity.....	26
3.6.2 Effector-triggered immunity .....	26
3.7 Systémová rezistence rostlin .....	28
3.8 Imunitní systém jednoděložných rostlin .....	28
3.9 Exprese obranných genů a jejich stanovení.....	28
3.9.1 Geny <i>PR1</i> .....	29
3.9.2 Gen <i>Ubi4</i> .....	29

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	30
4.1	MATERIÁL .....	30
4.1.1	Biologický materiál.....	30
4.1.2	Chemikálie .....	30
4.1.3	Primery.....	30
4.1.4	Enzymy .....	31
4.1.5	Směsi.....	31
4.1.5.1	Média .....	31
4.1.5.2	Roztoky.....	31
4.1.6	Komerční soupravy.....	31
4.1.7	Přístrojové vybavení .....	31
4.1.8	Laboratorní pomůcky.....	32
4.1.9	Ostatní materiál .....	32
4.1.10	Software.....	33
4.2	METODY .....	33
4.2.1	Příprava <i>M. bolleyi</i> potřebného k inokulaci semen .....	33
4.2.2	Příprava prosa potřebného k inokulaci semen .....	33
4.2.3	Výsev semen .....	33
4.2.4	Inokulace semen .....	34
4.2.5	Namnožení <i>F. culmorum</i> .....	35
4.2.6	Infekce listů rostlin patogenním <i>F. culmorum</i> .....	36
4.2.7	Odběry, zpracování a fixace rostlin.....	39
4.2.8	Mikroskopování .....	40
4.2.9	Izolace RNA s využitím RNeasy® Plant Mini Kitu .....	41
4.2.10	Reverzní transkripce s využitím Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kitu.....	42
4.2.11	Real time PCR (qPCR).....	43
5	VÝSLEDKY .....	45
5.1	Prokázání úspěšné inokulace kořenů <i>M. bolleyi</i> .....	45
5.2	Prokázání úspěšné infekce patogenem <i>F. culmorum</i> .....	45
5.3	Vyhodnocení napadení listů.....	46
5.3.1	Statistické hodnocení .....	46
5.4	Testování primerů pro geny <i>PR1-5</i> a <i>Ubi4</i> .....	49
5.4.1	Křivka tání.....	49
5.4.2	Efektivita reakce .....	50
5.4.3	Dvojkové ředění.....	51
5.5	Statistická analýza exprese genů .....	52
5.5.1	Statistická analýza exprese genu <i>PR1-5</i> po qPCR .....	52
5.5.2	Statistická analýza exprese genů <i>PR1-5</i> a <i>Ubi4</i> .....	52

6	DISKUZE .....	55
7	ZÁVĚR .....	57
8	LITERATURA .....	58
9	PŘÍLOHY .....	66
	PŘÍLOHA A .....	66
	PŘÍLOHA B .....	67
	PŘÍLOHA C .....	68
	PŘÍLOHA D .....	69
	PŘÍLOHA E .....	70
	PŘÍLOHA F .....	71
	PŘÍLOHA G .....	72
	PŘÍLOHA H .....	73
	PŘÍLOHA CH .....	74
	PŘÍLOHA I .....	75
	PŘÍLOHA J .....	76



## Seznam symbolů a zkratek

AM	arbuskulární mykorrhiza
Bd	<i>Brachypodium distachyon</i>
BOP (klad)	klad podčeledí <i>Bambusoideae</i> , <i>Oryzoideae</i> , <i>Pooideae</i>
cDNA	complementary DNA, komplementární DNA
DAMP	damage-associated molecular pattern, molekulární vzory asociované s poškozením
df	Degrees of Freedom, stupně volnosti
DON	deoxynivalenol
dpi	days post inoculation/infection, dny po inokulaci/infekci
DTI	DAMP-triggered immunity, imunita spouštěná molekulárními vzory asociovanými s poškozením
ET	etylen
ETI	effector-triggered immunity, efektořem spouštěná imunita
F	hodnota testového křiteria
F krit	křitická hodnota
Fc0	varianta experimentu bez infekce <i>Fusarium culmorum</i>
Fc1	varianta experimentu s infekcí <i>Fusarium culmorum</i>
FCR	<i>Fusarium crown rot</i> , Krčková hniloba
FHB	<i>Fusarium head blight</i> , Růžovění klasů
JA	kyselina jasmonová
JGI	Joint Genome Institute
MAMP	microbe-associated molecular pattern, molekulární vzory asociované s mikroorganismy
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogenem aktivovaná proteinkinasa
Mb0	varianta experimentu bez inokulace <i>Microdochium bolleyi</i>
Mb1	varianta experimentu s inokulací <i>Microdochium bolleyi</i>
Mbp	mega base pairs, mega páry basí
mRNA	messenger RNA
MS	Mean Square, průměrný čtverec
MTI	MAMP-triggered immunity, imunita spouštěná molekulárními vzory asociovanými s mikroorganismy
NIV	nivalenol
NLR	nucleotide-binding (NB), leucine-rich repeat (LRR) receptor
P	P value, hodnota P, hladina statistické významnosti
PACMAD (klad)	klad podčeledí <i>Panicoideae</i> , <i>Aristidoideae</i> , <i>Chloridoideae</i> , <i>Micrairoideae</i> , <i>Arundinoideae</i> , <i>Danthonioideae</i>

PAMP	pathogen-associated molecular pattern, molekulární vzory asociované s patogeny
PDA	potato dextrose agar, bramborovo-dextrosový agar
<i>PR</i>	pathogenesis-related gen, gen spřažený s patogenezí
PRR receptory	pattern-recognition receptors
PTI	PAMP-triggered immunity, imunita spouštěná molekulárními vzory asociovanými s patogeny
PTI	pattern-triggered immunity, imunita spouštěná dle vzorů
RBOHD	respiratory burst oxidase homolog protein D
RLS	<i>Ramularia</i> leaf spot, Tmavohnědá skvrnitost ječmene
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
rpm	rounds per minute, otáčky za minutu
SA	kyselina salicylová
SAR	system acquired resistance, systémová získaná rezistence
spp.	species, druhy (v taxonomii)
SS	Sum Of Squares, součet čtverců
<i>Ubi</i>	polyubiquitinový gen
UPOC-FUN	Collection of Phytopathogenic Microorganisms, Czech Republic; Sbírka fytopatogenních organismů, Česká republika
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce

# 1 ÚVOD

Ve vědě všeobecně platí, že nejlepší metodou výzkumu určitého organismu je využití jeho samotného. Vlastnosti některých rostlin (velikost, rozsáhlý genom, dlouhá generační doba) tomu ale brání. Vzhledem k vlastnostem hospodářsky významných obilnin, pro výzkum nevhodným, a k obrovským ztrátám, jež na jejich výnosech každoročně způsobují rozličná onemocnění, bylo třeba nalézt vhodný modelový organismus, který by umožnil posun ve výzkumu možné obrany proti těmto chorobám.

*Brachypodium distachyon*, jednoděložná rostlina z čeledi *Poaceae*, je pro své unikátní vlastnosti v posledních letech využívána právě jako modelový organismus jednoděložných rostlin. Zástupci této čeledi se vyznačují svým složitým genomem, *B. distachyon* se však řadí ke druhům s nejmenším mezi travami zjištěným genomem, navíc již i osekvenovaným a velmi kompaktním. Rostlinu dále charakterizuje malý vzrůst, krátký životní cyklus, samosprašnost a mnoho dalších předností. Především je však *B. distachyon* evolučně blízké nejvýznamnějším obilovinám, tedy pšenici, žitu nebo ječmeni, také pak náchylné k nákaze mnohými patogeny představujícími problém i při napadení těchto rostlin. To z něj činí vhodný modelový organismus pro studium biologie obilovin.

Rod *Fusarium* je různorodou skupinou houbových organismů, jejíž zástupci se běžně vykytují po celém světě. Tyto organismy dokážou způsobovat rozličná onemocnění většiny rodů kulturních rostlin, včetně všech členů čeledi *Poaceae*. *Fusarium* spp. se řadí mezi nejdůležitější fytopatogenní a toxigenní rody vláknitých hub vyskytujících se v obilovinách. Někteří zástupci tohoto rodu navíc produkují mykotoxiny, jimiž infikovaná zrna se stávají nevhodná ani ke konzumaci člověkem, ale ani jako krmivo. Rod *Fusarium* je zastoupen mnoha zástupci, v práci bylo využíváno *F. culmorum*.

V práci bylo využito také endofytického druhu *Microdochium bolleyi*. Endofyty jsou v přírodě všudypřítomné. Tyto endosymbiotické mikroorganismy inter- či intracelulárně kolonizují rostlinu, avšak nezpůsobují jí žádnou újmu. Naopak, podporují její růst a jsou schopny zvyšovat i její odolnost vůči onemocněním či jiným formám stresu. *M. bolleyi* bylo v práci využito, neboť velmi často osidluje rostliny čeledi *Poaceae*, na pšeničných kořenech je nejčastěji se vyskytujícím endofytem.

Rostliny mají proti mikroorganismům propracovaný systém vrozené imunitní odezvy. Většinou vlivu patogenů odolají díky fyzickým bariérám, pokud jsou však překonány, je třeba, aby se rostlina bránila napadení jinak. K tomu využívá specifické molekulární mechanismy, při interakci mezi patogenem a rostlinou dochází také k expresi rozličných s obranou spřažených genů. Mezi takové geny patří i geny *PR1*, u nichž jsem změny exprese pozorovala.

Vhled do obranných procesů rostliny je možný například analýzou transkriptomu, která umožní geny reagující na infekci identifikovat. Studium s obranou souvisejících genů

se jeví jako jedna ze strategií rozvoje nových metod obrany proti rostlinným onemocněním.

## 2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části mojí práce bylo charakterizovat jednoletou rostlinu *B. distachyon* a vysvětlit důvody, proč je vhodným modelovým organismem pro výzkum jednoděložných rostlin. Tato část charakterizovala také houbové organismy využívané v práci. Popsána byla skupina houbových organismů *Fusarium* spp., dále onemocnění, která její zástupci způsobují a také *F. culmorum*, v práci využité. Další odstavce si kladly za cíl věnovat se endofytismu a použitému endofytu, *M. bolleyi*. Také se pak zaměřit na obranné mechanismy rostlin a změny, které probíhají při napadení patogenem v rostlině na molekulární úrovni. Teoretická část byla věnována i s obranou spřaženým genům rostliny, jejichž exprese se vlivem infekce mění, konkrétně genu *PR1-5*.

Cílem praktické části práce bylo prokázat, zda endofytické houbové organismy mají schopnost eliminovat patogení účinky fusariových chorob, konkrétně pak, zda přítomnost *M. bolleyi* u testovaných rostlin ovlivňuje rozvoj infekce *F. culmorum*. Cílem bylo posoudit vlivy *F. culmorum* a *M. bolleyi* při interakci obou těchto organismů na jedné rostlině, či při působení každého z těchto organismů na rostlinu zvlášť. Testovanými rostlinami byly rostliny modelového organismu jednoděložných rostlin *B. distachyon*. Pozornost byla věnována také posouzení vlivu endofytu a patogenu na expresi markerového genu *PR1-5* zapojeného do obranných procesů rostlin.

### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

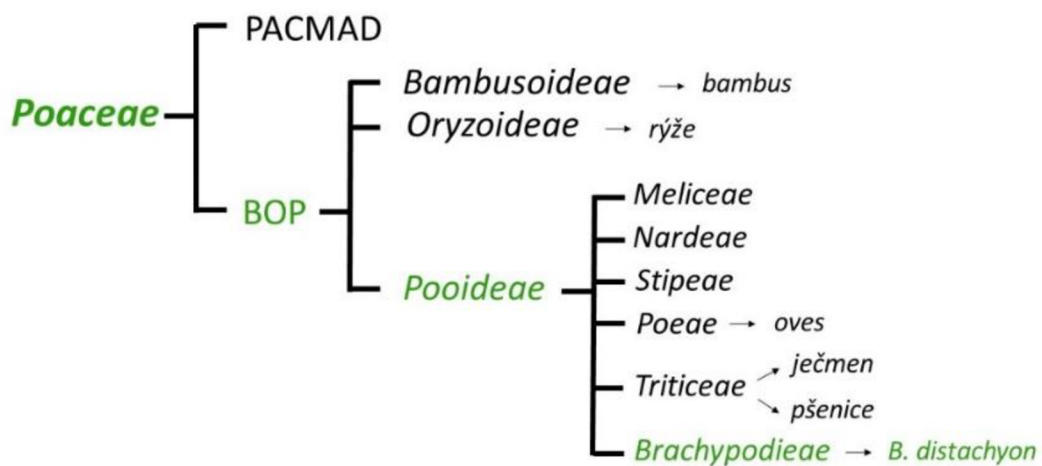
#### 3.1 Charakterizace organismu *Brachypodium distachyon*

*Brachypodium distachyon* (L.) P.Beauv. (Válečka dvouřadá) je jednoděložná rostlina patřící do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). V našich podmínkách bychom tuto rostlinu řadící se mezi trávy nenašli. Je rozšířena v Jižní Evropě a Středomoří (Grau *et al.*, 1998), které je také i jejím původním stanovištěm (Catalán *et al.*, 2016a). Přestože je *B. distachyon* relativně teplomilná rostlina, patří ke druhům méně adaptovaným na sucho než ostatní druhy rodu *Brachypodium* (Manzaneda *et al.*, 2015). Typickým prostředím této rostliny jsou oblasti s teplými, suchými léty a mírnými, vlhkými zimami (Garvin *et al.*, 2008). *B. distachyon* má velmi dobré adaptační schopnosti na rozdílné nadmořské výšky, neboť jeho populace běžně osidlují nejen pobřežní oblasti, ale i horské polohy (Jenkins *et al.*, 2003).

Vytváří 2–15 cm dlouhá stébla rostoucí v malých řídkých trsech. Listové čepele se šedozeleným zbarvením obsahují velké množství trichomů a dorůstají délky 1–12 cm, šířky pak do 4 mm. V období květu, které nastává od dubna do června, tvoří rostlina 2–4 cm dlouhá květenství, nevětvený klas, složený z klásků ve dvou řadách, střídavě vyrůstajících z vřetene. Tyto klásky, tmavě zeleného či šedozeleného zbarvení, jsou velmi úzké, dlouhé pak 20–30 mm. Na svém povrchu mohou obsahovat trichomy či nikoli. Na vrcholu samotného klásku se pak nachází 7–15 mm dlouhá osina (Derbyshire *et* Byrne, 2006; Grau *et al.*, 1998). *B. distachyon* má krátký životní cyklus (~ 8–10 týdnů), který závisí na environmentálních růstových podmínkách (Draper *et al.*, 2001).

##### 3.1.1 Taxonomie a nomenklatura

Před 50–70 miliony lety se z jednoděložných rostlin oddělila čeleď *Poaceae* (Salse *et al.*, 2008). Tato čeleď zahrnuje přes 600 rodů a 10 000 druhů, které dominují mnoha ekologickým a zemědělským systémům (Gaut, 2002; Kellogg, 2001). Z čeledi *Poaceae* se poté vyčlenily dvě větve, klad PACMAD a klad BOP. Do kladu PACMAD se řadí podčeledi *Panicoideae* (3241 druhů ve 247 rodech), *Aristidoideae* (367 druhů ve 3 rodech), *Chloridoideae* (1602 druhů ve 124 rodech), *Micrairoideae* (184 druhů v 8 rodech), *Arundinoideae* (40 druhů ve 14 rodech), *Danthonioideae* (292 druhů v 19 rodech). Do kladu BOP náleží podčeledi *Bambusoideae* (1670 druhů ve 125 rodech), *Oryzoideae* (115 druhů v 19 rodech) a *Pooideae* (3968 druhů ve 202 rodech) (Clark *et al.*, 1995; Sánchez-Ken *et* Clark, 2010). A právě do poslední zmíněné skupiny, podčeledi *Pooideae*, patří i *B. distachyon* (Draper *et al.*, 2001) (Obr. 1).



**Obr. 1:** Taxonomické zařazení *B. distachyon* (vyznačeno zeleně) a dalších příbuzných rostlin; BOP (klad podčeledí *Bambusoideae*, *Oryzoideae*, *Pooideae*), PACMAD (klad podčeledí *Panicoideae*, *Aristidoideae*, *Chloridoideae*, *Micrairoideae*, *Arundinoideae*, *Danthonioideae*); (převzato a upraveno z Yu, 2019).

### 3.1.2 Genom

*Pooideae* je největší podčeleď čeledi *Poaceae*. Její zástupci se vyznačují značnou velikostí ale i složitostí svých genomů (Salamini *et al.*, 2002). Genom *Brachypodium* se, s pěti chromozomy ( $n = 5$ ) o velikosti celkem 272 Mbp (mega párů bází), řadí ke druhům s nejmenším mezi travinami zjištěným genomem (Huo *et al.*, 2009; The International *Brachypodium* Initiative, 2010). Při srovnání s ostatními travami je pak genom *B. distachyon* velmi kompaktní. Předpokládaný počet protein-kodujících sekvencí je odhadován na 25000 (The International *Brachypodium* Initiative, 2010). Sekvence genomu *B. distachyon* včetně sekvenace transkriptomu byla již dokončena (Scholthof *et al.*, 2018). Genom je veřejně dostupný skrze Phytozome ve verzi 3.1 z roku 2017 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

### 3.2 *Brachypodium distachyon* jako modelový organismus

Pro studium biologie, ekologie, evoluční biologie, genetiky či buněčné biologie jsou nepostradatelné modelové organismy (Leonelli *et Ankeny*, 2013). Aby se rostlina dala považovat za modelový organismus, měla by splňovat minimálně tyto dva faktory: (1) měla by mít takové vlastnosti, aby snadnými metodami získané výsledky, dosažené z výzkumu takových rostlin, efektivně odpovídaly na vědecké otázky, (2) informace vytěžené z jejich výzkumu by poté měly být aplikovatelné na cílové rostliny, u nichž jednoduchých výzkumných metod používat nelze (Ankeny *et Leonelli*, 2011).

Ve vědě všeobecně platí, že nejlepší metodou k výzkumu určitého organismu je využití jeho samotného (Fitzgerald *et al.*, 2015). Vlastnosti některých rostlin však brání jejich využívání k výzkumným účelům. Mezi tyto vlastnosti řadíme například jejich velikost, rozsáhlý genom či dlouhou generační dobu (Jung *et al.*, 2008).

Funkci modelového organismu ve výzkumu dvouděložných rostlin plní *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., 1842 (Huseníček rolní). Kvůli odlišnostem jednoděložných a dvouděložných rostlin, jakými jsou rozdílná fyziologie, morfologie či molekulární rozdíly, ale bylo zapotřebí nalézt i jednoděložný modelový organismus (Brkljacic *et al.*, 2011), který by byl dobře využitelný pro výzkum hospodářsky nepostradatelných plodin, jakými jsou obiloviny. Ty jsou bohužel pro výzkumné účely nevhodné, a to právě pro svoji velikost, délku životního cyklu i rozsáhlý genom (Fitzgerald *et al.*, 2015). Genetická informace *Triticum aestivum* L., 1753 (pšenice setá) (~17000 Mbp) navíc obsahuje tři nezávislé tzv. allohexaploidní genomy (Salamini *et al.*, 2002). Mnoho vlastností charakterizujících modelový organismus má i *Oryza sativa* L., 1753 (rýže setá) s velikostí genomu ~430 Mbp (Sasaki a Antonio, 2004). Mohla by se tak zdát vhodným modelovým organismem, avšak i její vyšší vzrůst, dlouhá generační doba a relativně náročné pěstitelské podmínky brání jejímu plnému využití v tomto směru (Jung *et al.*, 2008).

Díky svým nesporným výhodám, jakými jsou například malý vzrůst, krátká generační doba, samosprašnost, ale i možnost snadného křížení či vysoká schopnost transformace, bylo *B. distachyon* shledáno jako modelový organismus, efektivně využitelný právě pro jednoděložné rostliny (Brkljacic *et al.*, 2011; Garvin, 2008; Vain, 2011; Vogel *et Bragg*, 2009). Mezi jeho další přednosti patří jednoletost, snadné pěstování v laboratorních podmínkách, schopnost vytvářet inbrední linie, diploidní genom (Scholthof *et al.*, 2018).

Anatomie i environmentální a výživové požadavky kořenů *B. distachyon* a kořenů pšenice jsou srovnatelné (Chochois *et al.*, 2012; Watt *et al.*, 2009). Při porovnání jsou srovnatelné i kořenové exudáty a mikrobiální rhizosféra těchto rostlin, kde žijí bakterie řádu *Burkholderiales*, *Sphingobacteriales*, a *Xanthomonadales*, dále pak i houbové organismy náležící do oddělení *Ascomycota*, *Chytridiomycota*, a *Basidiomycota* (Kawasaki *et al.*, 2016). Stejně jako pšenice, ječmen či rýže má *B. distachyon*, coby rostlina mírného pásma, podobné adaptační schopnosti na toto podnebí, také C3 fotosyntetické mechanismy a reakce na abiotický stres jsou obdobné (Des Marais *et Juenger*, 2016). Především je však *B. distachyon* evolučně blízké nejvýznamnějším obilovinám, tedy pšenici, žitu nebo ječmeni. A právě to z něj činí vhodný modelový organismus pro studium biologie obilovin (Brkljacic *et al.*, 2011; Catalán *et al.*, 2016b; Draper *et al.*, 2001).

Modelové a experimentální organismy jsou pro biologii zásadní, neboť pokroky v biologii se vždy uskutečňovaly díky jejich využívání (Leonelli *et Ankeny*, 2013). Experimentální organismy jsou, narozdíl od modelových, využívány jako nástroje k řešení specifických otázek či jsou zkoumány pro své neobvyklé vlastnosti (Leonelli *et Ankeny*, 2013). Jako experimentální rostliny byly v poslední době využívány *Nicotiana attenuata* Torr. ex S.Watson, *Nicotiana benthamiana* Domin či *O. sativa* (Scholthof *et al.*, 2018).



### 3.3 *Brachypodium distachyon* v rostlinolékařství

*Brachypodium* má jako modelový organismus své široké uplatnění právě v rostlinolékařství, vědním oboru, který zkoumá rozličná rostlinná onemocnění a hledá způsoby, jak jim předcházet. Konkrétně ve výzkumu se zaměřením na onemocnění těchto cereálních plodin je jeho rozvoj z ekonomického hlediska opravdu perspektivní. *B. distachyon* je náchylné k nákaze mnohými patogeny, jež představují problém i při napadení významných obilovin (Fitzgerald *et al.*, 2015). Při studiu rostlinných patogenů je nejpoužívanějším genotypem Bd-21 (Dinolfo *et al.*, 2021).

Onemocnění a choroby hospodářsky významných obilnin pak představují zásadní problém, který chronicky limituje jejich výnosy (Oerke, 2006). U rýže, pšenice a kukuřice, jsou zemědělské ztráty, způsobené jejich onemocněními, v celosvětovém měřítku odhadovány přibližně na 10 % (Oerke, 2006). Rostliny z čeledi *Poaceae* tvoří většinu lidské výživy (Somerville, 2006). Konkrétně 90 % potravy lidstva poskytuje cca 17 rostlinných druhů. Největší podíl pak tvoří obilná zrna (Simopoulos, 1999). Lidská populace stále roste a předpokládá se, že do roku 2050 dosáhne naše planeta 9 miliard obyvatel. Tato skutečnost představuje pro zemědělce, chovatele a vědce obtížnou výzvu, jak sladit produkci potravin s globálními potřebami (Peraldi, 2012).

#### 3.3.1 Vybraná onemocnění obilnin prokázaná u organismu *Brachypodium*

Při výzkumech zaměřených na *Brachypodium* již byla prokázána celá řada mikroorganismů, které dokážou tuto rostlinu napadat (Fitzgerald *et al.*, 2015). Houbovým organismům s touto schopností je věnována následující kapitola. Tato kapitola nezahrnuje patogeny rodu *Fusarium*, jež jsou schopny *Brachypodium* taktéž infikovat (Peraldi *et al.*, 2011). Jedná se o patogeny využívané i v méj bakalářské práci. Z toho důvodu jim byla věnována samostatná kapitola (3.4), onemocněním způsobeným těmito patogeny pak byla věnována kapitola (3.4.2).

##### 3.3.1.1 Rzivost

Rzivost (Rusts) je onemocnění způsobované houbovými patogeny rodu *Puccinia*, patřící mezi *Basidiomycota*. Rzi způsobují onemocnění mnoha různých rostlinných druhů, z hospodářsky významných rostlin například onemocnění pšenice, ječmene, čiroku, prosa či kukuřice. Rýže je jedinou cereální plodinou, u které ještě nebyly žádné tyto infekce zjištěny (Ayliffe *et al.*, 2011). Rzivost může postihnout prakticky celou nadzemní část rostliny. Některé rostliny, u nichž byla provedena infekce patogenem způsobujícím toto onemocnění, se pak vyznačovaly výrazně kratšími délkami kořenů než rostliny neinfikované (Fitzgerald *et al.*, 2015). *B. distachyon* i další druhy *Brachypodium* napadá *Puccinia brachypodii* G.H. Otth, 1861 (Barbieri *et al.*, 2011, 2012).

### 3.3.1.2 Rice blast

Onemocnění rýže, Rice blast, způsobuje *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch, 2002, zástupce *Ascomycetes* (Couch *et* Kohn, 2002). Jeho působením každoročně vznikají v zemědělství obrovské škody, které jsou globálně odhadovány na 10–30 % (Skamnioti *et* Gurr, 2009). Tento mikroorganismus napadá i *Brachypodium* (Routledge *et al.*, 2004).

### 3.3.1.3 Černání kořenů a báze stébel obilnin

Černání kořenů a báze stébel obilnin (Take-all) je způsobováno patogenem *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx *et* Olivier, 1952, patřícím mezi *Ascomycota*. Napadány bývají ječmen, žito, špalda a další zástupci trav, nejnáchylnějším druhem je však pšenice. V půdě či napadených zbytcích rostlin přežívají hyfy. Ty infikují kořeny, v nichž rozruší cévní svazky. Zásobování živinami je tak narušeno a růst kořenů ustává. Napadená rostlina postupně černá, od kořenů přes bázi stébla až po nejspornější listovou pochvu. Napadené rostliny pak lze díky poškozeným kořenům z půdy snadno vytrhnout, jejich klasy bývají prázdné. Ztráty na výnosech mohou při silném napadení přesahovat i 30 % (Häni *et al.*, 1993). Onemocnění je schopno napadat i rostliny *Brachypodium* (Sandoya *et* Buanafina, 2014).

### 3.3.1.4 Antraknóza

Antraknózu (Anthracnose disease) způsobuje houbový patogen *Colletotrichum cereale* Manns, 1908 (dříve *C. graminicola*), patřící mezi ekonomicky významné houbové patogeny (Cardwell *et al.*, 1989). Patogen napadá především trávy, ale byl popsán i na rýži, pšenici a ovsu (Fitzgerald *et al.*, 2015). *C. cereale* je schopno infikovat také *Brachypodium* (Sandoya *et* Buanafina, 2014).

### 3.3.1.5 Stéblolam

Stéblolam (Eyespot) je onemocnění způsobované mikroorganismy *Oculimacula yallundae* (Wallwork *et* Spooner) Crous *et* W. Gams, 2003 a *Oculimacula acuformis* (Boerema, R. Pieters *et* Hamers) Crous *et* W. Gams, 2003 (dříve *Tapesia yallundae* a *Tapesia acuformis*) (Crous *et al.*, 2003). Onemocnění je častější v chladných a vlhkých oblastech světa (Lucas *et al.*, 2000). Jedná se o chorobu bází stébla pšenice a dalších malozrnných obilovin (Crous *et al.*, 2003). Na listových pochvách rostlin napadených stéblolamem se tvoří léze oválného tvaru a s tmavými středy (Daniels *et al.*, 1991). V důsledku výrazně sníženého transportu živin právě v oblasti báze stébla a predispozicím k následnému poléhání rostlin může docházet k výraznému snížení výnosu (Lucas *et al.*, 2000). *O. yallundae* i *O. acuformis* jsou schopny napadat *Brachypodium* (Peraldi *et al.*, 2014).

### 3.3.1.6 Tmavohnědá skvrnitost ječmene

Původcem tmavohnědé skvrnitosti ječmene (Ramularia leaf spot, RLS) je *Ramularia collo-cygni* B. Sutton *et* J. M. Waller, 1988 (dříve *Ophiocladium hordei*) (Sachs *et al.*, 1998).

Vlivem infekce *R. collo-cygni* vznikají na listech napadeného ječmene nekrotické skvrny, listy postupně ztrácí svoje zelené zbarvení. Onemocnění také vede k předčasnému stárnutí rostlin. RLS tak může v konečném důsledku vést ke značným ztrátám výnosů (Walters *et al.*, 2008). Onemocnění je schopno napadat také *Brachypodium* (Peraldi *et al.*, 2014).

### 3.4 Charakterizace mikroorganismů rodu *Fusarium*

Rod *Fusarium* patří do oddělení *Ascomycota*, řádu *Hypocreales* (masenkotvaré). Jedná se o různorodou skupinu organismů, jejíž zástupci se běžně vykytují po celém světě (Crous *et al.*, 2021; Jestoi *et al.* 2004; Parry *et al.*, 1995). Zástupci rodu *Fusarium* (Srpníčka) vyrůstají na různých substrátech, kde tvoří kolonie v podobě bělavě až růžově zbarvených povlaků či chomáčků. Jejich výtrusy, konidie, se vyznačují srpovitě zahnutým tvarem, právě jím je česká nomenklatura inspirována (Antonín, 2006; Čača *et al.*, 1981).



**Obr. 2:** Konidie *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., 1892 (Srpníčka stéblová), odebrané očkovací kličkou a naředěné ve vodě. Pozorované při zvětšení 400×. Foto: Pavla Polnická.

Organismy *Fusarium* spp. jsou schopny způsobovat rozličná onemocnění většiny rodů kulturních rostlin, včetně všech členů čeledi *Poaceae* (Gramineae). Z hospodářského hlediska tak můžeme *Fusarium* spp. zařadit mezi nejdůležitější fytopatogenní a toxigenní rody vláknitých hub napadajících obiloviny (Jestoi *et al.* 2004; Parry *et al.*, 1995).

Mnozí zástupci *Fusarium* tedy patří mezi známé patogeny, avšak většina je neškodnými endofyty (Gessler *et Kuc*, 1982; Hallmann *et Sikora*, 1994; Postma *et Rattink*, 1991; Rodríguez-Gálvez *et Mendgen*, 1995), často izolovanými ze zdravých kořenů asymptomatických rostlin. U těchto zástupců *Fusarium* byla prokázána schopnost potlačit onemocnění či napadení škůdci ze zástupců hmyzu (Sieber, 2002). Například u organismu *Fusarium oxysporum* Schltdl., 1824 (S. špičatovýtrusá) je >70 jeho forem patogenních (Armstrong *et Armstrong*, 1981). Každá tato forma však způsobuje příznaky pouze u jednoho či několika rostlinných druhů, zatímco u ostatních rostlin se vyskytuje jako nepatogenní endofyt. Výzkumy dokonce potvrzují, že u rostlin preinokulovaných

formami *F. oxysporum*, které pro ně nepředstavují patogen, došlo k eliminaci fusariosy po napadení. Tento jev označujeme pojmem „indukovaná rezistence“ či také „cross-protection“ (Davis, 1967; Matta, 1989). Endofytické organismy rodu *Fusarium* však neposkytují ochranu pouze proti ostatním zástupcům *Fusarium*, ale i proti dalším patogenům (Hallmann *et* Sikora, 1996).

Většina druhů rodu *Fusarium* se množí nepohlavně pomocí konidií (Gosman, 2001). Zástupci rodu *Fusarium* přežívají ve formě vegetativního mycelia v půdě. Zde žijí saprofytičky na úlomcích rostlin, uvnitř mrtvých zbytků těchto hostitelských pletiv. Kontakt s novým hostitelem probíhá náhodným stykem, chemotaxí nebo pomocí kořenových exsudátů difundujících do rhizosféry. Infekce může být také přenášena osivem (Aist, 1976; Čača *et al.*, 1981; Parry *et al.*, 1995). *Fusarium* pak následně do hostitele vniká různými poraněními či přirozenými otvory, dokáže však i penetrovat přímo intaktním povrchem hostitele (Cooke, 1977). Infekční částice většinou vstupují do rostlin v apikální oblasti kořenů, nejčastěji nedokonale vyvinutou endodermis. Hyfy po průniku vnikají do xylému a prorůstají jím. Pohyb infekce na větší vzdálenost pak zajišťují konidie, které unášejí transpirační proud rostliny (Dickinson *et* Lucas, 1982). Výše popsaná penetrace a také následná degradace pletiv je podpořena činností extracelulárních enzymů, které se v patogenech *Fusarium* spp. vyskytují (Cooke, 1977).

Infekce se mohou vyvinout na všech částech rostlin, ve všech jejich vývojových fázích. Projevují se vadnutím, plísněmi a hnilobou napadených rostlin (Miedaner, 1997). Obecně se hniloby, které tyto mikroorganismy způsobují, nazývají fusariosy (Antonín, 2006). Někteří zástupci *Fusarium* spp. způsobují rozsáhlá poškození pletiv (Cooke, 1977) a bývají také příčinou padání klíčnicích rostlin (Čača *et al.*, 1981). Postihují jednoleté byliny, trvalky i dřeviny a taktéž jejich skladované části (kořeny, oddenky, cibule i hlízy) (Kúdela *et al.*, 1989), u skladovaného ovoce způsobují jádřincové hniloby. Zástupci *Fusarium* spp. tedy významně ovlivňují úrodu. Jimi způsobené zemědělské ztráty mohou dosahovat i 50% (Čača *et al.*, 1981). Určité druhy *Fusarium* (*F. solani* a *F. oxysporum*) lze dokonce nalézt u lidí při patologiích rohovky, častěji pak u pacientů se sníženou imunitou (Dignani *et* Anaissie, 2004).

Některé *Fusarium* spp. produkují kyselinu fusariovou (Čača *et al.*, 1981) či mykotoxiny. Nejčastěji se vyskytujícími mykotoxiny produkovanými při nákaze v pšenici jsou trichotheceny, konkrétně pak deoxynivalenol (DON) a nivalenol (NIV) (Placinta *et al.*, 1999). Účinkem trichothecenů dochází k poškození centrální nervové soustavy (Čača *et al.*, 1981). Některé druhy *Fusarium* jsou schopny produkce i 3- nebo 15-acetylovaných derivátů DON, které vykazují cytotoxické účinky k makrofágům i dalším imunitním buňkám a disregulují tak imunitní odpověď. Produkují také zearalenony, mykotoxiny se závažnými estrogenními účinky lidí (Manning *et al.*, 2000). Toxickými efekty DON zjištěnými u pšenice jsou uvadání těchto rostlin a výskyt nekróz, které pak často vedou k blednutí

celé části nad místem napadení (Lemmens *et al.*, 2005). DON totiž inhibuje proteosyntézu hostitelských buněk tak, že se váže na 60S ribosomální podjednotku. To aktivuje signalizační dráhy vedoucí k programované buněčné smrti (Pestka *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005). Mykotoxiny z obilných zrn pak mohou být přítomny také v krmivech a potravinách a mohou vést k chronickým nebo akutním mykotoxikózám zvířat, ale i lidí (Marasas *et al.*, 1984). Infikovaná zrna se pak stávají nevhodná nejen ke konzumaci člověkem, ale nejsou už využitelná ani jako krmivo (Jansen *et al.*, 2005).

### 3.4.1 Vybraní zástupci rodu *Fusarium*

Již z předchozího textu vyplývá, že rod *Fusarium* je zastoupen mnoha zástupci. (Antonín, 2006).

*F. culmorum* (Obr. 2) tvoří trvalé spory, díky kterým může v půdě přetrvávat i bez přítomnosti rostlinného substrátu (Häni *et al.*, 1993). *F. culmorum* se množí nepohlavně pomocí konidií (Gosman, 2001). Při napadení pšenice vykazuje podobný průběh infekce jako při napadení *B. distachyon* (Peraldi *et al.*, 2011).

*Fusarium graminearum* Schwabe, 1839 (S. růžová) se u napadených rostlin projevuje červeným až červenohnědým zabarvováním jejich listů a dalších rostlinných částí. U kořenů dochází ke hnilobám, někdy způsobuje až poléhání a vadnutí celých rostlin. U napadených klásků je typické růžové zabarvení, infikované obilky jsou scvrklé a pokryté myceliem. *F. graminearum* napadá obilniny, ale i planě rostoucí trávy, ve kterých produkuje toxické látky, vyskytuje se také na mase a masných výrobcích (Antonín, 2006). Kromě nepohlavního tvoří i pohlavní stádium (teleomorfa *Gibberella zeae*) (Parry *et al.*, 1995), proto je schopno také produkce askospor, uvolňovaných z perithecií (Kazan *et al.*, 2012).

*F. culmorum* a *F. graminearum* byly prokázány jako jedny z nejsilnějších patogenů kultivarů ozimé pšenice, nejnižší patogenitu pak prokázalo *Fusarium moniliforme* J. Sheld., 1904 (S. moniliová) (Čača *et al.*, 1981). *F. moniliforme* se vyskytuje v půdě, ale i na mase či ve skladovaném obilí, kde produkuje toxické látky. *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, ale také i některé další zástupce *Fusarium* spp. není možno navzájem pouhým okem rozeznat, rozdíly jsou patrné až při mikroskopickém zkoumání (Antonín, 2006).

*F. oxysporum* po napadení rostliny způsobuje její žloutnutí a vadnutí, postupující od báze rostliny. Napadené cévní svazky se zbarvují oranžově až hnědě. Bývá patrné také zkřucování se rostliny. *F. oxysporum* je diferencováno v různé formy, specificky napadající rozličné hostitele (Antonín, 2006).

### 3.4.2 Vybraná onemocnění obilnin způsobená *Fusarium* spp.

Mezi patogeny způsobující jedny z nejvyšších ztrát výnosů pšenice patří houbové mikroorganismy rodu *Fusarium* (Nganje *et al.*, 2004). Ty způsobují řadu onemocnění,

kteřá postihují rostlinná pletiva, báze stébla, ale i podzemní část rostliny, kořenový systém. Mezi tato onemocnění patří například růžovění klasů, seedling blight, root rot či crown rot (Bottalico, 1998; Desmond *et al.*, 2008).

Níže popsaná onemocnění jsou ta, jež byla prokázána i u organismu *Brachypodium*.

#### **3.4.2.1 Růžovění klasů**

Růžovění klasů (*Fusarium* head blight, FHB) je způsobováno primárně patogenem *F. graminearum* (O'Donnell *et al.*, 2004), avšak mohou jej zapříčinit rovněž někteří další zástupci tohoto rodu, například *F. culmorum* (Kollers *et al.*, 2013). Onemocnění bývá spojováno až se 17ti různými druhy patogenů, a to i z rodu *Microdochium* (Parry *et al.*, 1995).

FHB se vyskytuje ve vlhkých a polovlhkých oblastech světa. Nejčastějšími hostiteli bývají ječmen a pšenice (Parry *et al.*, 1995). Z onemocnění, jakými jsou FHB, padání a spála klíčnicích rostlin, krčková hniloba či kořenová hniloba je pro pšenici FHB jedním z nejvýznamnějších a nejdestruktivnějších onemocnění, a to ekonomickými dopady i zdravotními riziky (Foroud *et al.*, 2009; Parry *et al.*, 1995). Ztráty na jejich výnosech se podepisují ve značné míře napříč Evropou, Asií, Kanadou, USA i Jižní Amerikou (Nganje *et al.*, 2004).

FHB rostlinu většinou napadá na počátku období květu, následuje rozvoj typických příznaků, jakými je blednutí klasů či na nich postupující nekrózy (Leonard *et al.*, 2003). Napadené rostliny se vyznačují nižší výtěžností zrna a bohužel i jeho nízkou kvalitou. Obsahují totiž mykotoxiny, které patogeny způsobující FHB produkují (Desjardins, 2007).

Přítomnost DON je pak jedním z faktorů podporujících rozvoj infekce FHB v pšenici (Jansen *et al.*, 2005), u ječmene je tento rozvoj zanedbatelný (Maier *et al.*, 2006). Akumulace DON byla prokázána i v klasech *B. distachyon*. Zvýšení koncentrace DON (přidáním do inokula) jednoznačně vedlo k rozvoji infekce a produkci většího množství konidií (Peraldi *et al.*, 2011). Jako nejefektivnější strategie, jak předcházet kontaminacím zrn trichothece, se zatím potenciálně jeví využívání kultivarů rezistentních k FHB infekcím (Buerstmayr *et al.*, 2009). Agrochemická opatření se totiž nejeví jako dostačující. Jednou ze základních obtíží při zvládání rezistence na nemoci je však neustálé přizpůsobování se původců onemocnění (Peraldi, 2012).

#### **3.4.2.2 Padání a spála klíčnicích rostlin**

Padání a spála klíčnicích rostlin (Seedling blight) je onemocnění mladých, vyklíčených rostlin, způsobované patogeny *F. culmorum* a *F. graminearum* (Miedaner, 1997). Rostliny, které nejsou touto chorobou zcela zničeny, jsou následně oslabené a vytvářejí pouze jedno stéblo s malým klasem (Parry *et al.*, 1995). Tyto přeživší rostliny se vyznačují

opožděným vývojem a zvýšeným sekundárním napadáním škůdci, jejich porosty jsou prořídlé (Miedaner, 1997).

#### **3.4.2.3 Kořenová hniloba**

Kořenová hniloba (Root rot) způsobuje hnědnutí a nekrózu kořenů. V důsledku toho je snížena vitalita rostlin, některé odumírají. Onemocnění je tak příčinou nižších zemědělských výnosů i kvality zrna (Mergoum *et al.*, 1998).

#### **3.4.2.4 Krčková hniloba**

Mezi další onemocnění, která způsobují patogeny rodu *Fusarium*, patří krčková hniloba (*Fusarium crown rot*, FCR). Toto onemocnění, opět se značným ekonomickým dopadem, (Murray *et Brennan*, 2009) je většinou způsobováno patogenem *F. pseudograminearum*. Zapříčinit jej však mohou i další druhy, a to také *F. graminearum* či *F. culmorum* (Chakraborty *et al.*, 2010).

### **3.5 Charakterizace rostlinného mikrobiomu**

Na rozhraní kořene a půdy dochází k neustálým změnám, které jsou způsobovány mechanickou a metabolickou aktivitou kořenů (Foster *et al.*, 1983). Periferní kořenové tkáně rostlin poskytují různorodá stanoviště, v nichž prosperují rozličné organismy. Mezi ně patří například i půdní bakterie a houbové organismy (Braun *et Lulev*, 1969), jež vykazují schopnost inter- či intracelulárně kolonizovat epidermální a vnější kortikální buňky u zdravých kořenů rostliny. Ale pouze endofyty a dále například i patogeny nebo mykorrhizní houby mohou pronikat do vnitřní části kortexu (Bazin *et al.*, 1990).

#### **3.5.1 Charakterizace mykorrhizy**

Mykorrhiza je druh symbiózy, která vzniká mezi kořeny rostlin a půdními houbami. Nejběžnějším typem tohoto vzájemně prospěšného (mutualistického) soužití je arbuskulární mykorrhiza (AM). Houby se schopností AM kolonizují kořeny rostlin za účelem zisku uhlíku. Rostlině pak houba pomáhá se ziskem vody a minerálních živin, především ty esenciální (dusík a fosfor) jsou pro růst a produktivitu rostlin zásadní. AM houby jsou složkami téměř všech suchozemských ekosystémů, AM probíhá u přibližně 80 % cévnatých rostlin (Hong *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2003).

#### **3.5.2 Charakterizace endofytismu**

Již v 19. století byly endofyty definovány jako „organismy, které napadají a které se usídlují v buňkách nebo tkáních hostitele“ (De Bary, 1866). Definice pak byla nakonec zpřesněna na „organismy, které zapříčiňují asymptomatické infekce uvnitř rostlinných pletiv“. Mezi endofyty tak definice neřadí patogenní houbové organismy, mykorrhizní ani mutualistické houby (Carroll, 1986). Carrollova definice endofytů byla o několik let později opět shledána jako nedostačující, neboť Freeman *et Rodriguez* (1993) pozorovali

patogen, který se vlivem mutace v jediném lokusu stal nepatogenním. Stávající definice tak byla přeformulována s tím, že „mezi endofyty patří každý organismus, který kdykoli během svého života osídlí rostlinný orgán, aniž by jeho působením došlo ke zjevné újmě na tomto hostiteli“ (Petrini, 1991). Wennström (1994) pak uvedl, že „endofyty jsou všechny organismy, které v okamžiku sběru rostliny osidlují pletiva jejího kořenového systému, zjevně vypadající jako funkční a zdravá.“

V přírodě jsou endofyty všudypřítomné (Nair *et* Padmavathy, 2014). Mají schopnost kolonizovat stonek, kořeny, řapíky či jiné části listů, květenství, plody, pupeny, semena, ale také odumřelé a duté hyalinní buňky rostlin (Hata *et* Sone, 2008; Specian *et al.*, 2012; Stępniewska *et* Kuzniar, 2013). Jedná se tedy o skupinu endosymbiotických mikroorganismů (houby či bakterie), které inter- či intracelulárně kolonizují rostlinu (Pimentel *et al.*, 2011; Singh *et* Dubey, 2015). Populace endofytů v rostlinných druzích je vysoce variabilní a závisí na různých faktorech, konkrétně například na druhu hostitele, jeho vývojovém stádiu či na prostředí (Dudeja *et* Giri, 2014).

Endofyty podporují příjem živin, a tedy i růst hostitele. Mají schopnost zvyšovat toleranci rostliny k různým příčinám abiotického či biotického stresu, mohou také zvyšovat odolnost rostlin vůči hmyzu a škůdcům. Jsou toho schopny díky produkci fytohormonů, enzymů a dalších bioaktivních sloučenin. Endofytické houby produkují látky využívané jako léky protirakovinné či léky s antibiotickými účinky, jimi produkované sloučeniny tak mají díky svým vlastnostem obrovský potenciál být využívány v medicíně, farmacii či kosmetice (Gouda *et al.*, 2016; Jalgaonwala *et al.*, 2011; Joseph *et* Priya, 2011; Parthasarathi *et al.*, 2012).

Kromě organismů, jimž se věnuje moje práce, můžeme mezi endofyty vyznačující se svými blahodárnými účinky na hostitele zařadit i další skupiny. Mezi jedny z nejznámějších endofytů patří například organismy čeledi *Clavicipitaceae* (Clay, 1988; Schardl *et* Phillips, 1997). Zástupci jednoho z jejích rodů, organismy rodu *Epichloë* jsou typické produkcí charakteristických alkaloidů a zmírňují tak účinky biotických i abiotických stresorů rostlin (Schardl *et al.*, 2004).

### **3.5.2.1 Charakterizace mikroorganismu *Microdochium bolleyi* (R. Sprague) de Hoog *et* Herm.-Nijh., 1977**

*M. bolleyi* bychom mohli taxonomicky zařadit do oddělení *Ascomycota*, řádu *Xylariales* (dřevnatkotvaré) (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016). Běžně kolonizuje trávy a obiloviny pocházející z různých prostředí (Mandyam *et al.*, 2010; Wirsal *et al.*, 2001). Velmi často osidluje byliny, především pak čeleď *Poaceae*. Na pšeničných kořenech bylo právě *M. bolleyi* prokázáno jako nejčastěji se vyskytující endofyt, frekvence výskytu pak závisela například na kultivaru pšenice či její velikosti (Reinecke, 1978; Reinecke *et* Fokkema, 1981). *M. bolleyi* na rostlině kolonizuje epidermální a kortikální buňky, které pak bývají vyplněny chlamydosporami se silně melanizovanými buněčnými stěnami (Sieber, 2002).



Murray *et al.* (1981) pozorovali, že při interakci *M. bolleyi* s ječmenem nevykazovaly jeho kořeny žádné známky napadení, přestože byly mikroorganismem kolonizovány ve značné míře. Ve studii prováděné s pšenicí pak nebyly prokázány ani žádné obranné reakce rostliny na kolonizaci *M. bolleyi*, pouze při pozorování s využitím transmisní elektronové mikroskopie (byla kolem intercelulárních hyf pozorována zvýšená elektronová hustota (Rothen *et al.*, 2018). Nejen tedy, že *M. bolleyi* jako endofyt nevykazuje známky patogenity, ale vykazuje také schopnost eliminovat rozličná rostlinná onemocnění (Fox-Roberts *et al.*, 1988). Tato schopnost již byla také prokázána při interakci s *F. culmorum* (Spiegel *et al.*, 1991), používaného v mojí práci. Z již zmiňovaných onemocnění pak bylo *M. bolleyi* prokázáno jako prostředek biologické ochrany proti stéblolamu (Hinton *et al.*, 1993) a černání kořenů a báze stébel obilnin (Kirk *et al.*, 1987a), tedy jako efektivní proti patogenům *O. yallundae* či *G. graminis*. Dále je pak *M. bolleyi* efektivní například při snižování příznaků napadení rostliny organismem *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, 1959 (Crous *et al.*, 2003; Fatemi *et al.*, 2018; Duczek, 1997; Kirk *et al.*, 1987a).

### 3.6 Obrana rostlin vůči patogenům

Studie interakcí hostitel-patogen se obvykle provádějí na konkrétním hostiteli, ze kterého následně probíhá izolace patogenu. Nejpoužívanějším modelem pro tyto účely je již zmiňovaná *A. thaliana* (Dangl, 1993), jež významně přispěla k pochopení stresových reakcí rostlin (Huala *et al.*, 2001). Ke studiu interakcí patogenů s travami, konkrétně pak ke studiu fusarios, se však *A. thaliana* nehodí, neboť není jejich přirozeným hostitelem. Příznaky napadení trav organismy rodu *Fusarium* spp. se tedy liší, trávy totiž vykazují v porovnání s *A. thaliana* rozdílnou stavbu buněčné stěny, bariéry pro patogeny (Sandoya *et al.*, 2014; Urban *et al.*, 2002).

Rostliny mají propracovaný systém vrozené imunitní odezvy vůči mikroorganismům (Nishad *et al.*, 2020). Proti většině patogenů se ubrání pomocí fyzických bariér, mezi které patří například tuhé buněčné stěny či vosková kutikula, trichomy či uzavření průduchů. Obranné mechanismy rostlin však nezahrnují jen fyzické bariéry. V rámci obrany může být zapotřebí zvýšit aktivitu peroxidáz, či akumulovat sekundární metabolity s antimikrobiálními vlastnostmi nebo proteiny spjaté s obrannou funkcí (Greenberg *et al.*, 2004; Reimer-Michalski *et al.*, 2016). I přesto mohou být ochranné bariéry rostliny překonány a vzniká buď onemocnění či vztah, mezi rostlinou a mikroorganismem prospěšný (Nishad *et al.*, 2020). V návaznosti na tyto různé interakce pak mohou rostliny svůj imunitní systém dle potřeby modulovat (Pieterse *et al.*, 2014).

Způsoby, jimiž se rostlina dokáže bránit, vysvětluje zig-zag model, který k obraně využívá dva molekulární mechanismy, PTI (pattern-triggered immunity) a ETI (effector-triggered immunity) (Jones *et al.*, 2006) (Obr. 3).

### 3.6.1 Pattern-triggered immunity

První spočívá v rozpoznání s poškozením asociovaných molekulárních vzorů, patogenů, či mikrobů pomocí PRR receptorů (pattern-recognition receptors). Ty jsou ukotveny v buněčných stěnách a zodpovídají za imunitní odpověď (Saijo *et al.*, 2018).

Mezi vzory spojované s poškozením buňky řadíme PAMP (pathogen-associated molecular pattern), MAMP (microbe-associated molecular pattern) a DAMP (damage-associated molecular pattern). Imunitní odezvy pak analogicky dělíme na PTI (PAMP-triggered immunity), MTI (MAMP-triggered immunity) a DTI (DAMP-triggered immunity). Tyto imunitní odezvy souhrnně označujeme jako PTI (pattern-triggered immunity) (Saijo *et al.*, 2018).

Vzhledem k tomu, že DTI souvisí s poraněním buňky, jež nemá s tématem práce souvislost, budou následující odstavce zaměřeny pouze na PTI a MTI.

#### 3.6.1.1 MAMP-triggered immunity

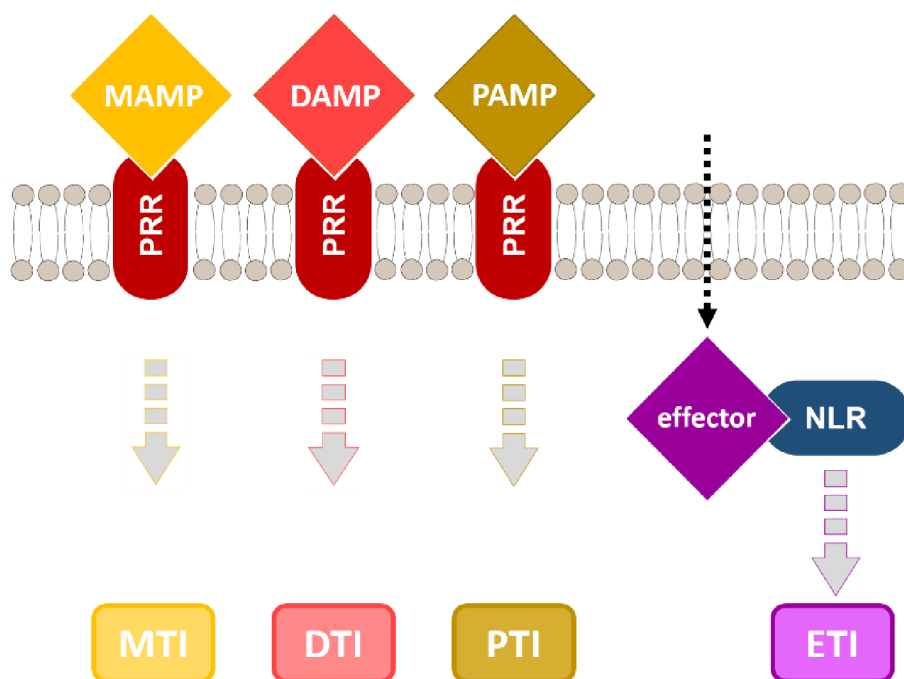
Mezi MAMP, které se mohou vyskytovat v mikrobech, patří bakteriální flagelin, bakteriální elongační faktory, houbový chitin či lipopolysacharidy (Nishad *et al.*, 2020). Pokud PRR, jako součást rostlinné buněčné membrány, rozpoznává MAMP, dochází k MTI. Ta se projevuje fosforylací Respiratory burst oxidase homolog protein D (RBOHD), při níž vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species) (Li *et al.*, 2014). K produkovaným ROS patří superoxidový anion, neschopný procházet membránou. Superoxid-dismutasa jej však přemění na peroxid vodíku (Podgórska *et al.*, 2017), který již prostupuje do buňky. Jeho přítomnost vyvolává průnik také vápenatých kationtů, z extracelulárního prostředí do cytosolu buňky, známý jako tzv.  $\text{Ca}^{2+}$  burst (Jeworutzki *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2017). Do buňky vstupuje taktéž i  $\text{H}^+$ . Reakcí na tyto změny je uvolnění draselných kationtů, chloridových aniontů a aniontů kyseliny dusičné, vně buňky. Následkem je extracelulární alkalizace a depolarizace cytoplazmatické membrány. V cytosolu přítomný vápenatý kation se váže na senzorické molekuly (calmodulin či  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní protein-kinasy), které takto aktivuje a ony fosforylují MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Jeworutzki *et al.*, 2010). Aktivace MAPK nastává po 2 až 3 minutách od počátečního vjemu MAMP a je zásadní pro další signalizační kaskády vedoucí k zajištění imunitní odpovědi. Fosforylovaná MAMP zajišťuje: (1) aktivaci enzymů, které následně katalyzují produkci rozličných metabolitů, (2) fosforylaci transkripčních faktorů a následnou expresi obranných genů, syntézu etylenu (ET), syntézu antimikrobiálních sloučenin či regulaci genů kódujících produkci kyseliny jasmonové (JA) a kyseliny salicylové (SA) (Bigeard *et al.*, 2015; Jagodzík *et al.*, 2018).

### 3.6.2 Effector-triggered immunity

Druhý mechanismus využívá k rozpoznání virulentních faktorů intracelulární NLR (nucleotide-binding (NB), leucine-rich repeat (LRR)) receptory. Patogen, ve snaze

úspěšně infikovat hostitelskou rostlinu, uvolňuje do hostitelské buňky efektorové proteiny, potlačující účinnost PTI a MTI. Efektorové proteiny se do hostitelské buňky dostávají buď přímo, působením bakterií, které je produkují, nebo prostřednictvím haustorií, kterými do buňky produkují tyto efektorové houby a oomycety. Jakmile buňka cytoplazmatickými NLR receptory rozpozná efektorovou aktivitu uvnitř, zahajuje silnou a efektivní imunitní odpověď, ETI. Aktivace těchto imunitních odpovědí spouští komplexní signální kaskádu vedoucí k potlačení patogenního útoku (Dangl *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2006; Nishad *et al.*, 2020).

Imunitní odpověď, ETI, zastavuje množení patogenu pomocí různých mechanismů, jakými jsou  $Ca^{2+}$  signalizace, produkce ROS či oxidu dusného. Dochází k transkripčním změnám v obranných genech, rovněž probíhá i syntéza hydrolytických enzymů, antimikrobiálních molekul či ukládání kalosy v místě infekce. V buňkách se akumuluje JA a SA (Caplan *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2013; Grant *et al.*, 2000). ETI je často doprovázena hypersenzitivními reakcemi, v infikovaných oblastech může docházet dokonce i k programované buněčné smrti (Mersmann *et al.*, 2010).



**Obr. 3:** Schéma, které zjednodušeným způsobem znázorňuje obranné mechanismy rostlinných buněk, pattern-triggered immunity (PTI) a effector-triggered immunity (ETI). První faktor, PTI, využívá k rozpoznání patogenu PRR receptory, ukotvené v cytoplazmatické membráně. PRR receptor dokáže rozpoznat faktor, který je schopen poškodit rostlinou buňku. Mezi tyto faktory řadíme MAMP, DAMP a PAMP. Rozpoznání faktoru MAMP vede k MTI, faktoru DAMP k DTI a faktoru PAMP k PTI. Druhý faktor, ETI, využívá k rozpoznání patogenu intracelulární NLR receptory, které mají taktéž schopnost rozpoznat faktor schopný poškození buňky. K takovým faktorům pak v tomto případě patří efektorové proteiny, které se prostřednictvím bakterií či haustorií dostávají do buňky. Po navázání na NLR receptor vyvolávají ETI.

### 3.7 Systémová rezistence rostlin

Systémovou rezistenci (SAR, system acquired resistance) získávají rostliny po opakovaném napadení patogenem. Rostlina v tomto případě aktivuje efektivní imunitní odpověď (Conrath, 2006). Takto může být rostlina následně ochráněna v řádu týdnů, měsíců, ale i celou sezonu. Jedním z důkazů přítomnosti SAR je šíření rezistence vůči patogenu v rámci napadené rostliny k jejím nenapadeným distálním částem (Ádám *et al.*, 2018). Dalším z charakteristických rysů SAR je její aktivita vůči široké škále patogenních organismů, mezi které řadíme zástupce hub, oomycet, bakterií i virů (Nishad *et al.*, 2020).

### 3.8 Imunitní systém jednoděložných rostlin

Většina znalostí o imunitním systému rostlin byla dosud získávána díky dvouděložnému modelovému organismu, *A. thaliana* a několika dalším experimentálním rostlinám, například *N. benthamiana* či *N. attenuata*. Jako experimentální modely sloužily rýže a kukuřice, avšak rozvoj znalostí o imunitě jednoděložných rostlin vůči patogenům stále brzdila absence jednoděložného modelového organismu i s jeho klíčovými rysy. Objev vlastností a charakteristik *B. distachyon* tak umožnil rozvoj výzkumu přímo na jednoděložných rostlinách (Mandadi a Scholthof, 2013).

### 3.9 Exprese obranných genů a jejich stanovení

Interakce mezi patogenem a rostlinou ovlivňuje expresi různých, s obranou spřažených genů rostliny. Vlivem infekce tedy v hostiteli dochází k velkým změnám. Například při infekci *B. distachyon* houbami rodu *Fusarium* může být odlišně exprimováno až 2500 genů (Powell *et al.*, 2017). Vhled do obranných procesů rostliny lze získat pomocí analýzy RNA, tedy analýzou transkriptomu. To umožní geny reagující na infekci identifikovat (Powell *et al.*, 2017). K této identifikaci, vyhodnocení imunitní odpovědi rostlin a kvantifikaci exprese vybraných genů je možno využít qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) (Kouzai *et al.*, 2016; Powell *et al.*, 2017). Jedná se o metodu, které předchází extrakce celkové RNA ze vzorků zmražených listů rostliny. Hladiny messenger RNA (mRNA) kandidátních genů jsou následně analyzovány pomocí qPCR, kdy je k mRNA syntetizována komplementární DNA (cDNA). Pokud je cílová sekvence na získané sekvenci cDNA známa, lze využít specifické primery, pro které je následně provedena hybridizace ke konkrétním oblastem transkriptu (Klickstein *et al.*, 2001; Rozen *et Skaletsky*, 2000).

K lepšímu pochopení molekulárních mechanismů interakce mezi patogenem a hostitelem a jako jedna ze strategií rozvoje nových metod obrany proti rostlinným onemocněním se tedy jeví studium genů, exprimovaných v průběhu infekce (Ma *et al.*, 2009). A právě mezi tyto obranné geny, patří i geny *PR1*, které jsem hodnotila ve svojí práci.

### 3.9.1 Geny *PR1*

*PR* (pathogenesis-related) geny jsou užitečnými nástroji pro sledování průběhu imunitních reakcí *Brachypodium* na specifické patogeny (Kouzai *et al.*, 2016), neboť při napadení rostliny vzrůstá jejich exprese. Konkrétně při infekci patogeny rodu *Fusarium* exprese vzrůstá u některých z *PR* genů i stonásobně (Powell *et al.*, 2017).

Exprese *PR1* genů je indukována fytohormony. Rodina genů *PR1* čítá celkem 11 genů, a to geny *PR1-1* až *PR1-11*. Tyto geny jsou lokalizovány celkem na čtyřech chromozomech: na prvním 5 genů, na druhém 1 gen, na třetím 4 geny a na čtvrtém chromozomu 1 gen (Mitsuhara *et al.*, 2008).

Ve své práci jsem měřila expresi genu *PR1-5* (Kouzai *et al.*, 2016).

### 3.9.2 Gen *Ubi4*

Gen *Ubi4* se řadí mezi tzv. polyubiquitinové geny. Tyto geny jsou charakteristické tandemovými repeticemi kódujících oblastí (Callis *et al.*, 1995). *Ubi4* je vhodným referenčním genem pro normalizaci dat genové exprese pomocí qPCR. Bylo totiž prokázáno, že hladiny jeho exprese jsou v různých tkáních a vzorcích rostlin, které byly ošetřeny růstovým hormonem, stabilní (Hong *et al.*, 2008).

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 MATERIÁL

#### 4.1.1 Biologický materiál

- Kmeny *M. bolleyi*
  - byly získány ze Sbírký fytopatogenních mikroorganismů UPOC-FUN-253–UPOC-FUN-260
- Kultura *F. culmorum*
  - *F. culmorum* bylo izolováno z napadených listů *B. distachyon* v roce 2019, pěstovaných v podmínkách skleníku.
- Proso
- Semena *B. distachyon* (Bd-21, JGI *Brachypodium* collection) (Bragg *et al.*, 2012)
  - Osivo bylo objednáno na těchto webových stránkách: <https://jgi.doe.gov/our-science/science-programs/plant-genomics/brachypodium/brachypodium-t-dna-collection/>
- Semena pšenice odrůdy Bohemia
  - nemořené osivo, získáno od Mgr. Svačinové ze Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži
- Výsevni substrát Florcom SV s obsahem rašeliny

#### 4.1.2 Chemikálie

- β-merkaptóethanol
- Jar
- RNase-free voda
- RNase AWAY™ Surface Decontaminant
- Tekutý dusík
- Voda

#### 4.1.3 Primery

Tab. 1: Seznam primerů využitých při qPCR.

Název genu	Forward/Reverse	Koncentrace [μmol]	Báze	Počet bází	Zdroj
<i>BdUbi4</i>	F	0,02	TGACACCATC GACAACGTGA	20	Hong <i>et al.</i> , 2008
<i>BdUbi4</i>	R	0,02	GAGGGTGGG CTCCTTCTGG	19	Hong <i>et al.</i> , 2008
<i>BdPR1-5</i>	F	0,02	CAGGTGGTGT GGAGGAAGTC	20	Kouzai <i>et al.</i> , 2016
<i>BdPR1-5</i>	R	0,02	CTCTCCCCGT TGAAGTTCCC	20	Kouzai <i>et al.</i> , 2016

#### 4.1.4 Enzymy

- DNáza na odstranění DNA ze vzorku RNA
- Reversní transkriptasa

#### 4.1.5 Směsi

- SYBR Green Master Mix (Top-Bio, Vestec, Czech Republic)
  - 2'-deoxynukleosid-5'-trifosfáty, chlorid draselný, chlorid hořečnatý, monoklonální protilátka antiTaq, SYBR Green, Taq DNA polymerasa, Tris-HCl, Triton X100, aditiva a stabilizátory

##### 4.1.5.1 Média

- Bramborovo-dextrosový agar (PDA)

##### 4.1.5.2 Roztoky

- Anilinová modř v laktoglycerolu (0,05%)
- Ethanol (70%)
- Ethanol (96%)
- Hydroxid draselný (1%)
- Kyselina chlorovodíková (1%)
- Roztok pro infikaci listů rostlin
  - Roztok pro „Fc0“ rostliny (bez infekce *F. culmorum*): 4 μl Jaru, 1600 μl sterilní destilované vody
  - Roztok pro „Fc1“ rostliny (s infekcí *F. culmorum*): 4 μl Jaru, 1600 μl sterilní destilované vody, *F. culmorum* (malé množství setřené očkovací kličkou z povrchu Petriho misky s kulturou) pracovní koncentrace následně upravena na  $5 \times 10^5$  konidií na ml

#### 4.1.6 Komerční soupravy

- RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74904)
- Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Cat. No. 05 081 955 001)

#### 4.1.7 Přístrojové vybavení

- Autokláv (Systec, VX-55)
- Box hlubokomrazicí (Telstar, Green Line)
- Centrifuga (Eppendorf, Centrifuge 5415 D)
- Flowboxy (Telstar PV-100, Merci)
- Fotoaparát k mikroskopu (Olympus, DP73 WDR)
- Homogenizátor (MP™, FastPrep® -24)
- Chladničky (Liebherr)

- Mikrocentrifuga (VWR MiniStar silverline)
- Mikroskop (Olympus, DP73 WDR)
- Minitřepačka (IKA® Vortex 1; IKA® MS 3 basic)
- Mraznička -20 °C (Liebherr, Premium NoFrost)
- NanoDrop (Thermo Scientific, Nanodrop 2000 Spectrophotometer)
- Qubit (ThermoFisher Scientific)
- Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CFX96TM)
- Termocycler (Bio-Rad, CFX Connect™, Real-Time System; Eppendorf, vapo.protect)
- Termostat (Bioer, Mixing Block MB-102)

#### **4.1.8 Laboratorní pomůcky**

- Keramické kuličky
- Mikrozkušavky různých velikostí
- Očkovací klička
- Odběrové zkumavky
- Pasteurova pipeta
- Petriho misky
- Pinzeta
- Pipety (Thermo Scientific, Finnpiquette® F1; Thermo Scientific, Finnpiquette®; Eppendorf, Research plus; Eppendorf, Research)
- Polystyrenová vana
- Stojany na mikrozkušavky
- Stripy
- Špičky (Eppendorf; Thermo Scientific; Neptune Brand, CLP Tools for Molecular Biology; VWR Next Generation Tip Refill)

#### **4.1.9 Ostatní materiál**

- Bambusové tyče
- Folie
- Fix
- Kovová konstrukce podpírající folii
- Květináče
- Nůžky
- Plastové sáčky
- Psací potřeby
- Štítky k označení rostlin



#### 4.1.10 Software

- CFX Manager 3.0 software (Bio-Rad)
- CFX Maestro software (BioRad) – software k vyhodnocení qPCR
- Microsoft Excel
- Statistica 14 software

## 4.2 METODY

### 4.2.1 Příprava *M. bolleyi* potřebného k inokulaci semen

Kmeny *M. bolleyi* byly získány ze sbírky fytopatogenních mikroorganismů UPOC-FUN-253–UPOC-FUN-260. Nejprve byly kultivovány na Petriho miskách s PDA, poté byly pro účely inokulace kultivovány na sterilním prosu při teplotě 18 °C. Před inokulací byly všechny kmeny rovnoměrně smíchány a inokulace byla provedena směsí všech kmenů.

### 4.2.2 Příprava prosa potřebného k inokulaci semen

Proso bylo dvakrát sterilizováno v autoklávu při 120 °C po dobu 20 min. Následně bylo rozděleno na 2 části. První byla ponechána bez *M. bolleyi*, do druhé byl přidán agar s tímto endofytickým mikroorganismem. Následně probíhala inkubace tohoto prosa v plastovém sáčku, při pokojové teplotě, ve tmě, po dobu cca 20 dní, s cílem zmnožení mikroorganismu (Obr. 4).



**Obr. 4:** Proso po 20ti dnech inkubace s *M. bolleyi*. Foto: Pavla Polnická.

### 4.2.3 Výsev semen

Plastové květináče o průměru cca 9 cm a výšce cca 13 cm byly naplněny výsevním substrátem do výšky cca 10 cm. Květináčů bylo použito 40 a byly rozděleny na dvě poloviny. Na povrch substrátu každého z první poloviny těchto květináčů bylo zaseto 6 semen *B. distachyon*, u druhé poloviny 6 semen pšenice Bohemia (Obr. 5, Obr. 6). Vybírána byla velká a vizuálně zdravá nepoškozená semena.



**Obr. 5:** Rozmístění semen pšenice Bohemia (vpravo) a *B. distachyon* (vlevo) na povrchu květináče s výsevním substrátem.



**Obr. 6:** Květináče s výsevním substrátem a semeny pšenice Bohemia (dvě řady vpravo) a *B. distachyon* (dvě řady vlevo). Foto: Pavla Polnická.

#### 4.2.4 Inokulace semen

Povrch poloviny květináčů s *B. distachyon* byl následně inokulován cca 2,5 g předem připraveným prosem obsahujícím 9 kmenů *M. bolleyi*. Inokulace prosem obsahujícím *M. bolleyi* proběhla také u poloviny květináčů se semeny pšenice *Bohemia* (Obr. 7).

Do zbývajících květináčů, tedy poloviny květináčů se semeny *B. distachyon* a poloviny se semeny pšenice *Bohemia*, bylo přidáno taktéž 2,5 g prosa, ovšem bez obsahu *M. bolleyi*.

Proso i semena v květináčích byly následně převrstveny přibližně dalším 1 cm zeminy a řádně zalaty vodou. Rostliny byly následně zalévány přibližně jedenkrát týdně a udržovány při teplotě okolo 24 °C.



**Obr. 7:** Květináče s výsevním substrátem, semeny pšenice Bohemia (dvě řady vpravo) a *B. distachyon* (dvě řady vlevo) a prosem obsahujícím *M. bolleyi*. Foto: Pavla Polnická.

#### 4.2.5 Namnožení *F. culmorum*

*F. culmorum* bylo izolováno z napadených listů *B. distachyon* v roce 2019, pěstovaných v podmínkách skleníku. Kmen *F. culmorum* byl pro účely vytvoření inokula asepticky, v prostředí flowboxu, přenesen na 10 Petriho misek s PDA. Tyto misky byly kultivovány za nepřetržitého ozařování UV-B světlem po dobu 14 dní, při teplotě 16 °C. Na povrchu mycelia se postupně vytvořily červeně zbarvené konidie (Obr. 8). Z misky, s jejich nejhojnějším výskytem, byl proveden pomocí sterilní očkovací kličky odběr a naředění na potřebnou koncentraci  $5 \times 10^5$  konidií/ml.

Počet konidií v jednom ml roztoku byl stanoven spočtením konidií v Bürkerově komůrce a poté ze zjištěných hodnot stanovena koncentrace, konkrétně pomocí vzorce: koncentrace konidií zásobní suspenze = (celkový počet konidií ve všech opakováních / počtem opakování)  $\times$  250 000. Z takto připravené zásobní suspenze bylo poté třeba připravit suspenzi pracovní, o koncentraci 500 000 konidií na 1 ml. Objem vody, kterou bylo třeba přidat do zásobní suspenze, byl stanoven dle vzorce: objem přidávané vody = [(koncentrace konidií zásobní suspenze / koncentrace konidií pracovní suspenze) - 1]  $\times$  objem zásobní suspenze.



**Obr. 8:** *F. culmorum* na Petriho miskách po 14ti dnech inkubace. Foto: Pavla Polnická.

#### 4.2.6 Infekce listů rostlin patogenním *F. culmorum*

Když rostliny *B. distachyon* dosáhly růstové fáze druhé odnože a rostliny pšenice fáze třetího listu, proběhla infekce jejich listů patogenním *F. culmorum*. Infikována byla polovina květináčů s rostlinami *B. distachyon* bez *M. bolleyi*, stejně tak i polovina květináčů s rostlinami *B. distachyon* a zároveň s obsahem *M. bolleyi*. Stejně rozdělení proběhlo i u pšenice Bohemia. Infekce listů proběhla u poloviny květináčů obsahujících rostliny pšenice bez obsahu *M. bolleyi* a taktéž u poloviny květináčů s rostlinami pšenice Bohemia zároveň obsahujících *M. bolleyi*. Každá varianta v pěti opakováních (Obr. 12). Infekce listů tedy byla prováděna u všech rostlin *B. distachyon* i pšenice Bohemia, ve všech květináčích, využíváno bylo téměř totožné inokulum, lišilo se pouze přítomností (varianty „Fc1“) či absencí (varianty „Fc0“) patogenního *F. culmorum*.

První, nejstarší list každé z rostlin byl vynechán, infekce byla prováděna na druhý list. Na svrchní stranu listu byl vyznačen úsek o délce 4–6 cm, vybírána byla nejširší, tedy většinou střední část listu. Následně bylo provedeno poranění svrchní strany listu pro snazší a efektivnější penetraci patogenu. Poranění proběhlo ve vyznačeném úseku, bylo provedeno lehkým přitlačením spodní části Pasteurovy pipety na list. V daném úseku se jednalo vždy o dvě poranění lokalizovaná ve vzdálenosti 1–2 cm od označení fixem (Obr. 9).



**Obr. 9:** List pšenice Bohemia s označením místa infekce fixem, narušený Pasteurovou pipetou a připravený k naočkování *F. culmorum*. Foto: Pavla Polnická.

Na každé poranění listu, ve tvaru kružnice, bylo naočkováno 5  $\mu$ l příslušného roztoku, využita byla automatická pipeta. Infikace roztokem obsahujícím patogenní *F. culmorum* proběhla u rostlin pšenice Bohemia a *B. distachyon*, jež byly při výsevu označeny jako „Fc1“. Inokulace roztokem bez obsahu *F. culmorum* proběhla u rostlin pšenice Bohemia a *B. distachyon*, jež byly při výsevu označeny jako „Fc0“ (Obr. 10). V roztocích byl přítomen Jar, aby došlo ke snížení povrchového napětí vytvořené kapky a omezilo se tak její stékání po listu.

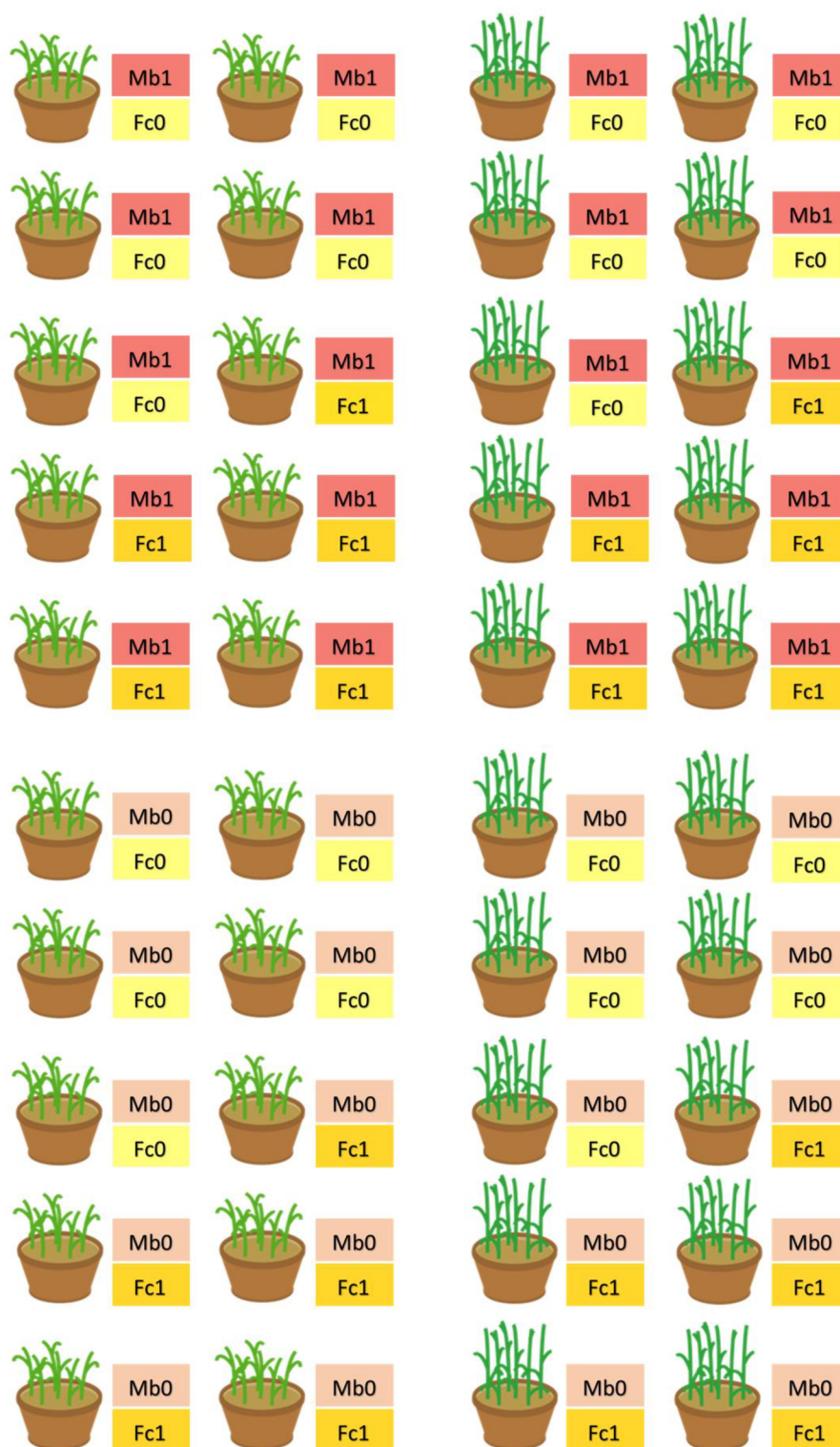


**Obr. 10:** List pšenice Bohemia s označením místa infekce fixem, po naočkování *F. culmorum*.  
Foto: Pavla Polnická.

Rostliny „Fc1“ bylo nutné od rostlin „Fc0“ izolovat, aby se zabránilo případnému přenosu patogenu na neočkované rostliny. To proběhlo pomocí folie, která byla umístěna na kovovou konstrukci, takže nepokrývala přímo rostliny uvnitř. Folie byla zatížena po obvodu konstrukce bambusovými tyčemi (Obr. 11).



**Obr. 11:** Rostliny pšenice Bohemia izolované od ostatních rostlin po naočkování *F. culmorum*.  
Foto: Pavla Polnická.



**Obr. 12:** Schéma znázorňující rozvržení experimentu a uspořádání květináčů s rostlinami *B. distachyon* (dva sloupce vlevo) a pšenici Bohemia (dva sloupce vpravo). Celkem použito 40 květináčů, 20 z nich obsahovalo *B. distachyon*, 20 z nich pšenici Bohemia. Z 20ti květináčů s rostlinami *B. distachyon* bylo 5 květináčů inokulováno *M. bolleyi* a zároveň infikováno *F. culmorum* – „Mb1/Fc1“. *M. bolleyi* ale nikoli *F. culmorum* obsahovalo taktéž 5 květináčů – „Mb1/Fc0“. Bez obsahu *M. bolleyi*, avšak s *F. culmorum* bylo 5 květináčů – „Mb0/Fc1“, zbylých 5 květináčů neobsahovalo ani jeden z těchto mikroorganismů – „Mb0/Fc0“. Naprosto totožné bylo i uspořádání experimentu pro kontrolní rostliny, pšenici Bohemia.

#### 4.2.7 Odběry, zpracování a fixace rostlin

Po umělé infekci rostlin patogenem *F. culmorum* byly postupně odebírány listy a to 1, 2 a 8 dpi (dní po infekci) na izolaci RNA (Obr. 13). V 8 dpi pak byly odebírány také celé rostliny na vizuální a mikroskopické vyhodnocení.

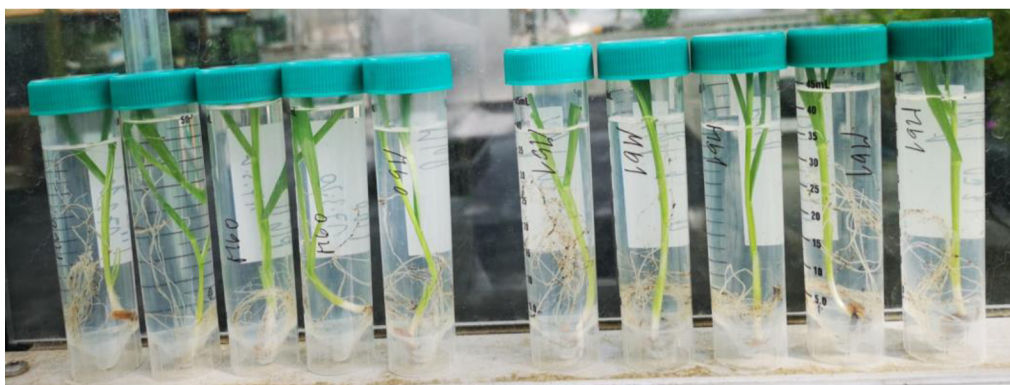
První den odběru (1 dpi) byly odebrány listy ze tří rostlin každé varianty („Mb0/Fc0“, „Mb0/Fc1“, „Mb1/Fc0“, „Mb1/Fc1“). V 1 dpi bylo tedy celkem odebráno 12 listů z pšenice a také 12 listů *B. distachyon* tak, že každý list byl odebrán z jiné rostliny. Jednotlivé odebírané listy byly celé, včetně dvou míst předchozí infekce, nastříhány a vkládány přímo do již označených 2ml odběrových zkumavek. Poté ihned zamrazovány v tekutém dusíku a umístovány do hlubokomrazicí mrazničky. Stejný postup byl aplikován také v 2 a 8 dpi. Z těchto listů (odebraných v 1, 2 a 8 dpi) byla v dalších krocích izolována RNA.

Celkem tedy bylo z každé jednotlivé varianty odebráno 9 listů (3 listy × 3 odběry), a jelikož každá varianta obsahovala při založení pokusu 30 rostlin (6 rostlin × 5 květináčů) ještě po odběrech zbylo 21 rostlin z každé varianty na další analýzy. Z těchto zbývajících rostlin byly odebrány listy (15 ks, protože některé obilky nevyklíčily) a byly umístěny do 70% ethanolu (Obr. 13). U těchto listů proběhlo následně vizuální hodnocení napadení (PŘÍLOHA B, C, D, E, F, G, H, CH) a mikroskopické ověření přítomnosti makrokonidií *F. culmorum*. Stupeň nekrózy byl hodnocen procentuálním napadením (PŘÍLOHA A), získaná data byla poté zpracována ANOVA a TUKEY testem pomocí aplikace Statistica.

V 8 dpi, po odběru listů, byly všechny rostliny vyjmuty ze substrátu. Kořeny vybraných rostlin pšenice i *B. distachyon* všech variant („Mb0/Fc0“, „Mb0/Fc1“, „Mb1/Fc0“, „Mb1/Fc1“) byly promyty ve vodě a rostliny byly umístěny do 70% ethanolu (Obr. 14). Tyto rostliny byly dále využity k mikroskopickému prokázání přítomnosti endofytu *M. bolleyi*.



**Obr. 13:** Listy pšenice Bohemia v 70% ethanolu. Foto: Mgr. Pavel Matušinsky Ph.D.



**Obr. 14:** Rostliny pšenice Bohemia v 70% ethanolu. Foto: Mgr. Pavel Matušinsky Ph.D.

#### 4.2.8 Mikroskopování

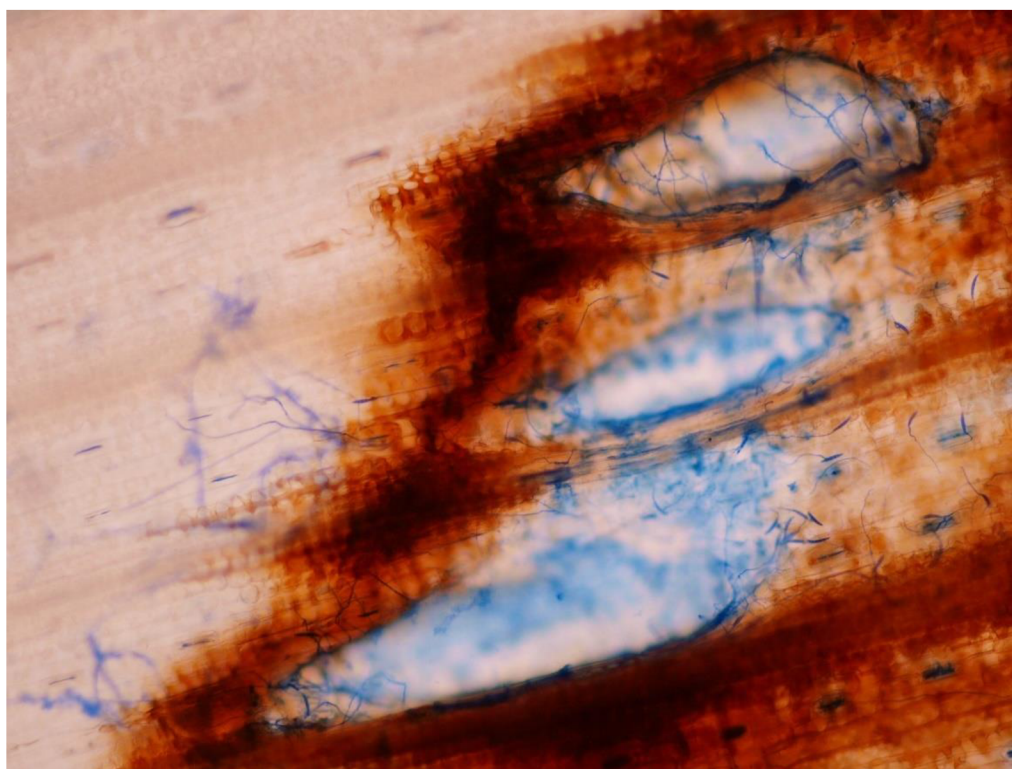
Mikroskopování proběhlo k potvrzení kolonizace kořenů rostlin endofyickým *M. bolleyi*. Vzorky kořenů, po odběru umístěné do 70% ethanolu, byly poté po dobu 3 dnů umístěny do 1% roztoku hydroxidu sodného, po vyjmutí 3 h neutralizovány 1% roztokem kyseliny chlorovodíkové. Barvení proběhlo 0,05% roztokem anilinové modře v laktoglycerolu (Obr. 15).



**Obr. 15:** Chlamydospory *M. bolleyi* v kořenech pšenice Bohemia. Barveno 0,05% roztokem anilinové modře v laktoglycerolu. Pozorované při zvětšení 400×. Foto: Pavla Polnická.

Mikroskopování bylo využito také k potvrzení kolonizace listů rostlin patogenem *F. culmorum*. Listy, po odebrání taktéž fixované v 70% ethanolu, byly poté po 3 dny, pro zviditelnění nekrotických částí, umístěny v 1% roztoku hydroxidu sodného, po vyjmutí 3 h neutralizovány 1% roztokem kyseliny chlorovodíkové. Barvení proběhlo 0,05% roztokem anilinové modře v laktoglycerolu (Obr. 16).





**Obr. 16:** Konidie *F. culmorum* na listu. Barveno 0,05% roztokem anilínové modře v laktoglycerolu. Pozorované při zvětšení 200×. Foto: Mgr. Pavel Matušinsky Ph.D.

#### **4.2.9 Izolace RNA s využitím RNeasy® Plant Mini Kitu**

Pomocí RNase AWAY™ Surface Decontaminant byla ošetřena pracovní plocha pro eliminaci výskytu RNAs, které by mohly poškodit izolovanou RNA. K izolaci byly používány špičky s filtrem a využity i další mikrozkušavky o objemech 2 a 1,5 ml, v kitu neobsažené.

Hluboce zamrazené vzorky byly přemístěny do polystyrenové vany s tekutým dusíkem, aby nedocházelo k degradaci RNA vlivem zvýšení teploty. Do každého ze vzorků byla umístěna keramická kulička a přidáno 450 µl lyzačního RLT pufru, předem připraveného v prostředí flowboxu. Následně proběhla homogenizace vzorků, při frekvenci 4 M/S, po dobu 1 min a jejich inkubace v termostatu při teplotě 56 °C, po dobu 2 min.

Nůžkami, ošetřenými přípravkem RNase AWAY™ Surface Decontaminant, byla postupně odšťihávána spodní část špičky, aby mohl být homogenizovaný obsah zkumavek přemístěn do mikrozkušavek s adsorpční kolonou, v kitu umístěných, fialově zabarvených. Vzorky byly po 2 min centrifugovány při maximální hodnotě rpm (rounds per minute, otáček za minutu). Následně došlo k jejich opatrnému vyjmutí z centrifugy a odpipetování supernatantu do nových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml, ve snaze neporušit pelet na dně.

K supernatantu byl následně přidán poloviční objem 96% ethanolu, než byl objem supernatantu pipetovaný z fialových mikrozkušavek v předchozím kroku. Přidávaný

objem ethanolu se pohyboval v rozmezí 100–150  $\mu\text{l}$ . Opakovaným napouštěním a vypouštěním obsahu mikrozkušavky automatickou pipetou došlo ke smísení složek vzorku, ten byl následně přepipetován do růžových mikrozkušavek, využitých z kitu, obsahujících adsorpční kolonu. Vzorky byly centrifugovány 1 min při 13 000 rpm, odstředěná tekutina vylita a kolony přemístěny do nových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 350  $\mu\text{l}$  RW1 pufru. Proběhla opětovná centrifugace (13 000 rpm, 1 min).

Z mrazničky byly vyjmuty 4 mikrozkušavky o objemu 200  $\mu\text{l}$ , s obsahem 20  $\mu\text{l}$  DNAsy. Do každé z nich bylo přidáno 140  $\mu\text{l}$  RDD pufru a provedeno velmi opatrné promísení složek, opět opakovaným napouštěním a vypouštěním obsahu zkumavky automatickou pipetou.

Přímo na adsorpční membránu bylo aplikováno 78  $\mu\text{l}$  DNAsy, připravené v předchozím kroku. Vzorky byly následně 15 min inkubovány při pokojové teplotě a centrifugovány (13 000 rpm, 1 min).

Membrána růžové kolony byla promyta 350  $\mu\text{l}$  RW1 pufru a vzorky centrifugovány při 13 000 rpm, po dobu 1 min. Kolona byla přemístěna na novou sběrnou mikrozkušavku o objemu 2 ml a promyta 500  $\mu\text{l}$  RPE pufru, opět následovala centrifugace (13 000 rpm, 1 min). Poslední promytí bylo provedeno opakovanou aplikací 500  $\mu\text{l}$  RPE pufru a centrifugací při 13 000 rpm, po dobu 2 min. Kolona byla přemístěna na novou 2ml mikrozkušavku a pro vysušení izolované RNA proběhla centrifugace při maximální hodnotě rpm, po dobu 1 min.

Poté proběhlo přemístění kolony na řádně označenou mikrozkušavku, ve které již měl být izolovaný vzorek zamrazen pro další použití. Přímo na membránu kolony bylo aplikováno 60  $\mu\text{l}$  RNase-free vody a centrifugací (10 000 rpm, 1 min) RNA eluována do mikrozkušavky. Ta byla umístěna na led a provedeno měření koncentrace pomocí přístroje NanoDrop (PŘÍLOHA I, PŘÍLOHA J).

#### **4.2.10 Reverzní transkripce s využitím Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kitu**

Z mrazničky byly pro rozmrazení vyjmuty potřebné roztoky č. 2, 4, 5, 6, 7, 8, vyjma roztoků č. 1 a 3, které by vlivem zvýšení teploty degradovaly. Proběhla také příprava 200 $\mu\text{l}$  mikrozkušavek.

Do 200 $\mu\text{l}$  mikrozkušavek bylo pipetováno po 1  $\mu\text{l}$  roztoku č. 5 (Anchored oligo dT primer), 2  $\mu\text{l}$  roztoku č. 6 (OR Random Hexamer Primer) a 2,4  $\mu\text{l}$  roztoku č. 8 (voda). Počet těchto mikrozkušavek byl volen podle počtu prepisovaných vzorků. Vzniklý roztok byl promísen pomocí vortexu a centrifugován na stolní centrifuze, aby bylo zajištěno, že žádná kapalina nezůstane přilnuta na stěně mikrozkušavky.

Z mrazničky byly do chlazeného stojanu umístěny taktéž i vzorky izolované RNA. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 25 µl RNA, promísení roztoků proběhlo opatrným napouštěním a vypouštěním obsahu špičky automatické pipety.

Vzorky byly umístěny do termocycleru na program RNA1 (10 min, 65 °C), kdy proběhla denaturace RNA. Vzorky RNA byly vráceny zpět do hlubokomrazící mrazničky.

Mikrozkušavky byly po reakci vráceny do vyhlazeného stojanu. Do každé z nich bylo postupně pipetováno 3 µl roztoku č. 3 (Protector RNase inhibitor), 12 µl roztoku č. 4 (Deoxynucleotide Mix), 6 µl roztoku č. 7 (DTT), 6,6 µl roztoku č. 1 (Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase) a 24 µl roztoku č. 2 (Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase reaction Buffer). Po přidání poslední složky byly roztoky v mikrozkušavce napuštěním a vypuštěním obsahu špičky promíseny tak, aby na stěnách mikrozkušavek nezůstávala žádná kapičky kapaliny.

Mikrozkušavky byly vloženy do termocykleru na program RNA2 (45 °C/85 °C, 30 min/5 min). Přepsaná cDNA byla vložena do mrazničky a zamrazena na -20 °C. Poté proběhlo provedeno měření koncentrace pomocí přístroje Qubit (PŘÍLOHA I, PŘÍLOHA J).

#### 4.2.11 Real time PCR (qPCR)

Před qPCR analýzou byly potřebné vzorky cDNA naředěny na potřebnou koncentraci 5 ng/µl. Ředění proběhlo pro každý vzorek samostatně, vždy dle výchozí koncentrace cDNA konkrétního vzorku.

Pro qPCR analýzu obranného rostlinného genu *BdPR1-5* byla vytvořena reakční směs, premix. Objem připravované směsi byl vždy volen dle množství analyzovaných vzorků. Reakční směs pro jeden vzorek obsahovala 7,5 µl SYBR Green s obsahem DNA polymerasy, 5,1 µl vody, 0,2 µl forward a 0,2 µl reverse primeru (Tab. 1). Vzniklý roztok byl promísen pomocí vortexu a centrifugován na stolní centrifuze, aby bylo zajištěno, že žádná kapalina nezůstane přilnuta na stěně mikrozkušavek.

Vzorky byly připravovány do stripů. Do každé jamky pro vzorek bylo pipetováno 13 µl namíchaného premixu a 2 µl cDNA konkrétního vzorku ve třech opakováních každé varianty. Vzorky cDNA měly koncentrace 5 ng/µl, jednotlivé vzorky tedy obsahovaly 10ng cDNA. U vzorků negativní kontroly byla místo cDNA pipetována voda. Jako referenční gen byl využit gen *BdUbi4*, jako kontrolní vzorky byly využity rostliny „Fc0/Mb0“.

Vzorky byly vloženy do termocykleru, kde proběhla qPCR reakce. Získaná data byla analyzována s využitím  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metody pomocí CFX Manager 3.0 software.

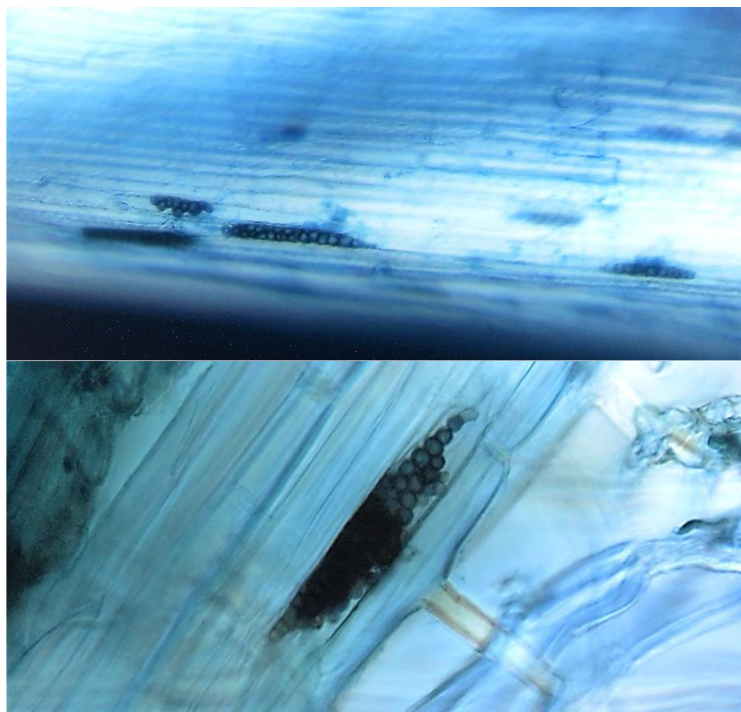
V rámci analýzy bylo nutno zohlednit efektivitu qPCR reakce. Za předpokladu 100% efektivity dochází při každém cyklu ke zdvojnásobení množství DNA. Efektivita byla vypočtena ze vzorku „Mb0/Fc0“ (20-177) (PŘÍLOHA J), pomocí CFX Manager 3.0 software, ze sklonu standardní křivky. Standardní křivka byla odvozena od ředící řady vzorku, jež byla získána dvojkovým ředěním (10; 5; 2,5 a 1,25 ng cDNA).

Ve své práci jsem použila metodu založenou na SYBR Green a bylo tedy nutné ověřit, zda nedochází ke vzniku nescifických produktů nebo primer dimerů. K tomu bylo využito analýzy křivky tání. Ta by měla mít pro každý PCR produkt jeden vrchol, nescifické produkty pak obvykle mívají jinou teplotu tání. Analýza křivky tání proběhla jako součást qPCR reakce.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Prokázání úspěšné inokulace kořenů *M. bolleyi*

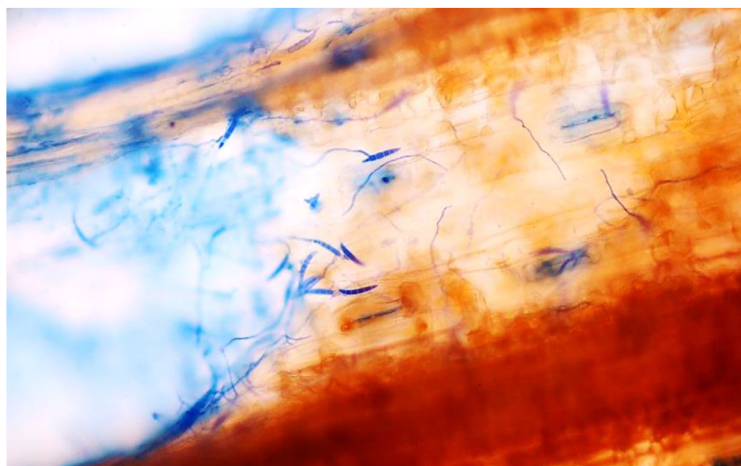
Mikroskopování potvrdilo přítomnost *M. bolleyi* v kořenech „Mb1“ rostlin pšenice Bohemia i *B. distachyon*, potvrdilo taktéž i jeho absenci v kořenech „Mb0“ rostlin (Obr. 17).



**Obr. 17:** Důkaz přítomnosti chlamydospor *M. bolleyi* v kořenech pšenice Bohemia (dole) pozorované při zvětšení 400× a kořenech *B. distachyon* (nahore) pozorované při zvětšení 200×. Foto: Pavla Polnická.

### 5.2 Prokázání úspěšné infekce patogenem *F. culmorum*

Mikroskopování listů „Fc1“ rostlin pšenice Bohemia a *B. distachyon* přítomnost *F. culmorum* potvrdilo, naopak u rostlin „Fc0“ jeho přítomnost potvrzena nebyla (Obr. 18).



**Obr. 18:** Důkaz přítomnosti konidií *F. culmorum* v listech pšenice Bohemia. Barveno 0,05% roztokem anilinové modře v laktoglycerolu. Pozorované při zvětšení 400×. Foto: Mgr. Pavel Matušinsky Ph.D.

### 5.3 Vyhodnocení napadení listů

Všechny listy rostlin, *B. distachyon* i pšenice Bohemia, nesly známky poškození Pasteurovou pipetou, neboť všechny byly inokulovány, ať už patogenem či pouze vodou.

U „Mb0/Fc0“ ani „Mb1/Fc0“ rostlin nebyla v místech infekce přítomna nekróza, neboť na ně nebylo aplikováno patogenní *F. culmorum*.

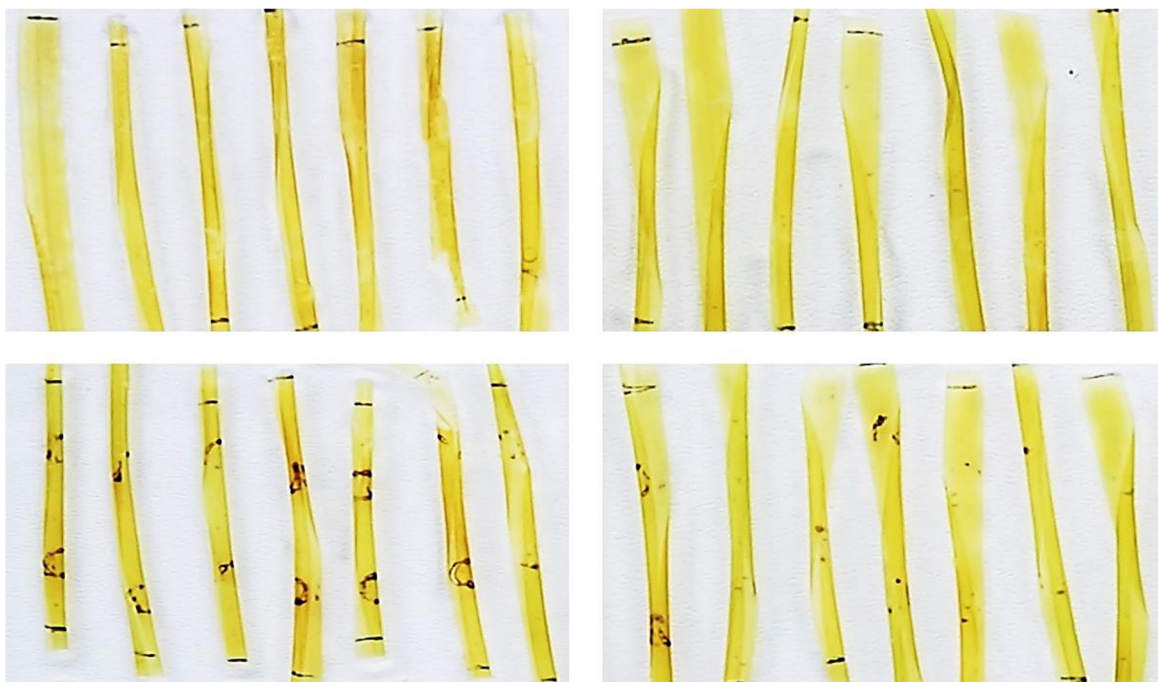
Listy rostlin „Mb0/Fc1“ a „Mb1/Fc1“ nesly nekrotická poškození, neboť u nich aplikace patogenního *F. culmorum* proběhla a prokazatelně tedy byla účinná. Listy rostlin „Mb1/Fc1“ byly již při předběžném vizuálním zhodnocení méně poškozeny než listy rostlin „Mb0/Fc1“, neboť obsahovaly i *M. bolleyi* eliminující patogení vliv *F. culmorum*.

#### 5.3.1 Statistické hodnocení

Ke statistickému vyhodnocení napadení listů však bylo třeba získat konkrétní data. Díky tomu, že listy byly po odběru (v 8 dpi) umístěny (mimo jiných činidel) do roztoku hydroxidu sodného, došlo ke zviditelnění nekrotických částí a bylo možno napadení v místě předchozího poškození Pasteurovou pipetou efektivně vyhodnotit (Obr. 19, Obr. 20). Vyhodnocení proběhlo určením procenta napadení kružnice (PŘÍLOHA A), jejíž tvar neslo každé infikované místo díky poškození pipetou. Konkrétní procenta napadení pak byla zaznamenána (PŘÍLOHA B–PŘÍLOHA CH) a dále zpracována.



**Obr. 19:** Ukázka vyhodnocovaných listů pšenice Bohemia, konkrétně stupně napadení patogenem *F. culmorum*. Na obrázcích jsou fotografie několika infikovaných částí listů rostlin „Mb0/Fc0“ (vlevo nahoře), „Mb1/Fc0“ (vpravo nahoře), „Mb0/Fc1“ (vlevo dole), „Mb1/Fc1“ (vpravo dole). Listy byly odebrány v 8 dpi, poté umístěny do 70% ethanolu, 1% roztoku hydroxidu sodného, nakonec do 1% roztoku kyseliny chlorovodíkové. Foto: Mgr. Pavel Matušinsky Ph.D.



**Obr. 20:** Ukázka vyhodnocovaných listů *B. distachyon*, konkrétně stupně napadení patogenem *F. culmorum*. Na obrázcích jsou vyfotografie několika infikovaných částí listů rostlin „Mb0/Fc0“ (vlevo nahoře), „Mb1/Fc0“ (vpravo nahoře), „Mb0/Fc1“ (vlevo dole), „Mb1/Fc1“ (vpravo dole). Listy byly odebrány v 8 dpi, poté umístěny do 70% ethanolu, 1% roztoku hydroxidu sodného, nakonec do 1% roztoku kyseliny chlorovodíkové. Foto: Mgr. Pavel Matušinsky Ph.D.

Statistické vyhodnocení získaných dat proběhlo v aplikaci Statistica, konkrétně byly společně s vedoucím práce provedeny testy ANOVA (Tab. 3, Tab. 5) a TUKEY (Tab. 2, Tab. 4). Dosažené výsledky potvrdily statisticky rozdílné výsledky vizuálního hodnocení mezi variantami s inokulací endofytem a bez inokulace endofytem.

Rostliny „Mb0/Fc1“ byly statisticky více napadeny než rostliny „Mb1/Fc1“. U rostlin pšenice se jednalo o průměrnou hodnotu nekrózy 46,5 % pro „Mb0/Fc1“ rostliny, zatímco pro „Mb1/Fc1“ rostliny pšenice to bylo jen 16,2 % (Tab. 2). U rostlin *B. distachyon* byl rozdíl mezi těmito skupinami ještě větší. Pro „Mb0/Fc1“ rostliny byla průměrná hodnota nekrózy 51,8 %, pro „Mb1/Fc1“ rostliny pouhých 14,3 % (Tab. 4).

Provedená statistická analýza tedy prokázala, že přítomnost *M. bolleyi* v rostlině snižuje příznaky napadení po infekci rostliny patogenní houbou *F. culmorum*.

**Tab. 2.:** Základní statistické údaje získané z procentuálních hodnot napadení listů pšenice (PŘÍLOHA B–PŘÍLOHA E).

Rostliny	Počet vzorků	Součet hodnot	Průměrná hodnota	Rozptyl hodnot
<b>Mb0/Fc1</b>	30	1395	46,50000*	1060,6030
<b>Mb1/Fc1</b>	30	485	16,16667	701,1782

*statisticky průkazný rozdíl (TUKEY test; hranice významnosti 0,05) je označen \**

**Tab. 3:** Výsledné hodnoty testu ANOVA provedeného na procentuálních hodnotách napadení listů pšenice (PŘÍLOHA B–PŘÍLOHA E).

Zdroj variability	SS	stupně volnosti	MS	F	P	F krit
<b>Mezi výběry</b>	13801,67	1	13801,6700	15,66785	0,000209	4,006873
<b>Všechny výběry</b>	51091,67	58	880,8908			
<b>Celkem</b>	64893,33	59				

**Tab. 4:** Základní statistické údaje získané z procentuálních hodnot napadení listů *B. distachyon* (PŘÍLOHA F–PŘÍLOHA CH).

Rostliny	Počet vzorků	Součet hodnot	Průměrná hodnota	Rozptyl hodnot
<b>Mb0/Fc1</b>	30	1555	51,83333*	961,1782
<b>Mb1/Fc1</b>	30	430	14,33333	535,7471

*statisticky průkazný rozdíl (TUKEY test; hranice významnosti 0,05) je označen \**

**Tab. 5:** Hodnoty testu ANOVA provedeného na procentuálních hodnotách napadení listů *B. distachyon* (PŘÍLOHA F–PŘÍLOHA CH).

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	P	F krit
<b>Mezi výběry</b>	21093,75	1	21093,75	28,18277	1,82E-06	4,006873
<b>Všechny výběry</b>	43410,83	58	748,4626			
<b>Celkem</b>	64504,58	59				



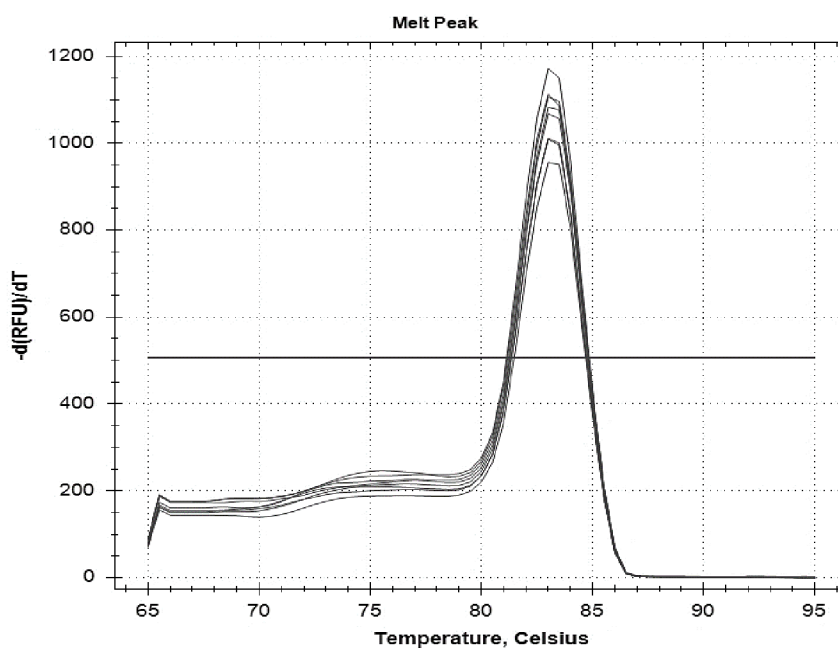
## 5.4 Testování primerů pro geny *PR1-5* a *Ubi4*

Po provedení qPCR reakce proběhlo testování vzniklých produktů. To bylo provedeno pro vzorek „Mb0/Fc0“ (20-177) (PŘÍLOHA J) a jeho koncentrace 10, 5; 2,5 a 1,25 ng/μl, vždy ve dvou opakováních.

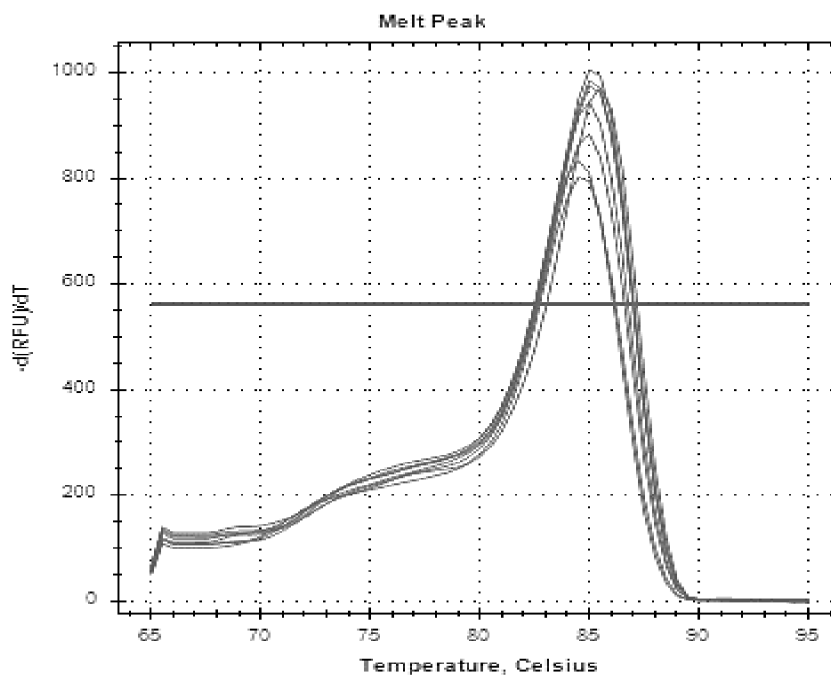
Níže vložené grafy byly získány pomocí CFX Manager 3.0 software.

### 5.4.1 Křivka tání

Analýza křivek tání prokázala jeden vrchol křivky u obou genů. To dokládá, že při qPCR byl pro gen *PR1-5* i gen *Ubi4* amplifikován pouze jeden produkt a nedocházelo ke vzniku dimerů využitých primerů (Graf 1, Graf 2).



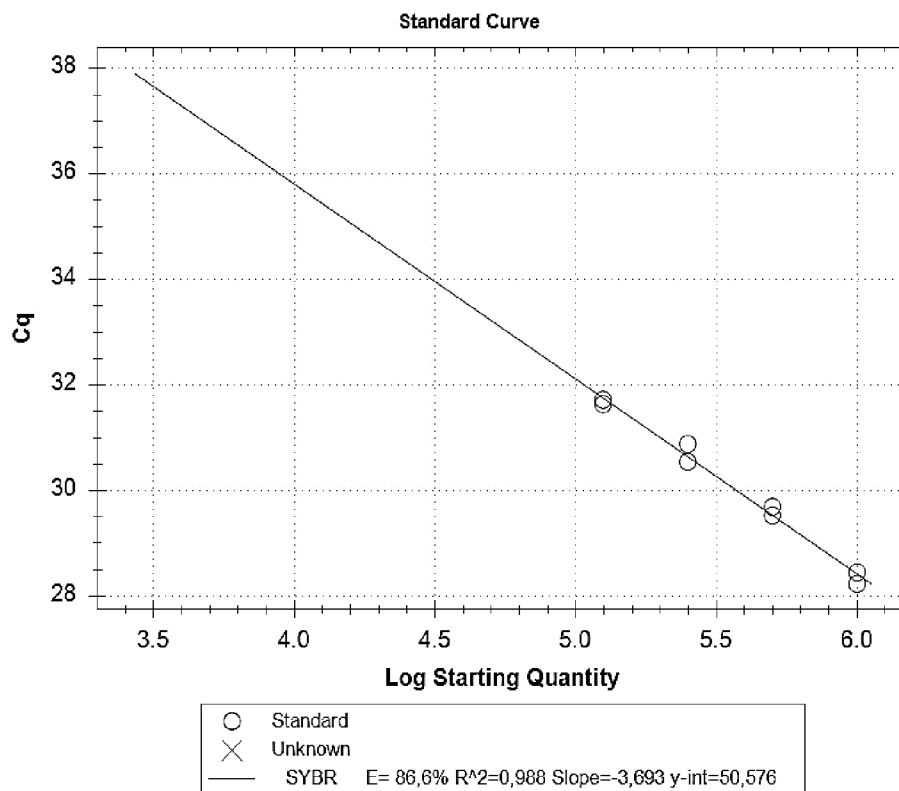
Graf 1: Křivka tání genu *PR1-5* při qPCR.



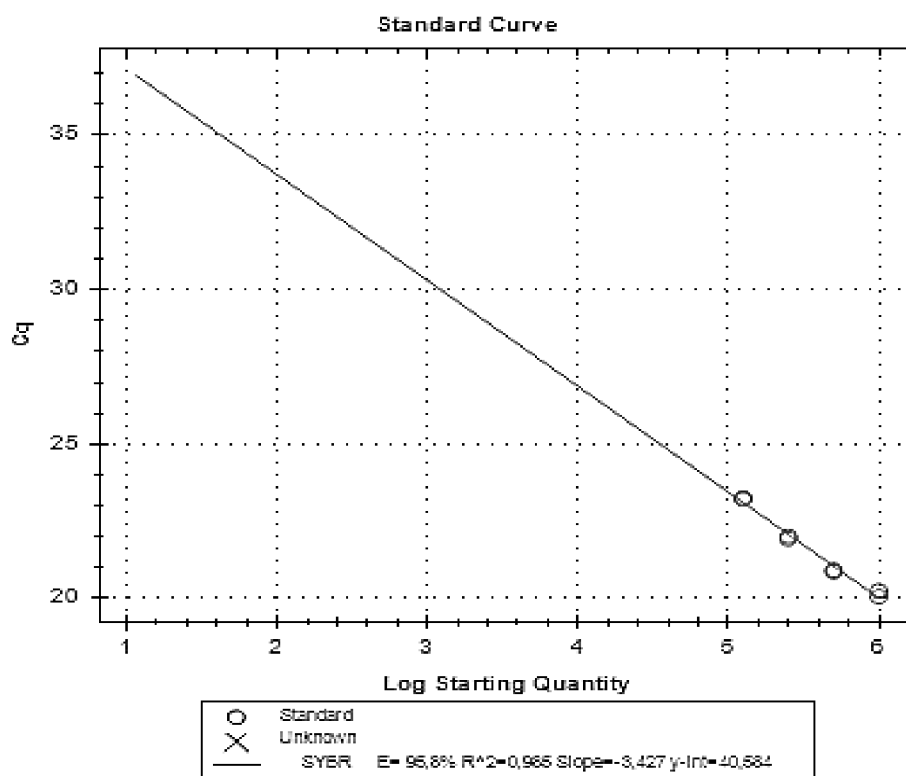
Graf 2: Křivka tání genu *Ubi4* při qPCR.

### 5.4.2 Efektivita reakce

Efektivita qPCR reakce byla pro gen *PR1-5* 86,6 % (Graf 3). Pro kontrolní gen *Ubi4* pak 95,8 % (Graf 4).



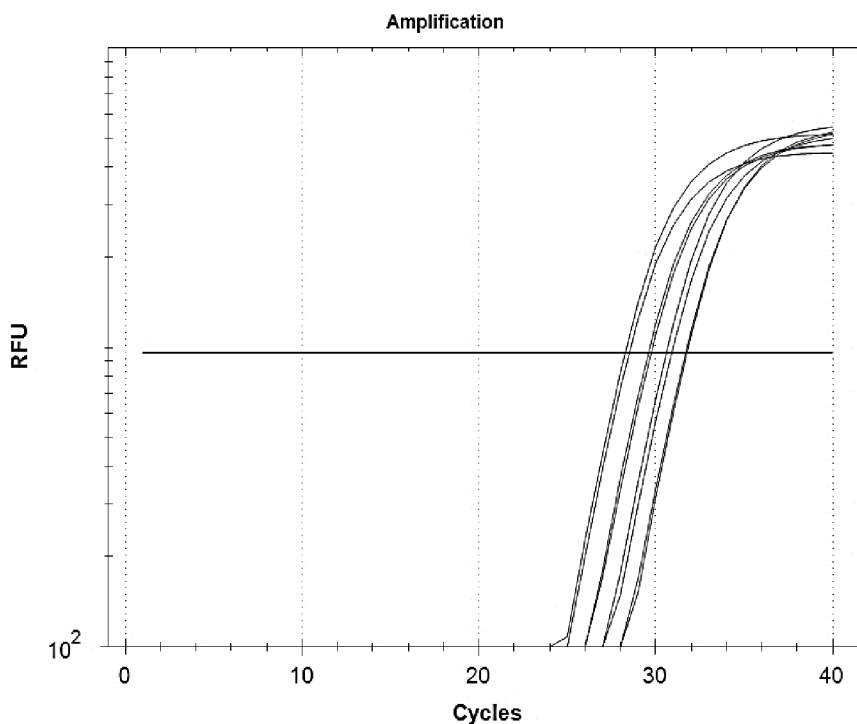
**Graf 3:** Efektivita reakce qPCR pro gen *PR1-5*. Klesající hodnota Cq značí zvyšující se koncentraci cDNA



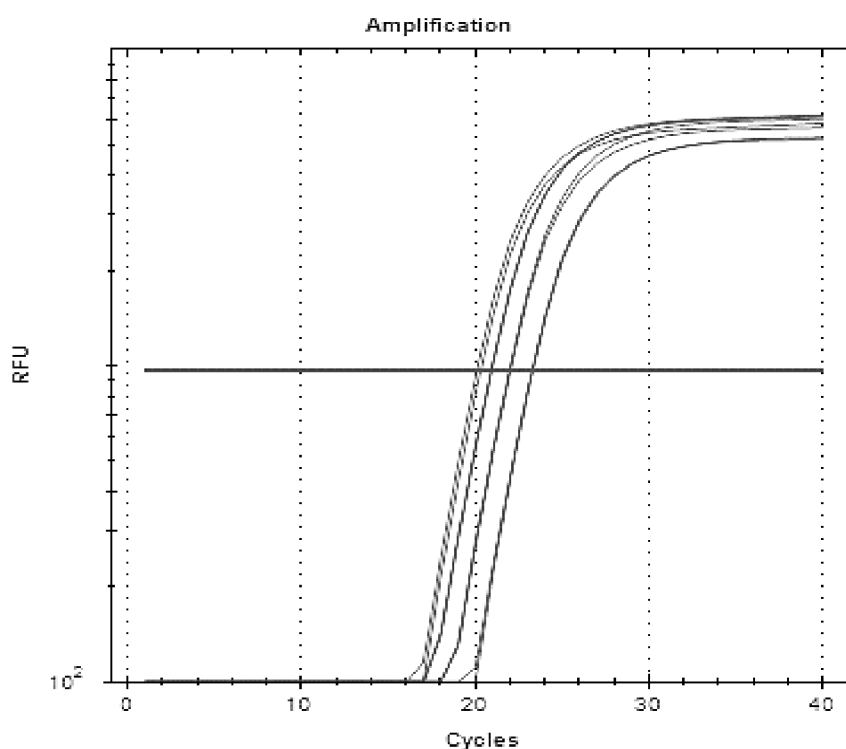
**Graf 4:** Efektivita reakce qPCR pro gen *Ubi4*. Klesající hodnota Cq značí zvyšující se koncentraci cDNA.

### 5.4.3 Dvojkové ředění

Vzhledem k tomu, že do reakce bylo přidáváno fluorescenční barvivo SYBR Green, byla během qPCR reakce emitována fluorescence. Tento fluorescenční signál odpovídá množství cDNA přítomnému v reakci, kdy se s každým cyklem intenzita fluorescence, a tedy i množství cDNA zvyšuje (Graf 5, Graf 6). Tato analýza sloužila k výpočtu efektivity reakce viz. kapitola 5.4.2.



Graf 5: Dvojkové ředění pro gen *PR1-5*.



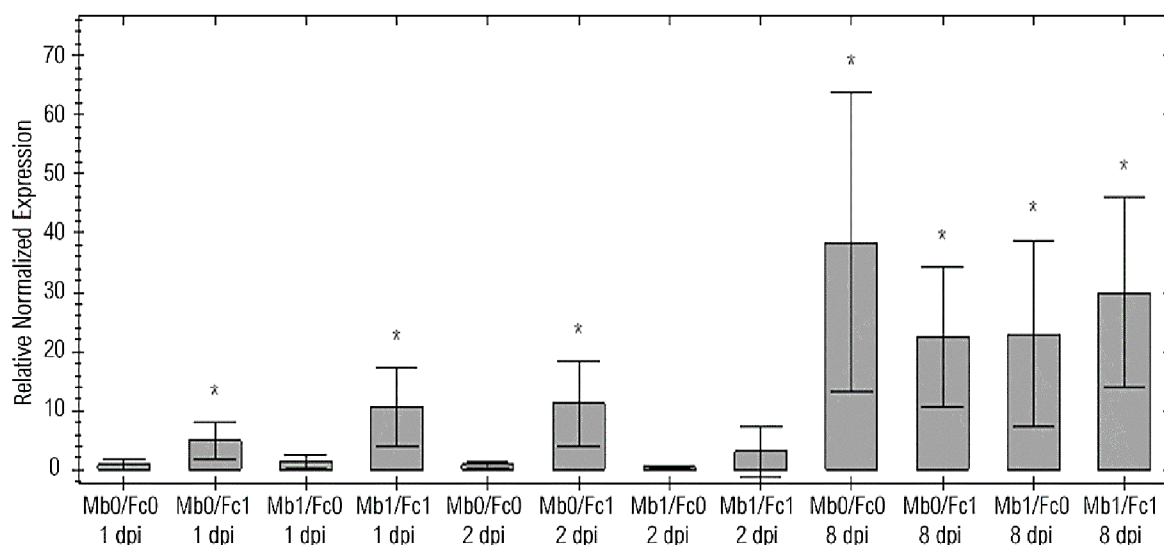
Graf 6: Dvojkové ředění pro gen *Ubi4*.

## 5.5 Statistická analýza exprese genů

Statistické vyhodnocení exprese bylo provedeno pomocí CFX Manager 3.0 software pouze pro *B. distachyon* (pro pšenici nikoli) a bylo mi poskytnuto vedoucím práce.

### 5.5.1 Statistická analýza exprese genu *PR1-5* po qPCR

Hodnocena byla exprese genu *PR1-5* metodou qPCR. Tato analýza prokázala, že rostliny „Fc1“ vykazovaly oproti rostlinám „Fc0“ zvýšenou expresi studovaného genu, konkrétně v 1 dpi a 2 dpi (Graf 7). V 8 dpi již nebyly rozdíly průkazné. U infikovaných rostlin *B. distachyon* byl tedy prokázán vliv *F. culmorum* na expresi genu *PR1-5*.



**Graf 7:** Graf analýzy exprese genu *PR1* ve dnech 1 dpi (4 hodnoty vlevo), 2 dpi (4 hodnoty uprostřed), 8 dpi (4 hodnoty vpravo). Symbol \* značí, že rozdíl mezi zkoumanými skupinami je z 99 % průkazný ( $P < 0,01$ ). Míra exprese genu *PR1* je u uvedených variant a dpi pouze relativní – je vztažena k hodnotě prvního grafu „Mb0/Fc0, 1 dpi“. Graf byl vytvořen pomocí software CFX Maestro.

### 5.5.2 Statistická analýza exprese genů *PR1-5* a *Ubi4*

Z hodnocení exprese genu *PR1-5* vyplývá, že hodnot P nižších než 0,05 a tedy i průkazných rozdílů, bylo dosaženo u variant „Fc1“ v 1 a 2 dpi (Tab. 4–Tab. 6). Mezi variantami „Mb1“ a „Mb0“ nebyly zaznamenány průkazné rozdíly v žádném z dpi. Tyto výsledky tedy potvrdily hypotézu, že *M. bolleyi* v rostlinách nemělo na expresi genu *PR1-5* žádný vliv (Tab. 7–Tab. 9).

Statistická analýza byla provedena taktéž pro referenční gen *Ubi4*. Zde nebyly žádné z hodnot P, ani pro varianty „Fc1“ vs. „Fc0“, ani pro varianty „Mb1“ vs. „Mb0“ nižší než 0,05, ani v jednom termínu odběru 1, 2 a 8 dpi (Tab. 4–Tab. 9). *Ubi4* byl tedy jako referenční gen zvolen správně a splnil svůj účel.

**Tab. 4:** Vliv *F. culmorum* na expresi genů *PR1* a *Ubi4* v 1 dpi.

Source	Gen	SS	df	MS	F	P
Bio Group	<i>PR1</i>	0.00015	1	0.00015	28.517	0.000104291247000
	<i>Ubi4</i>	0.05417	1	0.05417	0.153	0.701491584300000
Residuals	<i>PR1</i>	0.00008	14	0.00001		
	<i>Ubi4</i>	4.95383	14	0.35385		

**Tab. 5:** Vliv *F. culmorum* na expresi genů *PR1* a *Ubi4* v 2 dpi.

Source	Gen	SS	df	MS	F	P
Bio Group	<i>PR1</i>	0.00017	1	0.00017	12.887	0.002957716805000
	<i>Ubi4</i>	0.07687	1	0.07687	0.134	0.719536821000000
Residuals	<i>PR1</i>	0.00018	14	0.00001		
	<i>Ubi4</i>	8.01542	14	0.57253		

**Tab. 6:** Vliv *F. culmorum* na expresi genů *PR1* a *Ubi4* v 8 dpi.

Source	Gen	SS	df	MS	F	P
Bio Group	<i>PR1</i>	0.00004	1	0.00004	0.220	0.646474910900000
	<i>Ubi4</i>	0.02884	1	0.02884	0.241	0.631231341700000
Residuals	<i>PR1</i>	0.00260	14	0.00019		
	<i>Ubi4</i>	1.67660	14	0.11976		

**Tab. 7:** Vliv *M. bolleyi* na expresi genů *PR1* a *Ubi4* v 1 dpi.

Source	Gen	SS	df	MS	F	P
Bio Group	<i>PR1</i>	0.00004	1	0.00004	2.543	0.133119252200000
	<i>Ubi4</i>	0.04876	1	0.04876	0.138	0.716192712400000
Residuals	<i>PR1</i>	0.00019	14	0.00001		
	<i>Ubi4</i>	4.95925	14	0.35423		

**Tab. 8:** Vliv *M. bolleyi* na expresi genů *PR1* a *Ubi4* v 2 dpi.

Source	Gen	SS	df	MS	F	P
Bio Group	<i>PR1</i>	0.00007	1	0.00007	3.360	0.088132034950000
	<i>Ubi4</i>	0.10582	1	0.10582	0.186	0.673245352400000
Residuals	<i>PR1</i>	0.00029	14	0.00002		
	<i>Ubi4</i>	7.98647	14	0.57046		

**Tab. 9:** Vliv *M. bolleyi* na expresi genů *PR1* a *Ubi4* v 8 dpi.

Source	Gen	SS	df	MS	F	P
Bio Group	<i>PR1</i>	0.00005	1	0.00005	0.248	0.626234101100000
	<i>Ubi4</i>	0.00007	1	0.00007	0.001	0.980716209000000
Residuals	<i>PR1</i>	0.00260	14	0.00019		
	<i>Ubi4</i>	1.70536	14	0.12181		

## 6 DISKUZE

Při výzkumu určitého organismu je nejlepší metodou jeho výzkumu využití jeho samotného (Fitzgerald *et al.*, 2015). Při výzkumu hospodářsky významných obilovin by se tedy mohlo jevit jako výhodné tyto obiloviny využívat. Nicméně jsou právě pro svoji velikost, délku životního cyklu a rozsáhlý genom nevhodné (Fitzgerald *et al.*, 2015). K výzkumu obilovin se pak nehodí ani *A. thaliana*, model dvouděložných rostlin, a to kvůli odlišnostem dvouděložných rostlin od jednoděložných (Brkljacic *et al.*, 2011).

V mojí bakalářské práci bylo tedy využíváno *B. distachyon*, modelový organismus efektivně využitelný pro jednoděložné rostliny, a to díky svému malému vzrůstu, krátké generační době a samosprašnosti (Brkljacic *et al.*, 2011; Garvin, 2008; Vain, 2011; Vogel *et Bragg*, 2009). Důvodem byl také fakt, že *B. distachyon* se široce uplatňuje v rostlinolékařství, na které byla práce zaměřena. Navíc je náchylné k infekci patogeny představujícími problémy i při napadení obilovin (Fitzgerald *et al.*, 2015).

Druhou rostlinou, využitou v mojí práci byla pšenice, hospodářsky nepostradatelná rostlina, jejíž choroby chronicky limitují výnosy a způsobují značné zemědělské ztráty (Oerke, 2006).

Při výzkumech zaměřených na *B. distachyon* již byla prokázána celá řada mikroorganismů, které dokážou tento modelový organismus napadat (Fitzgerald *et al.*, 2015). Mezi ně patří i patogeny rodu *Fusarium* (Peraldi *et al.*, 2011), mimo jiné schopné infikovat většinu rodů kulturních rostlin, včetně všech členů čeledi *Poaceae*. *Fusarium* spp. tak můžeme zařadit mezi nejdůležitější fytopatogenní a toxigenní rody vláknitých hub napadajících obiloviny (Jestoi *et al.* 2004; Parry *et al.*, 1995). Vzhledem k jejich širokému významu ve fytopatologii byly využity i v mojí práci. Využit byl konkrétně patogenní organismus *F. culmorum*, kterým se bez obtíží podařilo infikovat oba druhy testovaných rostlin, *B. distachyon* i pšenici.

Vzhledem k tomu, že předmětem mojí práce bylo zkoumání vlivů dvou houbových organismů, patogenního a endofytického, bylo třeba zvolit vhodný endofyt. Tím se stalo *M. bolleyi*, organismus, který velmi často osidluje byliny, především pak rostliny z čeledi *Poaceae*. Vzhledem ke skutečnosti, že na pšeničných kořenech bylo právě *M. bolleyi* prokázáno jako nejčastěji se vyskytující endofyt (Reinecke, 1978; Reinecke *et Fokkema*, 1981), bylo jeho zvolení za tímto účelem vcelku logické. Od této houby pak byly očekávány endofytické vlastnosti, tedy schopnost eliminovat rozličná rostlinná onemocnění a také nemít na hostitelský organismus patogenní vliv (Fox-Roberts *et Deacon*, 1988). Inokulace pšenice pomocí *M. bolleyi* proběhla dle očekávání. Na *B. distachyon* dosud tento krok prováděn nebyl, inokulace se však zdařila.

Po úspěšné inokulaci těchto houbových organismů bylo třeba prokázat jejich vlastnosti, konkrétně pak vliv *M. bolleyi* na ovlivnění příznaků způsobených patogenem *F. culmorum* při jejich společné interakci. Schopnost *M. bolleyi* eliminovat patogeny byla

již dříve prokázána u různých rostlinných onemocnění (Fox-Roberts *et Deacon*, 1988), konkrétně pak například při interakci s *O. yallundae* způsobující stéblolam (Hinton *et Parry* 1993) či při kontaktu s *G. graminis*, způsobující černání kořenů a báze stébel obilnin (Kirk *et Deacon* 1987a). Tato schopnost byla dříve prokázána i při interakci s *F. culmorum* (Spiegel *et Schonbeck*, 1991) a byla potvrzena i v mojí práci.

Již při předběžném vizuálním hodnocení bylo patrné, že rostliny „Mb0/Fc1“ vykazovaly vyšší míru napadení než rostliny „Mb1/Fc1“. Statisticky zpracovaná data to potvrdila. U rostlin pšenice činila průměrná hodnota nekrózy pro „Mb0/Fc1“ rostliny 46,5 %, pro „Mb1/Fc1“ rostliny 16,2 %. U rostlin *B. distachyon* byl rozdíl ještě větší, pro „Mb0/Fc1“ rostliny byla průměrná hodnota nekrózy 51,8 %, pro „Mb1/Fc1“ rostliny 14,3 %. Analýza dat tedy potvrdila, že přítomnost *M. bolleyi* v rostlině snižuje rozsah nekrotického poškození rostlin po infekci rostliny *F. culmorum*.

Při houbové infekci docházelo k interakcím mezi patogenem a rostlinou, ta ovlivňuje expresi různých genů, které jsou spojené s obranou rostliny. Při infekci *B. distachyon* houbami rodu *Fusarium* může být odlišně exprimováno až 2500 genů (Powell *et al.*, 2017). Jedním z takových genů je i gen *PR1-5* (Powell *et al.*, 2017), kvantifikovaný v mojí práci. Studium těchto genů je možno získat vzhled do interakčních mechanismů mezi patogenem a rostlinou (Ma *et al.*, 2009). Geny reagující na infekci lze identifikovat analýzou RNA (Powell *et al.*, 2017), která se získává ze zmražených listů rostlin. Hladiny mRNA kandidátních genů jsou následně analyzovány pomocí qPCR, při které je k mRNA syntetizována komplementární cDNA. Díky využití specifických primerů je následně provedena hybridizace ke konkrétním oblastem transkriptu (Klickstein *et al.*, 2001; Rozen *et Skaletsky*, 2000).

Stejná analýza byla provedena i v mojí práci, kdy byly analyzovány různé listy. Bez napadení, listy napadené pouze *M. bolleyi*, pouze *F. culmorum* či kolonizované oběma houbami zároveň. Díky tomu pak bylo možné stanovit hladiny genu *PR1-5* při všech kombinacích a určit konkrétní vlivy každého z houbových organismů při interakci s rostlinou. Tyto vlivy bylo možno určit analýzou míry exprese genu *PR1-5* v jednotlivých variantách. *PR* geny jsou totiž užitečnými nástroji pro sledování průběhu imunitních reakcí *Brachypodium* na specifické patogeny a při napadení rostliny vzrůstá jejich exprese (Kouzai *et al.*, 2016; Powell *et al.*, 2017).

Výsledky práce potvrdily, že na expresi genu *PR1-5* měla vliv infekce *F. culmorum*, naopak inokulace rostlin endofytem *M. bolleyi* expresi tohoto genu nijak neovlivnila. Tato skutečnost byla prokázána v 1 a 2 dpi. V 8 dpi již ovlivnění exprese genu *PR1-5* patogenem potvrzeno nebylo, vliv patogenu již po této době odezněl. Nicméně u všech testovaných variant došlo v 8 dpi k nárůstu exprese genu *PR1-5* oproti předchozím dvěma termínům odběru, pravděpodobně vlivem vysokých teplot ve skleníku, kterým mohly být všechny rostliny vystaveny.



## 7 ZÁVĚR

V bakalářské práci se podařilo prokázat, že houbové organismy, *M. bolleyi* i *F. culmorum*, mají schopnost kolonizovat testované rostliny, pšenici a *B. distachyon*.

Dále bylo potvrzeno, že endofytické houbové organismy vykazují schopnost eliminovat patogenní projevy fusariových chorob. Tento fakt byl konkrétně prokázán na endofytickém organismu *M. bolleyi*, který při interakci s patogenem *F. culmorum* eliminoval jeho negativní účinky a rozvoj infekce na testovaných rostlinách, pšenici a *B. distachyon*.

Pokud byly využívané rostliny infikovány pouze *M. bolleyi* či pouze *F. culmorum*, taktéž byly potvrzeny očekávané předpoklady. Infekce samotným *M. bolleyi* nevedla k patogením projevům tohoto organismu a potvrdila tak jeho endofytické vlastnosti. Infekce samotným *F. culmorum* pak na rostlinách vedla k nekrotám, statisticky významnějším než při interakci s *M. bolleyi*.

Co se týče posouzení exprese markerového genu *PR1-5*, který bývá zapojen do obranných procesů rostlin, v 1 a 2 dpi bylo potvrzena vyšší míra exprese tohoto genu u „Fc1“ rostlin oproti „Fc0“ rostlinám, ve dni 8 dpi již nikoli, vliv patogenu na expresi genu *PR1-5* v tomto termínu již odezněl.

Bylo potvrzeno, že endofytická houba *M. bolleyi* neměla na expresi zkoumaného genu vliv v žádném z termínů odběru.

## 8 LITERATURA

- Aist J. R. (1976): Physiological plant pathology, pp. 25-26, Springer-Verlag, New York, USA.
- Armstrong G. M., Armstrong J. K. (1981): *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. In *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy* (Nelson P. E., *et al.*, eds.), pp. 391-399, The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- Ankeny R. A., Leonelli S. (2011): What's so special about model organisms? *Studies in History and Philosophy of Science Part A* 42, 313-323.
- Antonín V. (2006): Encyklopedie hub a lišejníků, pp. 333-334, Libri, Praha, Česká republika.
- Ayliffe M., Devilla R., *et al.* (2011): Nonhost resistance of rice to rust pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 1143-1155.
- Ádám A., Nagy Z., *et al.* (2018): Signals of systemic immunity in plants: progress and open questions. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1146-1166.
- Barbieri M., Marcel T. C., *et al.* (2011): Host status of false brome grass to the leaf rust fungus *Puccinia brachypodii* and the stripe rust fungus *P. striiformis*. *Plant Disease* 95, 1339-1345.
- Barbieri M., Marcel T. C., *et al.* (2012): QTLs for resistance to the false brome rust *Puccinia brachypodii* in the model grass *Brachypodium distachyon* L. *Genome* 55, 152-163.
- Bazin M. J., Markham P., *et al.* (1990): Population dynamics and rhizosphere interactions. In *The Rhizosphere* (Lynch J. M., ed.), pp. 99-127, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Bigeard J., Colcombet J., *et al.* (2015): Signaling Mechanisms in PatternTriggered Immunity (PTI). *Molecular Plant* 8, 521-539.
- Bottalico A. (1998): *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology* 80, 85-103.
- Bragg J. N., Wu J., *et al.* (2012): Generation and Characterization of the Western Regional Research Center *Brachypodium* T-DNA Insertional Mutant Collection. *PLoS ONE* 7: e41916.
- Braun H. J., Lulev J. (1969): Infektion unverletzter, fingerstarker Fichtenwurzeln durch den Wurzelschwamm *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. I. Bau des Oberflächenperiderms und erste Infektionsbefunde. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 88, 327-338.
- Brkljacic J., Grotewold E., *et al.* (2011): *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiology* 157, 3-13.
- Buerstmayr H., Ban T., *et al.* (2009): QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant breeding* 128, 1-26.
- Callis J., Carpenter T., *et al.* (1995): Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics* 139, 921-939.
- Caplan J. L., Kumar A. S., *et al.* (2015): Chloroplast stromules function during innate immunity. *Developmental Cell* 34, 45-57.
- Cardwell K. F., Happerly P. R., *et al.* (1989): Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. *Plant Disease* 73, 255-7.
- Carroll G. C. (1986): The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In *Microbiology of the Phyllosphere* (Fokkema N. J., *et al.*, eds.), pp. 205-222, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Catalán P., López-Álvarez D., *et al.* (2016a): Up-dated taxonomic descriptions, iconography, and habitat preferences of *Brachypodium distachyon*, *B. stacei*, and *B. hybridum* (*Poaceae*). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 73, e028.
- Catalán P., López-Álvarez D., *et al.* (2016b): Phylogeny and evolution of the genus *Brachypodium*. In *Genetics and Genomics of Brachypodium* (Vogel J. P., ed.), pp. 9-38, Springer, Switzerland.
- Clark L. G., Zhang W. P., *et al.* (1995): A phylogeny of the grass family (*Poaceae*) based on ndhF sequence data. *Systematic Botany* 20, 436-460.

- Clay K. (1988): Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69, 10-16.
- Conrath U. (2006): Systemic acquired resistance. *Plant Signaling and Behavior* 1, 179-184.
- Conrath U. (2011): Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* 16, 524-531.
- Cooke G. W. (1977): Waste of fertilisers. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 281, 231-241.
- Couch B. C., Kohn L. M. (2002): A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94, 683-693.
- Crous P. W., Groenewald J. Z. E., *et al.* (2003): Eyespot of cereals revisited: ITS phylogeny reveals new species relationships. *European Journal of Plant Pathology* 109, 841-50.
- Crous P. W., Lombard L., *et al.* (2021): *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology* 98: 100116.
- Čača Z., Kollár V., *et al.* (1981): *Zemědělská fytopatologie*, pp. 44-301, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, Česká republika.
- Dangl J. L. (1993): Application of *Arabidopsis thaliana* to outstanding issues in plant-pathogen interactions. *International Review Cytology* 144, 53-83.
- Dangl J. L., Jones J. D. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Daniels A., Lucas J. A., *et al.* (1991): Morphology and ultrastructure of W and R pathotypes of *Pseudocercospora herpotrichoides* on wheat seedlings. *Mycological Research* 95, 385-97.
- Davis D. (1967): Cross-protection in *Fusarium* wilt diseases. *Phytopathology* 57, 311-314.
- De Bary A. (1866): *Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten*, Engelmann, Leipzig, Germany.
- Des Marais D. L., Juenger T. E. (2016): *Brachypodium* and the abiotic environment. In *Genetics and Genomics of Brachypodium* (Vogel J., ed.), pp. 291-311, Springer, Switzerland.
- Desjardins A. E. (2007): *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology, pp. 101-102, APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA.
- Desmond O. J., Manners J. M., *et al.* (2008): The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9, 435-445.
- Dickinson C. H., Lucas J. A. (1982): *Plant pathology and plant pathogens*, pp. 28-29, Blackwell Mosby Book Distributors, Saint Louis, Missouri, USA.
- Dignani M. C., Anaissie E. (2004): Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection* 10 (Suppl.1), 67-75.
- Dinolfo M. I., Martínez M., *et al.* (2021): Evaluation of interaction between *Brachypodium distachyon* roots and *Fusarium* species. *European Journal of Plant Pathology* 159, 269-278.
- Draper J., Mur L. A. J., *et al.* (2001): *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology* 127, 1539-1555.
- Duczek L. J. (1997): Biological control of common root rot in barley by *Idriella bolleyi*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19, 402-405.
- Dudeja S. S., Giri R. (2014): Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legume and non-legume. *African Journal of Microbiology Research* 8, 1562-1572.
- Fatemi L., Shadmani S., *et al.* (2018): Biocontrol activity of endophytic fungus of barley, *Microdochium bolleyi*, against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Mycologia Iranica* 5, 7-14.

- Fitzgerald T. L., Powell J. J., *et al.* (2015): *Brachypodium* as an emerging model for cereal-pathogen interactions. *Annals of Botany* 115, 717-731.
- Foroud N. A., Eudes F. (2009): Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 147-173.
- Foster R. C., Rovira A. D., *et al.* (1983): *Ultrastructure of the root-soil interface*, APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA.
- Fox-Roberts J. J., Deacon J. W. (1988): *Biological control of take-all fungi*. Northern Ireland.
- Freeman S., Rodriguez R. J. (1993): Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260, 75-78.
- Gao X., Chen X., *et al.* (2013): Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases. *PLoS Pathogens* 9: e1003127.
- Garvin D. F., Gu Y-Q., *et al.* (2008): Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Science* 48, 69-84.
- Gaut B. S. (2002): Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytologist* 154, 15-28.
- Gessler C., Kuc J. (1982): Induction of resistance to *Fusarium* wilt in cucumber by root and foliar pathogens. *Phytopathology* 72, 1439-1441.
- Gosman N. E. (2001): *Analysis of the genetic basis of resistance to Fusarium culmorum in wheat*. PhD Thesis. University of East Anglia, UK.
- Gouda S., Das G., *et al.* (2016): Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers in Microbiology* 7: 1538.
- Grant M., Brown I., *et al.* (2000): The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant Journal* 23, 441-450.
- Grau J., Kremer B. P., *et al.* (1998): *Trávy: lipnicovitě, šáchorovitě, sítinovitě a rostliny podobné travám Evropy*, pp. 19-20, Knižní klub, Praha, Česká republika.
- Greenberg J. T., Yao N. (2004): The Role and Regulation of Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Cellular Microbiology* 6, 201-211.
- Hallmann J., Sikora R. A. (1994): Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101, 475-481.
- Hallmann J., Sikora R. A. (1996): Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102, 155-162.
- Hata K., Sone K. (2008): Isolation of endophytes from leaves of *Neolitsea sericea* in broadleaf and conifer stands. *Mycoscience* 49, 229-232.
- Häni F. J., Popow G., *et al.* (1993): *Obrazový atlas chorob a škůdců polních plodin: Příručka ochrany rostlin v integrované produkci*, pp. 50-68, Scientia, Praha, Česká republika.
- Hernández-Restrepo M., Groenewald J. Z., *et al.* (2016): Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia* 36, 57-82.
- Hinton M. J., Parry D. W. (1993): Screening selected fungi for antagonism towards *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, the cause of eyespot disease of cereals. *Biocontrol Science and Technology* 3, 13-19.
- Hong S. Y., Seo P. J., *et al.* (2008): Exploring valid reference genes for gene expression studies in *Brachypodium distachyon* by real-time PCR. *BMC Plant Biology* 7: 112.
- Hong J. J., Park Y-S., *et al.* (2012): Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*, *Planta* 236, 851-865.

- Huala E., Dickerman A. W., *et al.* (2001): The *Arabidopsis* information resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research* 29: 102e5.
- Huo N., Vogel J. P., *et al.* (2009): Structural characterization of *Brachypodium* genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant Molecular Biology* 70, 47-61.
- Chakraborty S., Obanor F., *et al.* (2010): Wheat crown rot pathogens *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* lack specialization. *Phytopathology* 100, 1057-1065.
- Chochois V., Vogel J. P., *et al.* (2012): Application of *Brachypodium* to the genetic improvement of wheat roots. *Journal of Experimental Botany* 63, 3467-3474.
- Jagodzick P., Tajdel-Zielinska M., *et al.* (2018): Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in Plant Science* 9: 1387.
- Jalgaonwala R. E., Mohite B. V., *et al.* (2011): Natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1, 21-32.
- Jansen C., von Wettstein D., *et al.* (2005): Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16892-16897.
- Jenkins G., Hasterok R., *et al.* (2003): Building the molecular cytogenetic infrastructure of a new model grass. In *Application of novel cytogenetic and molecular techniques in genetics and breeding of the grasses* (Zwierzykowski Z. *et al.*, eds.), pp. 77-84, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland.
- Jestoi M., Rokka M., *et al.* (2004): Presence and concentrations of the *Fusarium*-related mycotoxins beauvericin, enniatins and moniliformin in Finnish grain sample. *Food Additives and Contaminants A* 21, 794-802.
- Jeworutzki E., Roelfsema M. R., *et al.* (2010): Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant Journal* 62, 367-378.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2006): The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Joseph B., Priya R. M. (2011): Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1, 291-309.
- Jung K-H., An G., *et al.* (2008): Towards a better bowl of rice: assigning function to tens of thousands of rice genes. *Nature Reviews: Genetics* 9, 91-101.
- Kawasaki A., Donn S., *et al.* (2016): Microbiome and exudates of the root and rhizosphere of *Brachypodium distachyon*, a model for wheat. *PLoS One* 11: e0164533.
- Kazan K., Gardiner D. M., *et al.* (2012): On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. *Molecular Plant Pathology* 13, 399-413.
- Kellogg E. A. (2001): Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125, 1198-1205.
- Kirk J. J., Deacon J. W. (1987a): Control of the take-all fungus by *Microdochium bolleyi*, and interactions involving *M. bolleyi*, *Phialophora graminicola* and *Periconia macrospinoso* on cereal roots. *Plant and Soil* 98, 231-237.
- Klickstein L. B., Neve R. L., *et al.* (2001): Conversion of mRNA into Double-Stranded cDNA. *Current Protocols in Molecular Biology* 29, 5.5.1-5.5.14.
- Kollers S., Rodemann B., *et al.* (2013): Whole genome association mapping of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 8: e57500.
- Kouzai Y., Kimura M., *et al.* (2016): Expression profiling of marker genes responsive to the defence-associated phytohormones salicylic acid, jasmonic acid and ethylene in *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology* 16: 59.

- Kůdela V., Bartoš P., *et al.* (1989): *Obecná fytopatologie*, pp. 62-150, Academia, Praha, Česká republika.
- Leonard K. J., Bushnell W. R. (2003): *Fusarium* head blight of wheat and barely, pp. 11-12, APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA.
- Kůdela V., Kocourek F., *et al.* (2012): České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin, pp. 29-72, Česká akademie zemědělských věd, Odbor rostlinolékařství, Praha, Česká republika.
- Lemmens M., Scholz U., *et al.* (2005): The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 18, 1318-1324.
- Leonelli S., Ankeny R. A. (2013): What makes a model organism? *Endeavour* 37, 209-212.
- Li L., Li M., *et al.* (2014): The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15, 329-338.
- Lucas J. A., Dyer P. S., *et al.* (2000): Pathogenicity, host-specificity, and population biology of *Tapesia* spp., causal agents of eyespot disease of cereals. *Advances in Botanical Research* 33, 225-258.
- Ma J., Huang X., *et al.* (2009): Identification of Expressed Genes during Compatible Interaction between Stripe Rust (*Puccinia striiformis*) and Wheat Using a cDNA Library. *BMC Genomics* 10, 586-597.
- Maier F. J., Miedaner T., *et al.* (2006): Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* 7, 449-461.
- Mandadi K. K., Scholthof K-B. G. (2013): Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell* 25, 1489-1505.
- Mandyam K., Loughin T., *et al.* (2010): Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tallgrass prairie. *Mycologia* 102, 813-821.
- Manning B., Southwell R., *et al.* (2000): *Fusarium* head blight in northern NSW, pp. 2-3. New South Wales Agriculture Research Update, New South Wales, Australia.
- Manzaneda A. J., Rey P. J., *et al.* (2015): Natural variation, differentiation, and genetic trade-offs of ecophysiological traits in response to water limitation in *Brachypodium distachyon* and its descendent allotetraploid *B. hybridum* (*Poaceae*). *Evolution* 69, 2689-2704.
- Marasas W. F. O., Nelson P. E., *et al.* (1984): Toxigenic *Fusarium* Species. Identity and Mycotoxicology, pp. 328-328, The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- Matta A. (1989): Induced resistance to *Fusarium* wilt diseases. In *Vascular Wilt Diseases of Plants — Basic Studies and Control* (Tjamos E. C., *et al.*, eds.), pp. 175-196, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Mergoum M., Hill J. P., *et al.* (1998): Evaluation of resistance of winter wheat to *Fusarium acuminatum* by inoculation of seedling roots with single, germinated macroconidia. *Plant Disease* 98, 300-302.
- Mersmann S., Bourdais G., *et al.* (2010): Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiology* 154, 391-400.
- Miedaner T. (1997): Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. *Plant Breeding* 116, 201-220.
- Mitsuhashi I., Iwai T., *et al.* (2008): Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics* 279, 415-427.
- Murray D. I. L., Gadd G. M. (1981): Preliminary studies on *Microdochium bolleyi* with special reference to colonization of barley. *Transactions of the British Mycological Society* 76, 397-403.

- Murray G., Brennan J. (2009): Estimating disease losses to the Australian wheat industry. *Australasian Plant Pathology* 38, 558-570.
- Nair D. N., Padmavathy S. (2014): Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal* 2014: 250693.
- Nganje W. E., Bangsund D. A., *et al.* (2004): Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley. *Applied Economic Perspectives and Policy* 26, 332-347.
- Nishad R., Ahmed T., *et al.* (2020): Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Frontiers in Microbiology* 11: 1298.
- O'Donnell K., Ward T. J., *et al.* (2004): Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology* 41, 600-623.
- Oerke E.-C. (2006): Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144, 31-43.
- Parry D. W., Jenkinson P., *et al.* (1995): *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology* 44, 207-238.
- Parthasarathi S., Sathya S., *et al.* (2012): Isolation and characterization of antimicrobial compound from marine *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 4, 268-277.
- Peraldi A., Beccari G., *et al.* (2011): *Brachypodium distachyon*: a new pathosystem to study *Fusarium* head blight and other *Fusarium* diseases of wheat. *BMC Plant Biology* 11, 100.
- Peraldi A. (2012): *Brachypodium distachyon* as a genetic model pathosystem to study resistance against fungal pathogens of small grain cereals. PhD Thesis. University of East Anglia, UK.
- Peraldi A., Griffe L. L., *et al.* (2014): *Brachypodium distachyon* exhibits compatible interactions with *Oculimacula* spp. and *Ramularia collo-cygni*, providing the first pathosystem model to study eyespot and ramularia leaf spot diseases. *Plant Pathology* 63, 554-562.
- Pestka J. J., Zhou H. R., *et al.* (2004): Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unravelling a paradox. *Toxicology Letters* 153, 61-73.
- Petrini O. (1991): Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial Ecology of Leaves* (Andrews J. H., *et al.*, eds.), pp. 179-197, Springer-Verlag, New York, USA.
- Phytozome [online] [navštíveno 20. 7. 2021] Dostupné z <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>
- Pieterse C. M., Zamioudis C., *et al.* (2014): Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52, 347-375.
- Pimentel M. R., Molina G., *et al.* (2011): Use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International* 2011: 576286.
- Placinta C. M., D'Mello J. P. F., *et al.* (1999): A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78, 21-37.
- Podgórska A., Burian M., *et al.* (2017): Extra-cellular but extra-ordinarily important for cells: apoplastic reactive oxygen species metabolism. *Frontiers in Plant Science* 8: 1353.
- Postma J., Rattink H. (1991): Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Botany* 70, 1199-1205.
- Powell J. J., Carere J., *et al.* (2017): Transcriptome analysis of *Brachypodium* during fungal pathogen infection reveals both shared and distinct defense responses with wheat. *Sci. Rep.* 7: 17212.
- Reimer-Michalski E., Conrath U. (2016): Innate immune memory in plants. *Seminars in immunology* 28, 319-327.
- Reinecke P. (1978): *Microdochium bolleyi* at the stem base of cereals. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 85, 679-685.

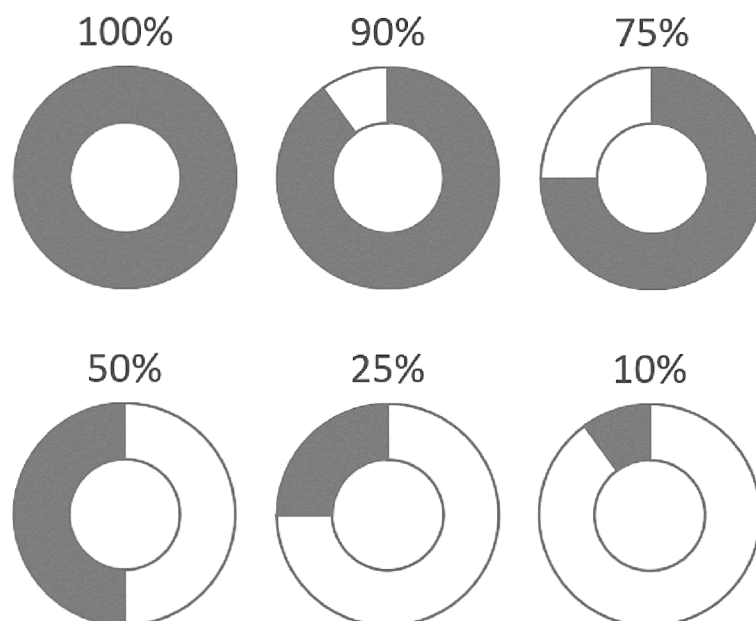
- Reinecke P., Fokkema N. J. (1981): An evaluation of methods of screening fungi from the haulm base of cereals for antagonism to *Pseudocercospora herpotrichoides* in wheat. Transactions of the British Mycological Society 77, 343-350.
- Rodríguez-Gálvez E., Mendgen K. (1995): The infection process of *Fusarium oxysporum* in cotton root tips. Protoplasma 189, 61-72.
- Rocha O., Ansari K., et al. (2005): Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. Food Additives and Contaminants 22, 369-378.
- Rothen C., Miranda V., et al. (2018): *Microdochium bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Physiological characterization and structural features of its association with wheat. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 53, 169-182.
- Routledge A. P. M., Shelley G., et al. (2004): *Magnaporthe grisea* interactions with the model grass *Brachypodium distachyon* closely resemble those with rice (*Oryza sativa*). Molecular Plant Pathology 5, 253-265.
- Rozen S., Skaletsky H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in molecular biology 132, 365-386
- Sachs E., Greil P., et al. (1998): *Ramularia collo-cygni* – a re-discovered barley pathogen in Europe. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 357, 96-97.
- Saijo Y., Loo E. P., et al. (2018): Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. Plant Journal 93, 592-613.
- Salamini F., Ozkan H., et al. (2002): Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. Nature Reviews Genetics 3, 429-441.
- Salse J., Bolot S., et al. (2008): Identification and characterization of shared duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. The Plant Cell 20, 11-24.
- Sandoya G. V., Buanafina M. M. O. (2014): Differential responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to insect and fungal pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 85, 53-64.
- Sasaki T., Antonio B. A. (2004): Rice genome as a model system for cereals. In Cereal Genomics (Gupta P. K., et al., eds.), pp. 535-557, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Sánchez-Ken J. G., Clark L. G. (2010): Phylogeny and a new tribal classification of the *Panicoideae* s.l. (*Poaceae*) based on plastid and nuclear sequence data and structural data. American Journal of Botany 97, 1732-1748.
- Schardl C. L., Phillips T. D. (1997): Protective grass endophytes: where are they from and where are they going? Plant Disease 81, 430-438.
- Schardl C. L., Leuchtman A., et al. (2004): Symbioses of Grasses with Seedborne Fungal Endophytes. Annual Review of Plant Biology 55, 315-340.
- Scholthof K-B. G., Irigoyen S., et al. (2018): *Brachypodium*: A Monocot Grass Model Genus for Plant Biology. The Plant Cell, Vol. 30, 1673-1694.
- Sieber T. (2002): Fungal Root Endophytes. In Plant Roots (Kafkafi U., et al., eds.), pp. 887-917, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Simopoulos A. P. (1999): Evolutionary Aspects of Nutrition and Health, pp. 19-73, S. Karger, Washington, DC, USA.
- Singh R., Dubey A. K. (2015): Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds. Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences 5, 106-116.
- Skamnioti P., Gurr S. J. (2009): Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. Trends in Biotechnology 27, 141-150.
- Smith S. E., Smith F. A., et al. (2003): Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses, Plant Physiology 133, 16-20.
- Somerville C. (2006): The billion-ton biofuels vision. Science 312, 1277.



- Specian V., Sarragiotto M. H., *et al.* (2012): Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. *The Brazilian Journal of Microbiology* 43, 1174–1182.
- Spiegel D., Schonbeck F. (1991): Occurrence and significance of *Microdochium bolleyi* in barley roots (Abstract), In *Biotic Interactions and Soil-borne Diseases. Proceedings of the First Conference of the European Foundation for Plant Pathology* (Beemster A. B. R., *et al.*, eds.), pp. 215-216, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Stępniewska Z., Kuzniar A. (2013): Endophytic microorganisms-promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9589-9596.
- The International *Brachypodium* Initiative (2010): Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463, 763-768.
- Urban M., Daniels S., *et al.* (2002): *Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Plant Journal* 32, 961-973.
- Vain P. (2011): *Brachypodium* as a model system for grass research. *Journal of Cereal Science* 54, 1-7.
- Vogel J., Bragg J. (2009): *Brachypodium distachyon*, a new model for the *Triticeae*. In *Genetics and genomics of the Triticeae* (Muehlbauer G. J., *et al.*, eds.), pp. 427-449, Springer, New York, USA.
- Walters D. R., Havis N. D., *et al.* (2008): *Ramularia collo-cygni*: the biology of an emerging pathogen of barley. *FEMS Microbiology Letters* 279, 1-7.
- Watt M., Schneebeli K., *et al.* (2009): The shoot and root growth of *Brachypodium* and its potential as a model for wheat and other cereal crops. *Functional Plant Biology* 36, 960-969.
- Wennström A. (1994): Endophyte: the misuse of an old term. *Oikos* 71, 535-536.
- Wirsel S. G. R., Leibinger W., *et al.* (2001): Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. *New Phytologist* 149, 589-598.
- Yu Y. (2019): Diverse Strategies Coping with Winter in Barley and its Relatives. *Plant Physiology* 180, 5-6.
- Yuan P., Jauregui E., Du L., *et al.* (2017): Calcium signatures and signaling events orchestrate plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 38, 173-183.

## 9 PŘÍLOHY

**PŘÍLOHA A:** Schéma, podle něhož byl určován stupeň napadení listu v místě poškození rostliny Pasteurovou pipetou.



**PŘÍLOHA B:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin pšenice pro varianty „Mb0/Fc1“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičnáře 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekróz, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb0	Fc1	1	10
Mb0	Fc1	1	40
Mb0	Fc1	1	10
Mb0	Fc1	1	0
Mb0	Fc1	1	50
Mb0	Fc1	1	50
Mb0	Fc1	2	75
Mb0	Fc1	2	50
Mb0	Fc1	2	100
Mb0	Fc1	2	50
Mb0	Fc1	2	90
Mb0	Fc1	2	50
Mb0	Fc1	3	100
Mb0	Fc1	3	100
Mb0	Fc1	3	50
Mb0	Fc1	3	25
Mb0	Fc1	3	75
Mb0	Fc1	3	25
Mb0	Fc1	4	25
Mb0	Fc1	4	0
Mb0	Fc1	4	30
Mb0	Fc1	4	10
Mb0	Fc1	4	100
Mb0	Fc1	4	50
Mb0	Fc1	5	90
Mb0	Fc1	5	50
Mb0	Fc1	5	50
Mb0	Fc1	5	0
Mb0	Fc1	5	30
Mb0	Fc1	5	10

**PŘÍLOHA C:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin pšenice pro varianty „Mb1/Fc1“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičné 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekróz, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb1	Fc1	1	25
Mb1	Fc1	1	10
Mb1	Fc1	1	50
Mb1	Fc1	1	25
Mb1	Fc1	1	75
Mb1	Fc1	1	0
Mb1	Fc1	2	75
Mb1	Fc1	2	5
Mb1	Fc1	2	0
Mb1	Fc1	2	0
Mb1	Fc1	2	0
Mb1	Fc1	2	0
Mb1	Fc1	3	5
Mb1	Fc1	3	5
Mb1	Fc1	3	0
Mb1	Fc1	3	0
Mb1	Fc1	3	5
Mb1	Fc1	3	0
Mb1	Fc1	4	5
Mb1	Fc1	4	0
Mb1	Fc1	4	10
Mb1	Fc1	4	50
Mb1	Fc1	4	100
Mb1	Fc1	4	10
Mb1	Fc1	5	0
Mb1	Fc1	5	0
Mb1	Fc1	5	10
Mb1	Fc1	5	10
Mb1	Fc1	5	5
Mb1	Fc1	5	5

**PŘÍLOHA D:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin pšenice pro varianty „Mb0/Fc0“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičnáře 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekróz, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0

**PŘÍLOHA E:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin pšenice pro varianty „Mb1/Fc0“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičnáře 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekroz, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0

**PŘÍLOHA F:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin *B. distachyon* pro varianty „Mb0/Fc1“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičnáře 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekróz, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb0	Fc1	1	90
Mb0	Fc1	1	90
Mb0	Fc1	1	50
Mb0	Fc1	1	90
Mb0	Fc1	1	75
Mb0	Fc1	1	25
Mb0	Fc1	2	10
Mb0	Fc1	2	10
Mb0	Fc1	2	50
Mb0	Fc1	2	50
Mb0	Fc1	2	75
Mb0	Fc1	2	35
Mb0	Fc1	3	90
Mb0	Fc1	3	75
Mb0	Fc1	3	90
Mb0	Fc1	3	90
Mb0	Fc1	3	5
Mb0	Fc1	3	75
Mb0	Fc1	4	75
Mb0	Fc1	4	90
Mb0	Fc1	4	50
Mb0	Fc1	4	50
Mb0	Fc1	4	5
Mb0	Fc1	4	50
Mb0	Fc1	5	25
Mb0	Fc1	5	5
Mb0	Fc1	5	50
Mb0	Fc1	5	0
Mb0	Fc1	5	50
Mb0	Fc1	5	30

**PŘÍLOHA G:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin *B. distachyon* pro varianty „Mb1/Fc1“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičné 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekrotických, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb1	Fc1	1	5
Mb1	Fc1	1	5
Mb1	Fc1	1	10
Mb1	Fc1	1	0
Mb1	Fc1	1	0
Mb1	Fc1	1	0
Mb1	Fc1	2	50
Mb1	Fc1	2	50
Mb1	Fc1	2	0
Mb1	Fc1	2	0
Mb1	Fc1	2	0
Mb1	Fc1	2	10
Mb1	Fc1	3	25
Mb1	Fc1	3	25
Mb1	Fc1	3	5
Mb1	Fc1	3	5
Mb1	Fc1	3	5
Mb1	Fc1	3	5
Mb1	Fc1	4	0
Mb1	Fc1	4	0
Mb1	Fc1	4	0
Mb1	Fc1	4	5
Mb1	Fc1	4	0
Mb1	Fc1	4	0
Mb1	Fc1	5	10
Mb1	Fc1	5	0
Mb1	Fc1	5	90
Mb1	Fc1	5	75
Mb1	Fc1	5	25
Mb1	Fc1	5	25



**PŘÍLOHA H:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin *B. distachyon* pro varianty „Mb0/Fc0“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičnáře 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekróz, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	1	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	2	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	3	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	4	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0
Mb0	Fc0	5	0

**PŘÍLOHA CH:** Hodnoty stupně napadení jednotlivých listů rostlin *B. distachyon* pro varianty „Mb1/Fc0“ v 8 dpi. Čísla 1–5 značí květičnáře 1–5, 6 opakování každého čísla pak značí 6 nekróz, hodnocených na třech listech.

<b>endofyt</b>	<b>patogen</b>	<b>opakování</b>	<b>stupeň napadení [%]</b>
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	1	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	2	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	3	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	4	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0
Mb1	Fc0	5	0

**PŘÍLOHA I:** Charakteristiky jednotlivých vzorků pšenice Bohemia, koncentrace RNA z nich izolované – měřené přístrojem NanoDrop a koncentrace cDNA (přeepsané z RNA rostlin) – měřené přístrojem Qubit.

<b>číslo vzorku</b>	<b>rostlina</b>	<b>varianta infekce</b>	<b>dpi</b>	<b>koncentrace RNA [ng/μl]</b>	<b>koncentrace cDNA [ng/μl]</b>
20-140	pšenice	Mb0/Fc0	1	241,0	29,4
20-141	pšenice	Mb0/Fc0	1	350,0	56,2
20-142	pšenice	Mb0/Fc0	1	neměřeno	neměřeno
20-143	pšenice	Mb0/Fc1	1	204,5	27,0
20-144	pšenice	Mb0/Fc1	1	339,0	47,2
20-145	pšenice	Mb0/Fc1	1	neměřeno	neměřeno
20-146	pšenice	Mb1/Fc0	1	230,3	16,4
20-147	pšenice	Mb1/Fc0	1	168,0	43,6
20-148	pšenice	Mb1/Fc0	1	neměřeno	neměřeno
20-149	pšenice	Mb1/Fc1	1	165,2	28,6
20-150	pšenice	Mb1/Fc1	1	190,0	34,8
20-151	pšenice	Mb1/Fc1	1	neměřeno	neměřeno
20-152	pšenice	Mb0/Fc0	2	165,8	31,4
20-153	pšenice	Mb0/Fc0	2	500,0	57,6
20-154	pšenice	Mb0/Fc0	2	neměřeno	neměřeno
20-155	pšenice	Mb0/Fc1	2	128,0	21,4
20-156	pšenice	Mb0/Fc1	2	394,0	51,6
20-157	pšenice	Mb0/Fc1	2	neměřeno	neměřeno
20-158	pšenice	Mb1/Fc0	2	178,0	33,8
20-159	pšenice	Mb1/Fc0	2	475,0	54,0
20-160	pšenice	Mb1/Fc0	2	neměřeno	neměřeno
20-161	pšenice	Mb1/Fc1	2	259,0	39,6
20-162	úšenice	Mb1/Fc1	2	484,0	58,8
20-163	pšenice	Mb1/Fc1	2	neměřeno	neměřeno
20-164	pšenice	Mb0/Fc0	8	127,0	12,5
20-165	pšenice	Mb0/Fc0	8	110,6	11,4
20-166	pšenice	Mb0/Fc0	8	neměřeno	neměřeno
20-167	pšenice	Mb0/Fc1	8	205,0	43,4
20-168	pšenice	Mb0/Fc1	8	196,0	28,6
20-169	pšenice	Mb0/Fc1	8	neměřeno	neměřeno
20-170	pšenice	Mb1/Fc0	8	223,0	24,2
20-171	pšenice	Mb1/Fc0	8	244,5	40,6
20-172	pšenice	Mb1/Fc0	8	neměřeno	neměřeno
20-173	pšenice	Mb1/Fc1	8	259,0	39,0
20-174	pšenice	Mb1/Fc1	8	116,3	19,5
20-175	Pšenice	Mb1/Fc1	8	neměřeno	neměřeno

**PŘÍLOHA J:** Charakteristiky jednotlivých vzorků *B. distachyon*, koncentrace RNA z nich izolované – měřené přístrojem NanoDrop a koncentrace cDNA (přepsané z RNA rostlin) – měřené přístrojem Qubit.

<b>číslo vzorku</b>	<b>rostlina</b>	<b>varianta infekce</b>	<b>dpi</b>	<b>koncentrace RNA [ng/μl]</b>	<b>koncentrace cDNA [ng/μl]</b>
20-176	Bd	Mb0/Fc0	1	199,7	26,6
20-177	Bd	Mb0/Fc0	1	455,0	57,0
20-178	Bd	Mb0/Fc0	1	neměřeno	neměřeno
20-179	Bd	Mb0/Fc1	1	249,4	25,8
20-180	Bd	Mb0/Fc1	1	376,0	49,4
20-181	Bd	Mb0/Fc1	1	neměřeno	neměřeno
20-182	Bd	Mb1/Fc0	1	162,0	22,4
20-183	Bd	Mb1/Fc0	1	293,0	42,4
20-184	Bd	Mb1/Fc0	1	neměřeno	neměřeno
20-185	Bd	Mb1/Fc1	1	137,2	13,9
20-186	Bd	Mb1/Fc1	1	376,0	42,2
20-187	Bd	Mb1/Fc1	1	neměřeno	neměřeno
20-188	Bd	Mb0/Fc0	2	222,8	42,4
20-189	Bd	Mb0/Fc0	2	268,0	41,8
20-190	Bd	Mb0/Fc0	2	neměřeno	neměřeno
20-191	Bd	Mb0/Fc1	2	182,4	34,2
20-192	Bd	Mb0/Fc1	2	270,0	34,6
20-193	Bd	Mb0/Fc1	2	neměřeno	neměřeno
20-194	Bd	Mb1/Fc0	2	139,0	26,4
20-195	Bd	Mb1/Fc0	2	320,0	37,2
20-196	Bd	Mb1/Fc0	2	neměřeno	neměřeno
20-197	Bd	Mb1/Fc1	2	149,0	29,8
20-198	Bd	Mb1/Fc1	2	539,0	50,0
20-199	Bd	Mb1/Fc1	2	neměřeno	neměřeno
20-200	Bd	Mb0/Fc0	8	264,0	46,6
20-201	Bd	Mb0/Fc0	8	176,3	21,2
20-202	Bd	Mb0/Fc0	8	neměřeno	neměřeno
20-203	Bd	Mb0/Fc1	8	359,0	42,4
20-204	Bd	Mb0/Fc1	8	126,6	18,8
20-205	Bd	Mb0/Fc1	8	neměřeno	neměřeno
20-206	Bd	Mb1/Fc0	8	209,0	42,3
20-207	Bd	Mb1/Fc0	8	198,2	22,0
20-208	Bd	Mb1/Fc0	8	neměřeno	neměřeno
20-209	Bd	Mb1/Fc1	8	273,0	34,0
20-210	Bd	Mb1/Fc1	8	98,2	11,7
20-211	Bd	Mb1/Fc1	8	neměřeno	neměřeno