

základnu pro oblast hodnocení kolekce genetických zdrojů. Jeho výsledky jsou využívány současnou kurátorkou kolekce dodnes. V rámci mezinárodního evropského projektu AGENT (Activated Genebank Network) byly jeho výsledky hodnocení ječmene jarního z let 1953–1972 použity pro zpracování porovnání dřívějšího hodnocení s daty ze současných pěstebních ročníků. Dále jsou jeho data, dochovaná v podobě výzkumných zpráv nebo přímo v polních denících, každoročně používána ke kontrole pravosti uchovávaných genetických zdrojů.

Je patrné, že práce s kolekcemi genetických zdrojů, kterým se věnoval s neutuchající pílí a velkou dávkou entuziasmu, byla Antonínu Foralovi koníčkem i vášní. Jeho odkaz je součástí kolekcí genetických zdrojů Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži a bude uchováván i nadále.

## Použité zdroje

- Výroční zpráva VÚO Kroměříž a odvětví 02 za rok 1954. Nestr.  
Zpráva o činnosti ČAZV–VÚO Kroměříž za rok 1958. Nestr.  
Holienka, J., Novák, B., Foral, A., Schmidt, J. 1960. Zpráva o studijní cestě do Čínské lidové republiky. Praha, VÚRV. 177 s. Za inženýrem Foralem. 1973. Úroda, 21(6), s. 203.  
Foral, Antonín, Ing., CSc. [Heslo]. In: Mihulka, S., Čížková, J., Hrubý, V., Kroftová, V., Kubačák, A., Steinová, Š. (eds). 2017. Osobnosti zemědělského výzkumu 20. století. Praha, Česká akademie zemědělských věd, s. 124-125.  
On-line katalog knihovny Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž, s.r.o. Dostupný z: <https://library.vukrom.cz/>. [2023-10-20].

## Modelový systém pro zkoumání interakcí rostlin a hub

(A model system for studying plant-fungal interactions)

Matušinsky Pavel<sup>1</sup>, Antalová Zuzana<sup>1</sup>, Sedláková Božena<sup>2</sup>, Bleša Dominik<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Agrotest fyto, s. r. o., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž

<sup>2</sup> Katedra botaniky, PřF, Univerzita Palackého v Olomouci

**Souhrn:** Interakce mezi endofytickými houbami a rostlinami hrají klíčovou roli v rostlinné biologii a ekologii. Tyto vztahy mohou mít význačný dopad na zdravotní stav a výkonnost rostlin, jejich schopnost odolávat stresovým podmínkám a interakci s patogeny. V tomto článku zdůrazňujeme důležitost zkoumání vzájemných interakcí a potřebu identifikace vhodných modelových systémů pro jejich studium.

**Klíčová slova:** endofyt, obrana rostlin, umělá inokulace, houbový patogen rostlin

**Abstract:** Interactions between endophytic fungi and plants are essential in plant biology and ecology. These relationships can significantly impact plant health and performance, their ability to withstand stress, and their interaction with pathogens. This article highlights the importance of investigating these interactions and the need to identify appropriate model systems for their study.

**Key Words:** endophyte, plant defense, artificial inoculation, fungal plant pathogen

## Úvod

Rostliny, ať už rostou v přírodě, nebo jsou pěstovány, téměř vždy navazují interakce s houbami. Tyto interakce mohou být rozděleny do tří hlavních kategorií: mutualistické, parazitické nebo neutrální. Jednou z nejběžnějších mutualistických asociací mezi rostlinami a houbami je mykorhizní symbióza. Avšak často se vyskytuje i tzv. endofytická symbióza, kdy houby kolonizují rostlinná pletiva, aniž by vyvolaly jakékoliv příznaky onemocnění. Endofytické houby naopak pomáhají rostlinám přežít v prostředí, kde jsou vystaveny negativním vlivům biotických stresorů, jako jsou patogeny a herbivoři, stejně jako abiotických faktorů, jako je nedostatek vody, nedostatek dostupných živin nebo nepříznivé teploty. Tyto endofyty představují skupinu kosmopolitních hub, převážně patřící do skupiny askomycet, obsahující různé řády, jako jsou Helotiales, Pleosporales, Sordariales a Xylariales.

*Microdochium bolleyi* (Obr. 1), patřící do třídy Ascomycota a řádu Xylariales, je houbou, která se endofytně vyskytuje především v kořenech obilovin a trav. *M. bolleyi* spadá do skupiny nejběžnějších kořenových endofytů, známých jako „dark septate endophytes“ (DSE), což jsou endofytické houby, které mají tmavě zbarvené přepážkované hyfy. Na rozdíl od mykorhizní symbiózy obvykle DSE neovlivňují příjem živin hostitelské rostliny. Avšak mohou sehrávat významnou úlohu v odolnosti rostliny vůči suchu,

nepříznivým teplotám a také při obraně rostliny před patogeny. Toto platí i pro druh *M. bolleyi*, který se na kořenech pšenice projevuje bez jakýchkoli známek onemocnění. Spíše naopak, hraje ochrannou roli vůči širokému spektru patogenů, jako jsou například původci černání kořenů a bazí stébel *Gaeumannomyces graminis*, patogeny kořenů a listů obilovin *Bipolaris sorokiniana* nebo patogeny z rodu *Fusarium*. *M. bolleyi* také účinně potlačuje škodlivý vliv parazitických háďátek, jako je *Heterodera avenae*, na pšenici.

*Brachypodium distachyon* (Obr. 2) je druh trávy z čeledi Poaceae s relativně malým genomem, krátkou vegetační dobou a malým vzrůstem, který je přibuzný obilovinám, jako je pšenice (*Triticum*) a ječmen (*Hordeum*). *Brachypodium distachyon* je modelový systém, který se často využívá ve výzkumu v oblasti vývoje rostlin, interakcí mezi rostlinami a mikroorganismy, účinků abiotického stresu a evoluční a systémové biologie. V rámci naší práce používáme *B. distachyon* jako modelový organismus pro studium interakcí mezi hostitelem a patogeny a také endofytickými houbami. Infikováním *B. distachyon* určitým druhem houby můžeme detailně zkoumat povahu těchto interakcí s hostitelskou rostlinou. Jedním z příkladů, jak využíváme *B. distachyon* jako modelový systém, je studium interakce s patogenem *Fusarium culmorum*, který napadá řadu hostitelů, včetně pšenice, ječmene a dalších druhů rostlin. Dále se zaměříme na interakce

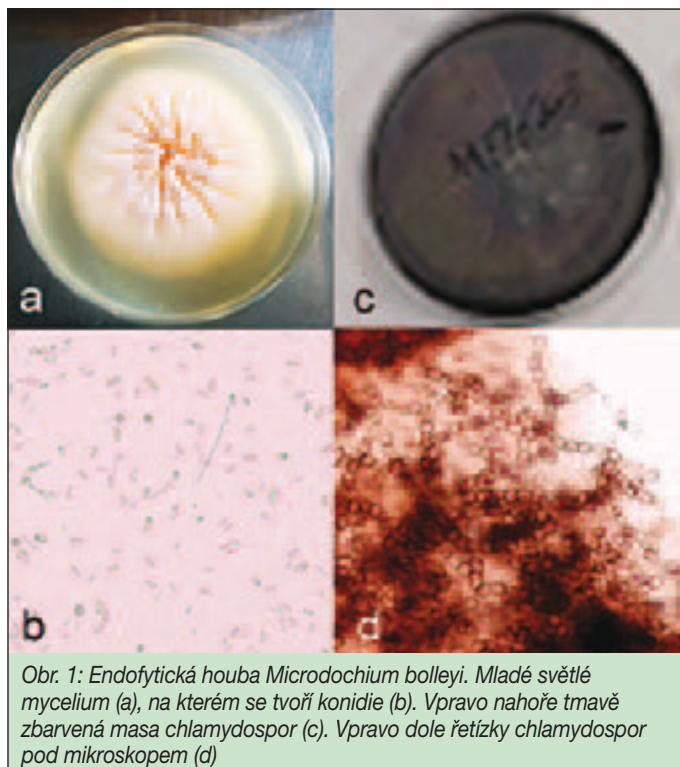
s endofytickou houbou *M. bolleyi* (Obr. 3). Je důležité zdůraznit, že interakce způsobené houbovými organismy u *B. distachyon* jsou velmi podobné těm, které byly pozorovány u pšenice. Tímto způsobem nám *B. distachyon* poskytuje cenný nástroj pro studium celé řady biologických procesů.

Nalezení vhodných modelových systémů, které nám umožní provádět detailní experimentální analýzy, je klíčové pro rozvoj znalostí v této oblasti. V tomto článku představujeme návrh ideálních partnerů mezi rostlinami a endofyty a zdůrazňujeme důležitost těchto partnerství pro posun v našem chápání vzájemných vztahů. Naše práce se zaměřuje na identifikaci a využití modelových systémů, jako je *Brachypodium distachyon* a *M. bolleyi*, pro studium interakcí mezi hostitelskými rostlinami a endofyty. Navržený model nám umožňuje provádět experimentální analýzy, které mohou přispět k lepšímu pochopení mechanismů vzájemných interakcí a jejich využití v zemědělství a ochraně rostlin.

## Materiál a metody

Rostliny *B. distachyon* byly udržovány ve skleníku (20/18 °C, den/noc) v květináčích o průměru 8 cm. Do každého květináče bylo umístěno deset semen. Po vyklíčení byl počet rostlin v každém květináči snížen na šest. Bylo použito šest izolátů *M. bolleyi* (UPOC-FUN-253-258) ze Sbírký fytopatogenních mikroorganismů UPOC (Česká republika). Inokulum izolátů *M. bolleyi* bylo kultivováno na zrnech prosa po dobu tří týdnů při 20 °C ve tmě. Před kultivací bylo 200 g semen prosa a 50 ml destilované vody v každém plastovém sáčku dvakrát sterilizováno parou při 120 °C po dobu 20 min. Každý izolát byl kultivován zvlášť a poté bylo před použitím všech šest izolátů stejným dílem smícháno dohromady. Rostliny byly inokulovány endofytem *M. bolleyi* během výsevu. Proso obsahující *M. bolleyi* (2,5 g na květináč) bylo rovnoměrně rozprostřeno přímo na osivo umístěné na substrátu. Do kontrolních ošetření bylo přidáno pouze sterilní proso bez endofytu. Osivo a inokulum bylo překryto 0,5 cm vrstvou substrátu.

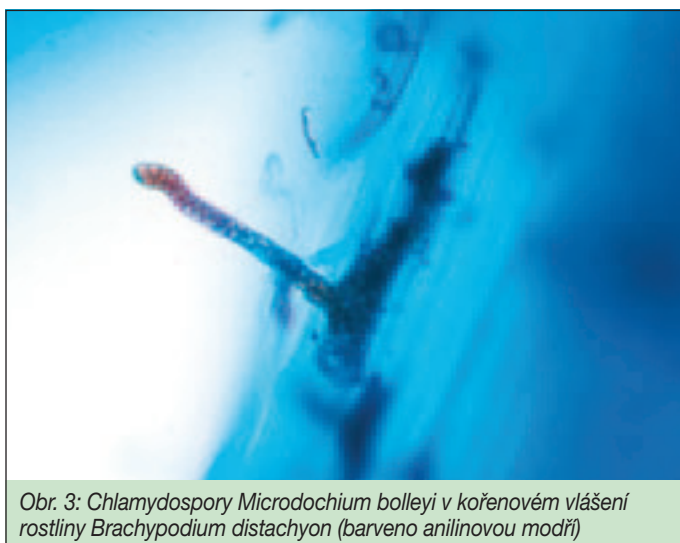
Ve fázi druhého odnože u *B. distachyon* byla provedena infekce pomocí *F. culmorum* na druhém horním listu. Listy byly poraněny ve dvou polohách jemným stlačením Pasteurovou pipetou na adaxiální ploše. Na každé místo poranění byla nanášena kapka (5 µl) konidiální suspenze (obsahující  $5 \times 10^5$  konidií ml<sup>-1</sup>), doplněná 0,05 % Tween 20. Izolát *F. culmorum* (FcBd19) byl získán ze symptomatických listů *M. bolleyi*. Inokulum *F. culmorum* bylo kultivováno na PDA pod UV-B světlem při 18 °C po dobu 2 týdnů. Makrokonidie byly získány seškrábnutím povrchu agarů sterilní špachtlí a přenesením konidií do sterilní destilované vody. Podobně byla provedena i kontrolní inokulace za použití sterilní destilované vody s 0,05 % Tween 20 (5 µl). Všechny rostliny byly umístěny pod plastovým krytem pro zvýšení relativní vlhkosti až do 2 dnů po inokulaci (dpi), kdy byly kryty odstraněny. Rozsah



Obr. 1: Endofytická houba *Microdochium bolleyi*. Mladé světlé mycelium (a), na kterém se tvoří konidie (b). Vpravo nahoře tmavě zbarvená masa chlamydospor (c). Vpravo dole řetízky chlamydospor pod mikroskopem (d)



Obr. 2: Modelová rostlina *Brachypodium distachyon*



Obr. 3: Chlamydospory *Microdochium bolleyi* v kořenovém vlášení rostliny *Brachypodium distachyon* (barveno anilínovou modří)

poškození listů byl vyhodnocen vizuálně v procentech a statisticky vyhodnocen TUKEY testem ( $P < 0.05$ ). Analýza exprese vybraných genů obrany rostlin byla provedena pomocí přístroje Real-Time PCR CFX96™ (Bio-Rad).

## Výsledky a diskuse

Kořenové endofyty mohou zvyšovat odolnost rostlin vůči patogenům jednak přímým antagonismem, prostřednictvím mykoparazitismu, antibiózou a/nebo kompeticí o živiny a niky. Dalším mechanismem může být spuštění indukované rezistence. Tuto poslední možnost jsme studovali v naší práci. Využili jsme modelovou rostlin *B. distachyon*, kterou jsme pěstovali ve dvou variantách, jednak s inokulací endofytem a jednak bez endofyту. Obě tyto varianty byly studovány z hlediska jejich reakce na patogenní houbov *F. culmorum*, kde bylo naším záměrem zjistit, zda rostliny kolonizované endofytem budou odolávat patogenu lépe než rostliny bez endofyту.

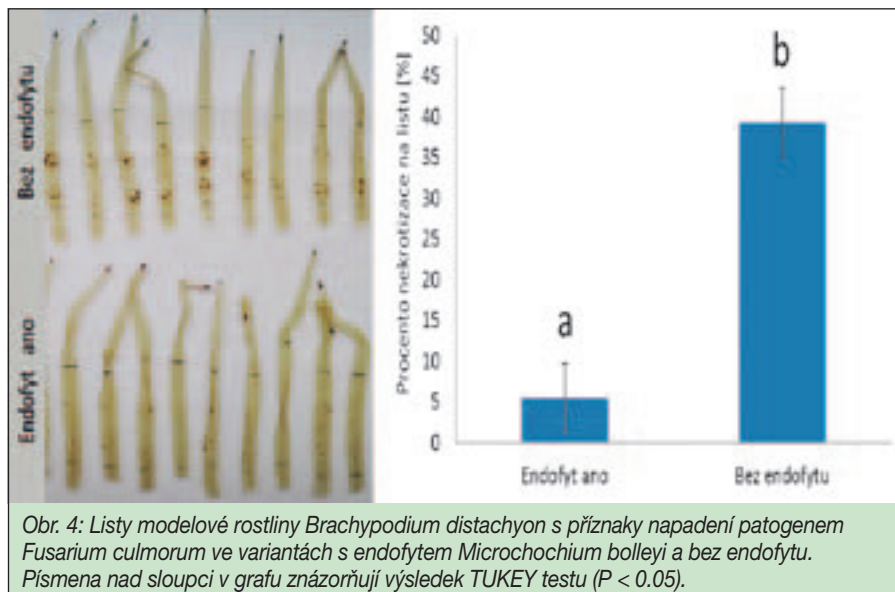
Na kontrolních rostlinách bez infekce *F. culmorum* nedošlo ke ztmavnutí pletiv a místa poškozená pipetou zůstala světle zbarvená, a to u obou variant s endofytem i bez. Naopak patogenem infikované rostliny vykazovaly výrazné symptomy poškození na listech. Po statistickém vyhodnocení dat bylo zjištěno, že rostliny bez endofyту *M. bolleyi* byly výrazně silněji poškozeny s vyšší mírou nekrotizace než rostliny s endofytem (Obr. 4).

U rostlin ve všech variantách byly měřeny hladiny exprese vybraných genů zapojených do obrany rostlin. V naší studii byly měřeny rozdíly v hladinách exprese mezi kontrolní variantou a rostlinami ošetřenými inokulací pouze endofyту nebo pouze patogenu. Poté i u současné inokulace endofytem a patogenem. Významné změny byly zjištěny pouze u některých genů (*BdPR1*, *BdPR9*, *BdPR10*, *BdChitinase1*) u variant infikovaných patogenní houbou *F. culmorum* (Obr. 5). U těchto genů byly změny zřetelné po 1 dpi a zejména 2 dpi, ale při posledním odběru vzorků po 8 dpi nebyly zjištěny žádné průkazné rozdíly. Ostatní geny nebyly infekcí patogenem ovlivněny. Inokulace rostlin endofytickou houbou *M. bolleyi* neovlivnila expresi testovaných markerových genů. Při porovnání variant pouze s patogenem a variant s endofytem a současně s patogenem nebyly zjištěny žádné rozdíly v expresi studovaných genů, přestože došlo k ovlivnění příznaků na listech. Expese testovaných genů tedy nebyla inokulací endofytem ovlivněna.

Závěrem lze říci, že existuje několik důvodů, proč endofytická houba *M. bolleyi* a rostlina *B. distachyon* představují optimální model pro studium interakcí mezi rostlinami a houbami. Předchozí studie potvrdily, že kompatibilita partnerů *M. bolleyi* a *B. distachyon* je vynikající a houba snadno roste v pletivech hostitele. Metoda inokulace je jednoduchá a struktury *M. bolleyi* jsou v hostitelských pletivech snadno viditelné pomocí světelné mikroskopie (Obr. 3). Předchozí studie prokázaly příznivý vliv *M. bolleyi* na zlepšení imunity hostitelské rostliny. Optimalizované metody a dostupné primery z posledních výzkumů umožňují analýzu genové exprese specifických markerových genů u *B. distachyon*. Výhodou *M. bolleyi* oproti striktně biotrofním symbiotickým organismům je možnost kultivace na axenických

médiích a masivní sporulace, díky které je případná produkce inokula snadnější. Naše výsledky ukazují, že *B. distachyon* a endofytická houba *M. bolleyi* mohou být modelovým systémem pro výzkum interakcí mezi rostlinami a houbami. Hlubší znalosti o dynamice kolonizace a přenosu endofytů by mohly být využity ke zlepšení růstu rostlin, odolnosti k abiotickým stresům a biologické ochrany proti patogenům.

/Recenzováno/

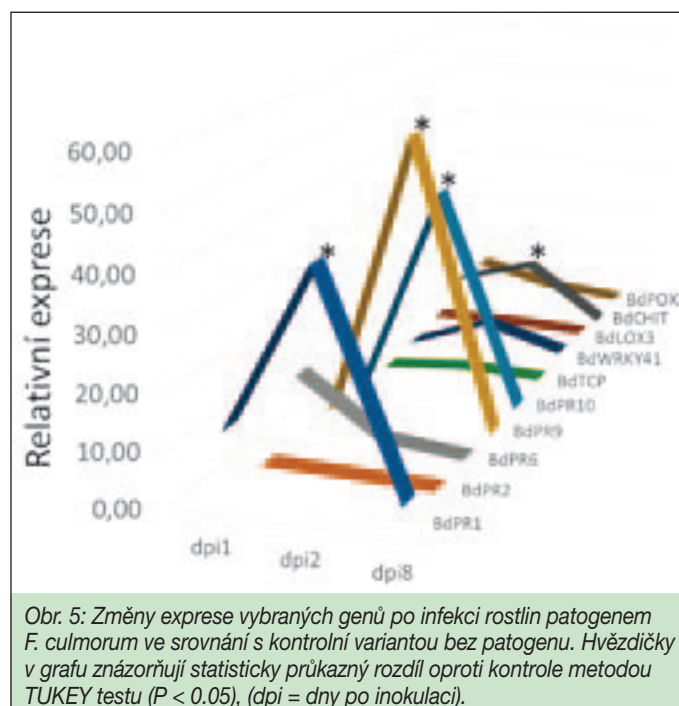


Obr. 4: Listy modelové rostliny *Brachypodium distachyon* s příznaky napadení patogenem *Fusarium culmorum* ve variantách s endofytem *Microchochium bolleyi* a bez endofyту. Písmena nad sloupci v grafu znázorňují výsledek TUKEY testu ( $P < 0.05$ ).

## Poděkování

Výsledky byly získány s využitím institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace Agrotestu fyto, s.r.o. (MZE-RO1123).

Přehled použité literatury je k dispozici u autorů studie.



Obr. 5: Změny exprese vybraných genů po infekci rostlin patogenem *F. culmorum* ve srovnání s kontrolní variantou bez patogenu. Hvězdičky v grafu znázorňují statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole metodou TUKEY testu ( $P < 0.05$ ), (dpi = dny po inokulaci).