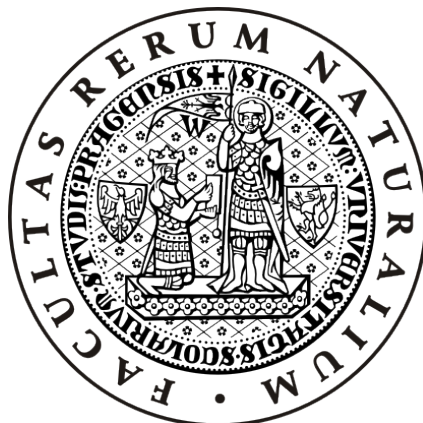


Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra botaniky



Bakalářská práce

Diverzita a ekologie endofytických hub v různých částech rostlin

Diversity and ecology of endophytic fungi in
different parts of plants

Adéla Kovaříčková

2010

Školitel: Mgr. Karel Prášil, CSc.

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli Karlu Prášilovi, který mě trpělivě naučil metodice práce v terénu i v laboratoři a poskytl mi mnoho cenných rad, připomínek i zajímavé literatury k sepsání této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Aleně Kubátové, CSc. a Ing. Petru Šrůtkovi, Ph.D. z Fakulty lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze za pomoc při práci a odborné rady.

Také chci poděkovat Mirkovi Kolaříkovi a ostatním členům Mikrobiologického ústavu AV ČR za pomoc a rady týkající se metodiky molekulárních metod.

Děkuji rovněž RNDr. Davidu Novotnému, Ph.D. z Výzkumného ústavu rostlinné výroby a všem členům mykologické pracovní skupiny za užitečné připomínky k výběru tématu mé bakalářské práce i k samotnému zpracování.

Také bych ráda poděkovala laborantkám, paní Lence Pokorné a paní Dagmar Kozákové, které mi ochotně pomohly s přípravou půd a všemi problémy v laboratoři.

Obsah

Abstrakt	6
Úvod	7
Endofytické houby	8
Systémoví endofyti travin	9
Nesystémoví endofyti	11
Endofytické houby v nadzemních orgánech rostlin.....	13
Endofytické houby v listech.....	13
Endofytické houby v dřevních pletivech rostlin.....	16
Endofytické houby ve dřevě.....	16
Endofytické houby v peridermu a lýku dřevin.....	18
Endofytické houby v kmenech a větvích dřevin.....	19
Endofytické houby v kořenech.....	22
Závěr	26
Praktická část	28
Úvod.....	28
Cíle.....	28
Zdroj materiálu.....	29
Lokalita.....	29
Jilm vaz (<i>Ulmus laevis</i>).....	30
Odběr materiálu.....	30
Zpracování materiálu.....	31
Zpracování odebraných vzorků.....	31
Kultivace.....	31
Mikroskopické pozorování a fotodokumentace.....	31
Předběžná determinace.....	32
Výsledky a diskuze.....	32
Frekvence kolonizace.....	32
Druhová diverzita.....	32
Kořeny.....	33
Nadzemní části.....	34
Seznam použité literatury	38

Abstrakt

Přestože byly endofytické houby v uplynulých letech intenzivně zkoumány, nevěnovalo se zatím mnoho pozornosti endofytické kolonizaci celé rostliny. Rešeršní část této práce se zabývá rozdíly v diverzitě a ekologii endofytů uvnitř celých rostlin, jejichž jednotlivé části představují kvalitativně odlišná prostředí pro růst endofytických hub. Nejvýrazněji se liší parametry kolonizace systémových endofytů travin, kteří náleží do čeledi Clavicipitaceae, a taxonomicky heterogenní skupiny nesystémových endofytů: systémový endofyt kolonizuje všechny nadzemní orgány traviny, zatímco nesystémoví endofyti tvoří pouze lokální infekce a jejich druhové složení se v jednotlivých rostlinných částech liší. Praktická část práce obsahuje pilotní studii druhové diverzity endofytických hub z dřevních částí (větví, kmenů a kořenů) jilmu (*Ulmus laevis*). Vzorky, kultivované na agarové půdě, vykazují rozdíly ve frekvenci kolonizace endofyty i v diverzitě izolovaných rodů hub.

Klíčová slova: endofytické houby, Clavicipitaceae, nesystémoví endofyti, listy, dřevní pletiva, kořeny, *Ulmus laevis*

Abstract

Even though endophytic fungi have been studied intensively in the past years, little attention has been paid to endophytic colonisation of a whole plant. The search part of this work is about the differences in diversity and ecology of endophytes within whole plants, whose single parts represent qualitatively different environments for growth of endophytic fungi. The main difference is between the colonisation of systemic endophytes of grasses from family Clavicipitaceae and the colonisation of taxonomically heterogeneous group of non-systemic endophytes. A systemic endophyte colonizes all above-ground organs of grass, while a non-systemic endophytes form only local infections, and their species composition in specific plant parts differs. The practical part of this work encompasses the pilot study of species diversity of endophytic fungi from woody parts (branches, stems and roots) of an elm tree (*Ulmus laevis*). There are differences in the frequency of colonisation among samples cultivated on agar plates, and also in diversity of isolated fungal genera.

Key words: endophytic fungi, Clavicipitaceae, non-systemic endophytes, leaves, woody tissues, roots, *Ulmus laevis*

Úvod

Jako endofyti v širším slova smyslu jsou označovány organizmy (nejčastěji houby, bakterie či řasy), které jsou schopné alespoň část svého životního cyklu žít uvnitř rostliny, aniž by způsobovaly její poškození nebo jakékoliv viditelné známky onemocnění (Wilson 1995).

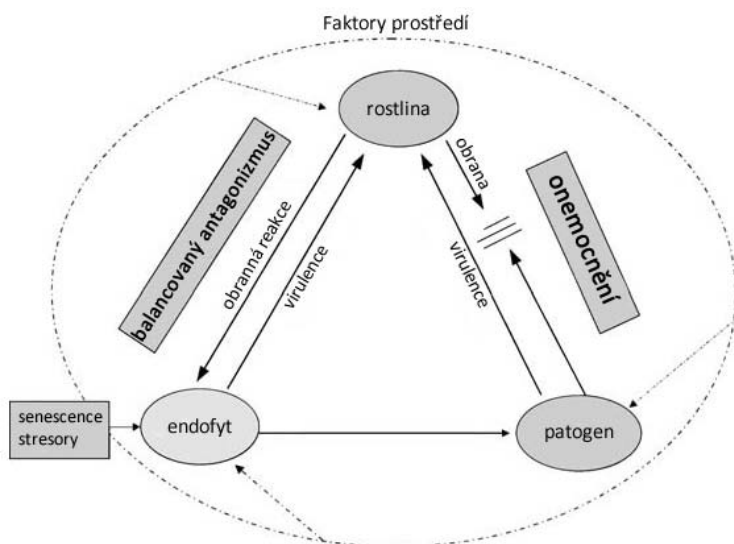
Přestože tématu endofytických hub se věnuje mnoho prací, poměrně málo z nich se zabývá srovnáním endofytických hub z různých částí rostlin či rozdílných vnitřních i vnějších faktorů, které ovlivňují kolonizaci těchto rostlinných částí. Jen několik studií se pak zabývá kompletním srovnáním endofytických hub napříč celou rostlinou (Blodget & al. 2000, dos Santos & al. 2003, Kharwar & al. 2008).

Cílem této práce je shrnutí poznatků o kolonizaci různých rostlinných částí endofytickými houbami. Zaměřila jsem se především na faktory, které kolonizaci ovlivňují, na druhovou diverzitu endofytických hub a na jejich ekologické adaptace pro život v daném prostředí.

V praktické části jsem se věnovala srovnání endofytických hub z dřevních částí (kořen, kmen, větev) jilmu vazu (*Ulmus laevis*), který z tohoto pohledu patří mezi nejméně prozkoumané temperátní dřeviny. Cílem praktické části bylo především naučit se používanou metodiku práce, tedy odběr vzorků v terénu, kultivaci, determinaci i interpretaci získaných předběžných výsledků.

Endofytické houby

Přesnější vymezení endofytických hub přináší určitá úskalí – nejedná se o konkrétní taxonomickou skupinu ani o definovaný typ soužití organismů. Přestože se interakce mezi hostitelskou rostlinou a endofytickou houbou může na první pohled jevit jako neutrální, jde spíše o balancovaný stav antagonistických vlivů: virulence endofyta a obrannou reakci



Obr. 1. Schéma balancovaného antagonismu mezi virulencí endofytické houby a obrannou reakcí hostitelské rostliny. Schulz & Boyle 2005.

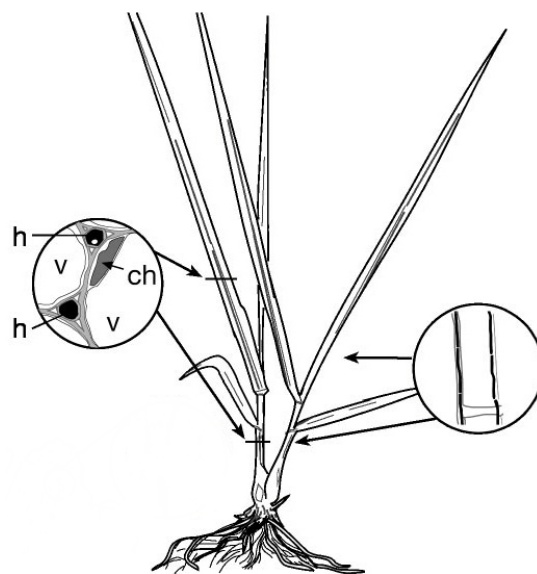
rostliny. Mnoho endofytických hub má schopnost syntetizovat při kontaktu s hostitelskou rostlinou fyto toxické metabolity, stejně tak byla pozorována biochemická obranná reakce rostliny proti endofytické houbě, totožná s reakcí na patogenní houbu. Avšak virulence houby i obranná reakce rostliny je ovlivňovaná působením vlivů vnějšího prostředí, které mohou tento balancovaný antagonismus

vychýlit ve prospěch jednoho z organismů a změnit tak podstatu interakce (Obr. 1). Označení houby přívlastkem „endofytická“ je tedy vyjádřením pouze současného stavu interakce, nikoliv jednotné životní strategie. Ty se mohou pohybovat v rámci jakéhosi kontinua mezi mutualizmem a parazitizmem. Životní strategie se mohou lišit nejen mezi jednotlivými druhy hub, ale i mezi různými kmeny stejného druhu. Hranice mezi těmito životními strategiemi tedy může být velice tenká: rozdíl mezi patogenem a mutualistickým endofytem může být způsoben i změnou jediného genu, například u fytopatogenní houby *Colletotrichum magna* byl takovouto mutací získán kmen, který asymptomaticky osidloval hostitelskou rostlinu a zabraňoval infekci původním nemutovaným kmenem a dalšími patogenními houbami (Freeman & Rodriguez 1993; Redman & al. 1999).

Endofytické houby můžeme podle ekologických charakteristik rozdělit na dvě základní skupiny. První z nich jsou systémoví endofyti travin, druhou potom nesystémoví endofyti, kteří kolonizují široké spektrum hostitelských rostlin.

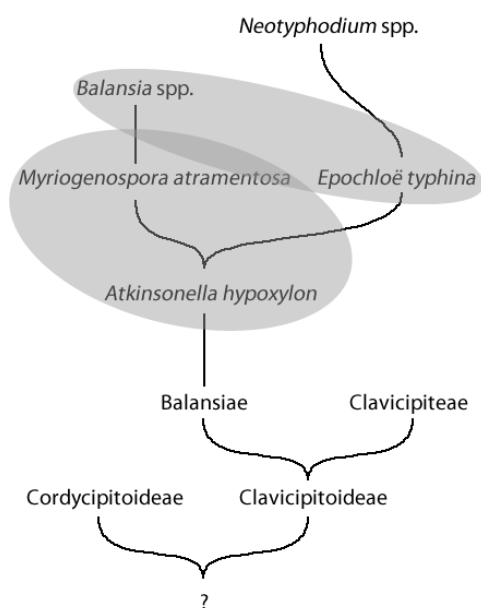
Systemoví endofyti travin

Specifickou formu endofytizmu představují houby z čeledi Clavicipitaceae, které tvoří symbiózu s rostlinami z čeledi Poaceae. Tato skupina zahrnuje rody *Epichloë* a *Balansia* a anamorfní rod *Neotyphodium* (dříve *Acremonium*). V tomto případě je infekce převážně intercelulární (Obr. 2) a jediná houba systémově kolonizuje všechny nadzemní orgány hostitelské traviny kromě tyčinek a její hyfy nikdy neprorůstají do kořenů (Stone & al. 2004, Schardl & al. 2004).



Obr. 2. Intercelulární růst endofytické houby uvnitř hostitelské traviny, Příčný a podélný řez stonkem či listem. Hyfy (h), chloroplast (ch) a vakuoly (v). Upraveno podle Schardl & al. 2004.

Systemové endofytické houby se mohou šířit horizontálním přenosem – infekcí dalších rostlin za pomoci konidií a askospor, tvořených v periteciích uvnitř stromatu (*Epichloë* a *Balansia*), nebo vertikálním přenosem – kolonizací semen hostitele (*Neotyphodium*) (Stone & al. 2004). Evolučním trendem této skupiny endofytických hub je ústup od horizontálního přenosu, spojeného se sexuální reprodukci a tvorbou stromatu (která vede k poškození



Obr. 3. Schéma fylogeneze čeledi Clavicipitaceae. Upraveno podle Bacon & Hill 1996.

hostitelské rostliny) a preference nepohlavních stádií, které se šíří výhradně vertikálním přenosem (Obr. 3). Houby *Atkinsonella hypoxylon* a *Myriogenospora atramentosa* rostou epifyticky a tvorbou stromatu většinou hostitelskou rostlinu vážně poškodí. Zástupci rodů *Epichloë* a *Balansia* jsou již schopni růst částečně endofyticky. Tvoří stroma, které však již hostitelskou rostlinu tolik nepoškozuje. Houby z rodu *Epichloë* se mohou rozmnožovat i vertikálním přenosem. U zástupců rodu *Neotyphodium* pak epifytická i pohlavní část životního cyklu zcela chybí (White & Morgan-Jones 1996, Bacon & Hill 1996, Müller & Krauss 2005,

Schardl & al. 2004). Díky této úzké vazbě na hostitele a šíření závislém na jeho reprodukční úspěšnosti se u těchto hub můžeme setkat s častějším výskytem mutualizmu než u ostatních endofytických druhů. Nejsou ovšem striktně mutualistické, jak se dříve předpokládalo, některé mohou naopak snižovat fitness hostitele – vztah mezi endofytickou houbou a travinou je tedy spíše kontinuum mezi mutualizmem a parazitizmem a je pravděpodobně mnohem komplexnější. Velký vliv zde hrají abiotické faktory prostředí, interakce s jinými organismy i interakce genotypů konkrétních hub a travin (Müller & Krauss 2005). Jako příklad může posloužit produkce alkaloidů houbou, které rostlina využívá jako obranu proti okusu herbivory. U druhu *Epochloë typhina* byla prokázána produkce sekundárních metabolitů toxických pro dobytek (Bacon & al. 1977). Produkce toxických metabolitů může být ovlivněna prostředím: zvyšuje se při pravidelném kosení, které simuluje okus. Někteří herbivoři ale mohou naopak použít alkaloidy produkované endofytickou houbou na svou vlastní obranu. A důležitou roli hraje i genotyp endofyta, různé kmeny stejného druhu houby mohou produkovat odlišné alkaloidy (Müller & Krauss 2005).

Nesystémoví endofyti

Nesystémové endofytické houby nekolonizují pouze traviny, ale i ostatní cévnaté rostliny, mechy, játrovky či stélky zelených řas, hnědých řas i ruduch (Higgins & al. 2007, Schulz & al. 2002). Šíří se převážně horizontálním přenosem, semena bývají kolonizovaná zřídka nebo vůbec (Blodgett & al. 2000). Hyfy endofytické houby mohou růst intercelulárně i intracelulárně a kolonizace bývá spíše lokalizovaná do menších úseků – v jedné rostlině tak můžeme nalézt velmi široké spektrum různých druhů hub, které tvoří heterogenní skupinu jak z hlediska taxonomické příslušnosti, tak z hlediska životních strategií a adaptací.

Variabilita adaptací je v případě těchto hub větší než u systémových endofytů travin, protože horizontální šíření endofyta není tak výrazně závislé na fitness hostitelské rostliny (Saikkonen & al. 1998). Může se jednat o saprotrfní houby, které asymptomatickým osídlením rostliny získávají po jejím odumření kompetiční náskok před ostatními saprotrfními organizmy z opadu. Dále to mohou být patogenní houby v latentní části životního cyklu, které se začnou projevovat až po vnějším poškození rostliny, nebo působením abiotického stresu. Popsány byly i mutualistické adaptace, například produkce sekundárních metabolitů, které zabraňují infekci bakteriemi či patogenními houbami (Schulz & al. 2002) nebo okusu herbivorním hmyzem (Azevedo & al. 2000).

Většina těchto endofytů náleží do různých řádů oddělení Ascomycota, menší část potom do oddělení Basidiomycota či Zygomycota. V izolacích se většinou objevuje větší množství ubikvitně rozšířených endofytů, kteří se často hojně vyskytují i v různých klimatických oblastech (např. rody *Fusarium*, *Phomopsis* či *Phoma*) a jeden či více dominujících druhů hub adaptovaných na konkrétního hostitele či skupinu blízce příbuzných druhů (Tab. 1) (Blodgett & al. 2000, Saikkonen 2007, Schulz & Boyle 2005). Druhy adaptované na konkrétního hostitele se s menší frekvencí mohou objevovat i u jiných rostlin, pokud rostou v těsné blízkosti původního hostitele (Kowalski & Kehr 1992). Proto někteří autoři používají spíše termín „hostitelská preference“. Hostitelské rostliny, vysazené mimo jejich přirozené stanoviště, obsahují méně hostitelsky specifických druhů hub, než rostliny v přirozeném prostředí (Fisher & al. 1994). O mechanismech hostitelské specifity pak pojednává šířeji bakalářská práce Celie Korittové (Korittová 2008).

Na úrovni jednotlivých rostlin lze pak pozorovat specializaci některých endofytických hub i na konkrétní orgány či pletiva hostitelské rostliny (Schulz & Boyle 2005). Ze studií mapujících výskyt endofytických hub v různých částech rostlin vyplývá, že kolonizaci houbami limituje vnitřní i vnější prostředí konkrétního pletiva. Vnitřní prostředí ovlivňuje především rychlost a rozsah kolonizace, například listy mají díky relativně snadné dostupnosti živin pro houby vyšší frekvence kolonizace oproti jiným rostlinným orgánům (Arnold 2007, Blodgett & al. 2000). Díky odlišným podmínkám vnějšího prostředí pak nastává zásadní rozdíl mezi nadzemními a podzemními částmi rostlin. Nadzemní orgány jsou kolonizovány sporami hub původem z atmosféry a druhové složení endofytů žijících v rostlinách z různých lokalit se příliš neliší.

Kořeny naopak vykazují značné rozdíly v diverzitě endofytických hub v závislosti na charakteristikách půdy (Blodgett & al. 2000, Wirsal & al. 2001).

dřevina	hostitelsky specifické druhy endofytických hub
<i>Abies alba</i>	<i>Durandiella gallica, Grovesiella abieticola</i>
<i>Acer pseudoplatanus</i>	<i>Diplodina acerina, Myxosporium carneum, Pezicula acericola, Splanchnonema pupula, Petrakia irregularis</i>
<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Cryptospora suffusa, Melanconis thelebola, Tympanis alnea</i>
<i>Betula pendula</i>	<i>Cryptospora betulae, Melanconis stilbostoma, Trimmatostroma betulinum</i>
<i>Carpinus betulus</i>	<i>Diaporthe carpini, Melanconiella spodiaea</i>
<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Asterosporium asterospermum, Fusicoccum macrosporum, Neohendersonia kickxii</i>
<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Coniothyrium fraxini</i>
<i>Larix decidua</i>	<i>Sirodothis sp.</i>
<i>Picea abies</i>	<i>Tryblidiopsis pinastri</i>
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Crumenolopsis pinicola, Therrya spp.</i>
<i>Quercus robur</i>	<i>Amphiporthe leiphaemia, Colpoma quercinum, Pseudovalsa longipes</i>

Tab. 1. Hostitelsky specifické endofytické houby izolované z větví temperátních dřevin. Kowalski & Kehr

Endofytické houby v nadzemních orgánech rostlin

Kolonizace nadzemních rostlinných pletiv endofytickými houbami je primárně lokální. Pokud je intracelulární, bývá infikovaná pouze jediná buňka. Může být také intercelulární, ale i v tom případě je omezená pouze na malou oblast (Schulz & Boyle 2005).

Spory endofytů kolonizujících nadzemní pletiva se šíří převážně vzdušnými proudy, případně vodními srážkami (Juniper 1991; Lodge & al. 1996; Wilson & Carroll 1994) a infikují rostlinu buď skrze otevřené průduchy, nebo dokážou proniknout přímo do pokožkové buňky narušením buněčné stěny (Schulz & Boyle 2005).

Různé nadzemní orgány rostlin se mohou lišit druhovou diverzitou endofytických hub i denzitou kolonizace endofyty. Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnými vlastnostmi pletiv nebo odlišným mikroklimatem panujícím v různých částech rostlin, jak bude vysvětleno v následujících kapitolách.

Endofytické houby v listech

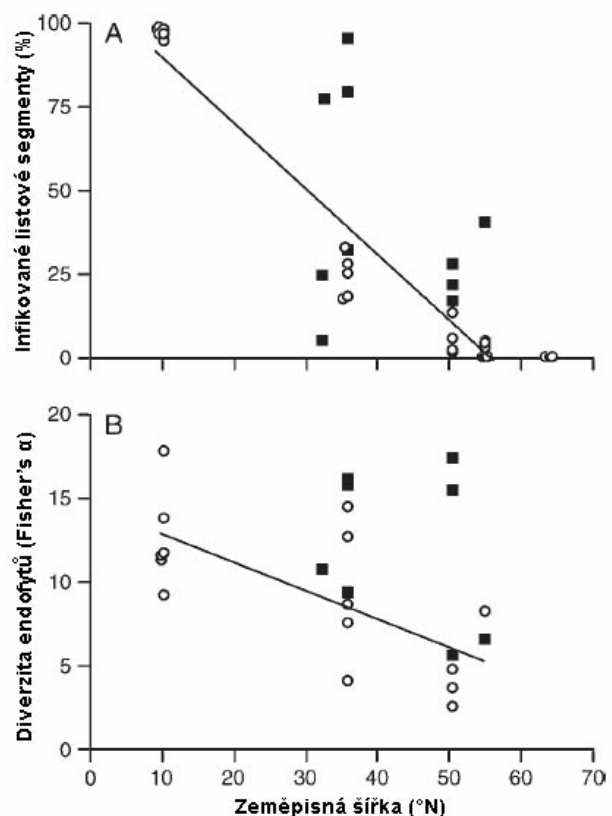
Endofytické houby žijící v listech se významně liší od hub obývajících jiné rostlinné části. Příčinou je především obrovská nestálost listu jakožto životního prostředí – v závislosti na růstu listu a jeho stáří se významně mění genová exprese a tudíž i jeho biochemické vlastnosti. Navíc musí být houby adaptované na kolonizaci listu, což obnáší odolnost spor proti vysychání, UV záření a nedostatku živin na povrchu listu a také možnost šíření větrem či deštěm (Juniper 1991). Převážná většina endofytických hub totiž pochází z horizontální kolonizace, jak dokazují výsledky srovnání endofytických hub z jehlic a semen borovice pohorské (*Pinus monticola*). Oproti jehlicím obsahovala semena pouze několik málo druhů a z listových endofytů se zde vyskytovaly pouze méně běžné druhy. Houby dominující v jehlicích nebyly ze semen vůbec izolovány (Ganley & Newcomb 2006). Z toho mimo jiné vyplývá, že míra kolonizace listu endofytickými houbami se zvyšuje současně se stářím listu – z listů dřevin odebraných na jaře vyrůstá v kultuře méně hub než z listů odebraných na podzim (Unterseher & al. 2007). Na to je třeba brát ohled zejména při srovnávacích studiích listových endofytů (Arnold 2007).

Co se týče životních strategií listových endofytů, nejsou většinou tak dobře prozkoumané, protože situaci zde komplikuje krátkověkost substrátu. Mezi popsányými interakcemi s hostitelskou rostlinou můžeme najít mutualistické: některé endofytické houby

mohou zabraňovat napadení rostliny hmyzem, například *Meria parkeri* (anamorfa druhu *Rhabdocline parkeri*) infikuje vyvíjející se larvy hálkotvorného hmyzu rodu *Contarinia* a způsobuje jejich úhyn (Carroll 1988). Mezi listové endofyty mohou patřit také ubikvitní houby s širokým geografickým rozšířením a nízkou hostitelskou specifitou, například *Cladosporium cladosporioides* či *Alternaria alternata*. Studie cypřišovitých rostlin (Hoffman & Arnold 2008) ukázala, že největší zastoupení měly tyto houby v listech rostlin ze Sonorské pouště v Arizoně. Autorky se domnívají, že tyto ubikvitní houby za nepříznivých podmínek využívají endofytickou kolonizaci různých hostitelských rostlin jako prostředek ke zmírnění abiotického stresu.

V rámci listu můžeme rozlišit další mikrohabitaty – významně se od sebe liší houbová společenstva listové čepele a řapíku. Podle výzkumu provedeném na tropické dřevině *Manilkara bidentata* se společenstva hub téměř nelišila druhovým složením, ale výrazně odlišné byly frekvence výskytu jednotlivých druhů. Například houby z rodu *Xylaria* se běžně vyskytovaly v listových čepelích, zatímco v řapících pouze vzácně nebo vůbec (Lodge & al. 1996). Rozložení hub uvnitř listu může ukazovat na různé strategie šíření endofytů: u hub izolovaných pouze z řapíků se dá předpokládat, že se na list mohou z dřevních pletiv větve, naopak houby vyskytující se pouze v listových čepelích se pravděpodobně šíří za pomoci větru či deště. Také zde ale může hrát roli různá enzymatická výbava jednotlivých druhů hub: endofyti z řapíků jehličnanů rozkládají celulózu a hemicelulózu, což houby z čepelí jehlic většinou nedokážou (Carroll & Petrini 1983).

Při pohledu na listové endofyty z širšího geografického měřítka bylo zjištěno několik zajímavých fenoménů.

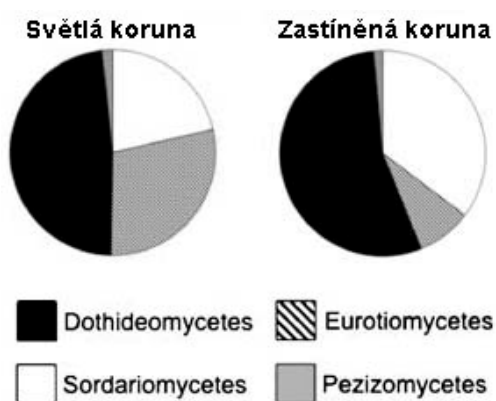


Obr. 4. Parametry endofytické kolonizace v závislosti na zeměpisné šířce. Plnými čtverci jsou označeny jehličnany, kroužky pak ostatní rostliny. Arnold & Lutzoni 2007.

Stupeň kolonizace zkoumaných listových segmentů postupně klesá s rostoucí zeměpisnou šířkou, od více než 99% v tropickém deštném lese až po méně než 1% v arktické tundře (Obr. 4A). Stejně tak klesá i diverzita izolovaných endofytických hub (Obr. 4B). Dále se měnily parametry hostitelské specifity: tropické endofytické houby kolonizují velké množství nepříbuzných rostlinných druhů, zatímco endofyti ze severnějších boreálních oblastí jsou spíše specializovaní na konkrétního hostitele. Co se týče taxonomického hlediska, se stoupající zeměpisnou šířkou se rozšiřuje spektrum zastoupených tříd askomycetů (Arnold & Lutzoni 2007).

V uvedené studii bylo prokázáno, že více než 75 % endofytických hub izolovaných z listů spadá do tříd Dothideomycetes a Sordariomycetes a jejich poměr se mění se zeměpisnou šířkou. V tropických lesích výrazně dominují houby z třídy Sordariomycetes, ale v temperátních oblastech se poměr téměř vyrovnává a v boreálních lesích převažují zástupci třídy Dothideomycetes (Arnold & Lutzoni 2007).

Poměry izolovaných skupin hub se mohou lišit i mezi listy z různých částí koruny. Ve spodních zastíněných partiích koruny významně dominují třídy Dothideomycetes a Sordariomycetes. Ve vyšších patrech s lepší přístupností světla se jejich zastoupení snižuje a přibývá hub z třídy Eurotiomycetes (Obr. 5). Toto rozložení může být způsobeno různou



Obr. 5. Rozdíly v zastoupení jednotlivých skupin hub ve světlých a zastíněných korunách dřevin *Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur* a *Tilia cordata*. Unterseher & al. 2007.

koruny značně kolísat a dosahovat až 40-45°C, zatímco podmínky ve stinných částech jsou relativně stálé (Unterseher & al. 2007). V těchto partiích koruny se stálejším prostředím byla také zjištěna vyšší diverzita endofytických hub, což by odpovídalo výsledkům z předchozí zmíněné studie, kde byla nejvyšší diverzita hub popsána v tropických lesích (Arnold & Lutzoni 2007).

Endofytické houby v listech rostlin jsou zkoumány ve velkém množství prací a v širokém

geografickém rozmezí, pravděpodobně díky relativně snadné metodice zpracování u bylin i dřevin (na rozdíl od kořenů či dřevních částí rostlin). Rody endofytických hub, které jsou běžně izolované z listů dřevin, shrnuli Stone & al. (2004) (Tab. 2).

řád	zjištěné rody endofytických hub
Leotiales	<i>Pezicula, Cryptosporiopsis, Phlytoma, Chloroscypha Sirodothis, Gremmeniella, Brunchorstia, Phragmopycnis, Rhabdocline</i>
Dothidiales	<i>Hormonema, Stagonospora, Phyllosticta</i>
Pleosporales	<i>Pleospora, Alternaria, Curvularia, Sporormia, Sporormiella, Stemphyllium</i>
Diaporthales	<i>Diaporthe, Phomopsis, Apiognomonina, Discula, Cytospora, Gnomonia, Ophiognomonina</i>
Diatrypales	<i>Libertella, Diatrypella, Diatrype, Eutypa</i>
Rhytismatales	<i>Ceuthospora, Lophodermium, Tryblidiopsis, Cyclaneusma</i>
Xylariales	<i>Coniochaeta, Hypoxylon, Biscogniauxia, Camillea, Genucosporium, Nodulisporium, Virgariella, Periconiella, Xylaria</i>
Sordariales	<i>Chaetomium, Sordaria, Gelasinospora</i>
Hypocreales	<i>Clonostachys, Cyllindrocarpon, Dendrodochium, Fusarium, Gibberella, Gliocladium, Nectria, Trichoderma, Stilbella, Volutella</i>
Amphisphaeriales	<i>Pestalotiopsis, Seiridium, Pestalotia, Seimatosporium</i>
Polystigmatales	<i>Glomerella, Colletotrichum</i>
Incertae sedis	<i>Phialocephala, Cryptocline, Gelatinosporium, Acremonium, Idriella, Foestoma, Kabatina, Sirococcus</i>

Tab. 2. Rody endofytických hub nejčastěji izolované z listů dřevin. Stone & al. 2004.

Endofytické houby v dřevních pletivech rostlin

Dřevní pletiva jsou značně odlišná od jiných rostlinných pletiv a z ekologického hlediska představují naprostý opak listů. Zaručují dlouhodobou stabilitu prostředí, protože se jedná o extrémně dlouhověká pletiva, kde nedochází k tak častým a významným biochemickým změnám, a zároveň více chráněná před vnějšími vlivy, včetně okusu býložravců (Arnold 2007).

Přestože dřevní části rostlin byly a stále jsou (i přes náročnější metodiku získávání vzorků a následného zpracování) poměrně často studovány, jen málo studií rozděluje dřevní pletiva na dřevo, borku a živá pletiva zelené kůry a lýka, přestože parametry endofytické kolonizace se v těchto pletivech liší.

Endofytické houby ve dřevě

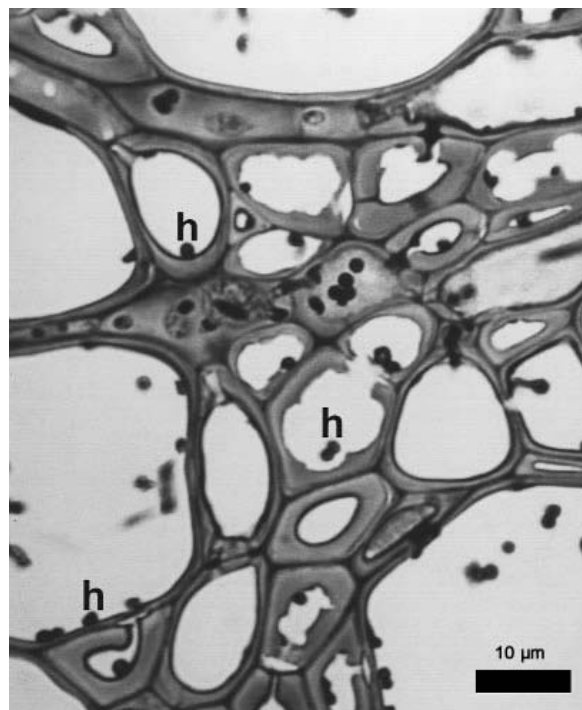
Kolonizace dřeva endofytickými houbami se výrazně liší od kolonizace všech ostatních nedřevních rostlinných pletiv. Odlišná je především velice nízká míra kolonizace – přestože

zkoumané segmenty dřeva mají většinou větší objem než například ty z listových pletiv, počet kolonizovaných segmentů se může pohybovat i okolo pouhých 5 % (Oses & al. 2008).

Další výraznou odlišností je druhové spektrum endofytických hub. Zatímco v ostatních pletivech jednoznačně dominují askomycety a basidiomycety se vyskytují jen okrajově, ve dřevě patří mezi druhy s nejvyšší frekvencí izolace a počtem izolovaných druhů mohou předstihnout askomycety (Baum & al. 2003, Oses & al. 2008). Často izolovaným zástupcem basidiomycetů je například rod *Coniophora*. Co se týče askomycetů, mezi časté kolonizátory dřeva patří zástupci čeledi Xylariaceae, konkrétně rody *Xylaria* a *Hypoxylon* (Stone & al. 2004).

Mezi jehličnany a listnáči můžeme najít rozdíly v míře kolonizace dřeva, způsobené pravděpodobně odlišnou anatomí. Procento zkoumaných segmentů dřeva, kolonizovaných endofyty, může být u listnatých dřevin až dvakrát vyšší než u jehličnanů (Kowalski & Kehr 1992, Oses & al. 2008).

Přestože jde o taxonomicky různorodou skupinu, předpokládá se, že z hlediska ekologie jde převážně o saprotrofní houby s latentní endofytickou částí životního cyklu. Tuto hypotézu podporuje například studie endofytických hub z chilských dřevin, které byly testované na enzymatickou aktivitu. U endofytických basidiomycetů z řádu Aphyllophorales byla prokázána schopnost produkce fenoloxidázy rozkládající lignin a celulózy, což by je řadilo mezi houby bílé hniloby. Zbývající basidiomycety, zařazené do rodu *Rhizoctonia*, produkovaly celulózu a enzymy schopné redukovat železo, což jsou znaky hub hnědé hniloby (Oses & al. 2006). Srovnání ultrastruktury vzorků ihned po odebrání a následně po několika týdnech inkubace také ukazuje na schopnost endofytických hub přejít do saprotrofní fáze.



Obr. 6. Degradace dřeva: průřez vzorkem z kmene po 16 týdnech inkubace, hyfy (h) porůstající buněčnou stěnu. Baum & al. 2003.

Vzorky z čerstvého dřeva nevykazovaly žádné známky degradace, zatímco u inkubovaných vzorků se proces rozkladu projevil ztenčením a rozpadem buněčných stěn hostitele v místech kolonizovaných houbami (Obr. 6) (Baum & al. 2003, Osés & al. 2008).

Vstupní branou infekce dřevních endofytů jsou poranění a ztenčeniny peridermu nebo jizvy po opadu listů. Po proniknutí do dřeva pak houba tvoří intracelulární mycelium omezené na jedinou buňku, které přejde do dormantní fáze a postupným přirůstáním dřeva v okrajových vrstvách větve či kmene se dostává do vnitřních vrstev dřeva (Baum & al. 2003).

Mechanismus udržování latence není zatím úplně známý, ale u některých druhů může souviset se saturací hostitelské rostliny vodou. Vysoký obsah vody v pletivu udržuje endofyta v latentní fázi a zabraňuje invazi a rozsáhlejší kolonizaci, ale při abiotickém stresu, poranění nebo smrti hostitele dochází k poklesu obsahu vody a následnému nastartování aktivní fáze mycelia. To podporují výsledky studií, kde byly pro vyvolání růstu endofytických hub z větví a kmenů použity různé režimy vysychání substrátu (Chapela 1989). Latentní fáze životního cyklu dává endofytickým houbám výhodu v časných stádiích rozkladu dřeva, kdy mohou mnohem dříve než jiné saprotrofní houby (které kolonizují substrát až po jeho odumření) prorůst do trachejí hostitele a těmi se rychle rozšířit i na velké vzdálenosti (Baum & al. 2003).

Endofytické houby v peridermu a lýku dřevin

Druhotnou kůru (periderm) dřevin můžeme rozdělit do několika morfologicky i funkčně odlišných vrstev, které se liší i endofytickou kolonizací. Vnější část (borka) je tvořena odumřelými korkovými buňkami s buněčnou stěnou impregnovanou suberinem, které jsou vyplněny vzduchem, tříslovinami, pryskyřicemi a dalšími chemickými látkami. Pod borkou již nacházíme živá pletiva: felogen a feloderm. Feloderm (zelená kůra) je parenchymatické pletivo obsahující chloroplasty. Felogen je tenká vrstva dělících se buněk, která produkuje směrem dovnitř feloderm a směrem vně korkové buňky (kfrserver.natur.cuni.cz/anatomiez).

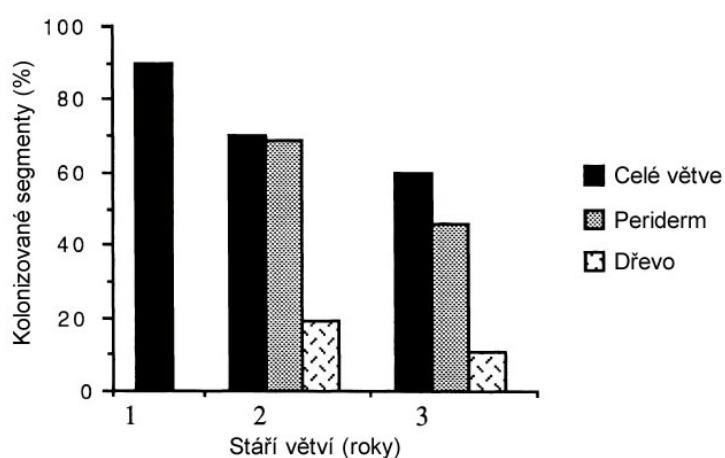
Studie endofytických hub většinou rozlišují dvě základné vrstvy: borku tvořenou odumřelými korkovými buňkami a živá pletiva zelené kůry a lýka. Tyto dvě vrstvy se zásadně liší mírou kolonizace endofytickými houbami. Výsledky studie bazálních částí větví temperátních dřevin ukazují, že borková vrstva byla kolonizovaná endofyty u 98 % větví a frekvence kolonizace byla téměř stejná u jehličnanů i listnáčů. Oproti tomu živá pletiva byla kolonizovaná jen u 20 % větví a frekvence kolonizace jehličnanů byla dvakrát vyšší než u

listnáčů. Rozdíly je možné nalézt i v rámci jednotlivých druhů dřevin, například borka buku lesního (*Fagus sylvatica*) byla endofyty osídlena výrazně méně než borka ostatních zkoumaných dřevin a zelená kůra smrku ztepilého (*Picea abies*) zase výrazně častěji (Kowalski & Kehr 1992).

Mezi endofyty izolovanými z peridermu jilmu se často vyskytují houby z rodu *Phomopsis*. Morfologicky stejné kmeny byly izolovány i z peridermu dalších listnatých dřevin (*Fraxinus excelsior*, *Acer pseudoplatanus* a *Fagus sylvatica*) (Brayford 1990).

Endofytické houby v kmenech a větvích dřevin

Vnitřní prostor koruny stromů se může lišit mikroklimatickými podmínkami, jak mezi jednotlivými stromy, tak i uvnitř konkrétní koruny. Mikroklima pak může hrát roli v osídlení větví endofytickými houbami. Studie větví buku lesního (*Fagus sylvatica*) ukázala, že druh rodu *Aposphaeria* se častěji vyskytoval ve větvích odebraných ze stromů s řidší korunou více prostupnou pro světlo. U ostatních hub izolovaných v této studii se podobná závislost neprokázala (Danti & al. 2002). Autoři se také domnívají, že rozdílné podmínky uvnitř koruny mohou ovlivňovat biodiverzitu endofytických hub. Vyvozují to ze srovnání vlastních výsledků studia periferních větví s metodicky podobnou studií, kterou provedli Kowalski a Kehr na bázích větví blízko kmene, kde je vyšší vlhkost a stabilnější podmínky pro růst hub než v periferních částech koruny (Kowalski & Kehr 1996). Autoři této studie izolovali z bazálních částí větví 67 druhů endofytických hub (Kowalski & Kehr 1996), zatímco z periferních větví bylo izolováno pouze 44 druhů hub (Danti & al. 2002).



Obr. 7. Frekvence kolonizace různě starých větví. U velmi mladých větví nebylo možné oddělit jednotlivé druhy pletiva. Wilson & Carroll 1994.

Parametry kolonizace endofyty může také ovlivňovat průměr, respektive věk větví. Bylo prokázáno, že větve temperátních dřevin tenčí než 2 cm obsahují vyšší počet druhů endofytických hub než větve s větším průměrem. V různě starých větvích se liší i spektrum nejčtenějších druhů, což ukazuje na specifické adaptace

endofytů. Z tenkých větví byly nejčastěji izolovány druhy *Diaporthe carpini*, *Mollisia cinerea*, *Sclerophoma pithyophila*, *Colpoma quercinum* a několik druhů rodu *Phomopsis*. Druhy *Petrakia irregularis*, *Pezicula cinnamomea* a *Neohendersonia kickxii* nejčastěji kolonizují větve s průměrem 1-2 cm. U druhů *Sirodothis* spp., *Asterosporium asterospermum* a *Fusicoccum macrosporum* se četnost výskytu zvyšuje spolu s průměrem větve (Kowalski & Kehr 1992). Podobný trend prokázaly i další studie. Ve větvích dubu garryova (*Quercus garryana*) míra infekce endofytickými houbami postupně klesala s věkem zkoumaných větví a to jak v peridermu, tak ve dřevě (Obr. 7) (Wilson & Carroll 1994). Studie endofytů ve dřevě buku lesního (*Fagus sylvatica*) prokázala, že endofyty jsou nejvíce kolonizované tenké větve (400 izolátů), za nimi následují tlustší větve (321 izolátů) a nejméně kolonizované jsou kmeny (236 izolátů). Ukazují se zde i různé preference basidiomycetů: druh *Coniophora puteana* byl izolován pouze z větví (tenčích i tlustších), zatímco druh *Fomes fomentarius* dával přednost kmenům (kde také po odumření dřeva vyrůstají jeho plodnice), ale rostl i v tlustších větvích. Autoři navrhují, že preference větví či kmenů různého průměru může být způsobena odlišnou tolerancí nedostatku kyslíku, k němuž může dojít v centru tlustých větví a kmenů. U druhu *Coniophora puteana* je známá nízká tolerance anoxických podmínek, ale pro druh *Fomes fomentarius* podobná data zatím neexistují (Baum & al. 2003).

Endofytické houby rostoucí v mladých větvích mohou být také zdrojem pro budoucí kolonizaci listů, například druh *Discula umbrinella* je schopen prorůstat z mladších větví buku lesního (*Fagus sylvatica*) do pupenů, které se na nich vyvíjejí. V rozvinutých listech ale opět ubývá (Toti & al. 1993).

Endofytické houby z větví dřevin byly často zkoumány i v začátcích studia endofytizmu, tyto prvotní práce se zaměřovaly především na zmapování druhové diverzity endofytů (z autorů například Carroll, Chapela, Fisher, Kowalski, Petrini, Sieber). Rody endofytických hub běžně izolovaných z větví dřevin shrnuli Stone & al. (Tab. 3). Větve jilmů se studovaly také, převládají v nich houby z rodu *Phomopsis* a *Coniothyrium fuckelii* (Brayford 1990, Tomita 2003). Kmeny dřevin nebyly zkoumány v takové míře jako větve, protože jejich zkoumání je metodicky náročnější: vyžaduje použití speciálních nástrojů i fyzické síly a v neposlední řadě zasahuje hlouběji do dřeva, je zde tedy potřeba i pečlivého ošetření místa odběru.

řád	zjištěné rody endofytických hub
Leotiales	<i>Mollisia, Pezicula, Cryptosporiopsis, Tympanis, Sirodonthis, Durandiella, Godronia, Brunchorstia, Xylogramma Cystotricha, Phleosporella</i>
Dothidiales	<i>Sphaeropsis, Hormonema, Sclerophoma, Botryosphaeria, Tripospermum, Ramularia, Cladosporium, Didymosphaeria, Diplodia</i>
Diaporthales	<i>Amphiportha, Coryneum, Diaporthe, Cytospora, Fusicoccum, Diplodina, Melanconis, Gnomonia, Phomopsis, Phragmoporth, Pseudovalsa</i>
Pleosporales	<i>Alternaria, Pleospora, Sporormia, Sporormiella</i>
Hypocreales	<i>Albonectria, Beauveria, Bionectria, Cosmospora, Cyliandrocarpon, Didymostilbe, Gliocladium, Fusarium, Haematonectria, Nectria, Trichoderma, Tubercularia</i>
Xylariales	<i>Anthostomella, Biscogniauxia, Camillea, Coniochaeta, Creosphaeria, Daldinia, Hypoxylon, Geniculisporium, Nodulisporium, Rosellinia, Rhinocladia, Periconiella, Virgariella, Xylaria</i>
Rhytismatales	<i>Colpoma, Tryblidiopsis</i>
Pezizales	<i>Chromelosporium, Oedocephalum, Verticicladium</i>
Diatrypales	<i>Libertella, Cryptosphaeria, Diatrypella</i>
Basidiomycetes	<i>Coniophora, Coprinus, Peniophora, Rhizoctonia, Sistotrema, Sporotrichum, Stereum</i>
Incertae sedis	<i>Melanconium, Coniella, Gelatinosporium, Phialocephala, Acremonium, Phialophora, Microsphaeropsis, Leptodontidium, Acrodontium, Rhinocladia, Nigrospora, Phaeococcus</i>
Mucorales	<i>Mucor, Mortieriella</i>
Amphisphaeriales	<i>Pestalotiopsis, Seiridium</i>
Sordariales	<i>Chaetomium, Podospora, Sordaria, Gelasinospora, Spadicoides</i>

Tab. 3. Rody endofytických hub nejčastěji izolované z větví dřevin. Stone & al. 2004.

Endofytické houby v kořenech

Kolonizace kořenů endofytickými houbami se významně liší od kolonizace nadzemních orgánů rostlin. Obecně může být infekce intercelulární i intracelulární a především často bývá extenzivní, na rozdíl od nadzemních orgánů rostlin, kde je infekce ve většině případů pouze lokální (Schulz & Boyle 2005).

Růst kořenů v půdě, což je prostředí značně odlišné od atmosféry, má zásadní vliv na spektrum druhů hub rostoucích uvnitř kořenů. Tento fakt dokazuje studie epifytických orchidejí rodu *Lepanthes*, jejichž kořeny na rozdíl od většiny rostlin rostou ve shodném prostředí jako listy. Tato studie ukázala, že z listů i kořenů byly shodně nejčastěji izolované druhy rodu *Xylaria* a houby podobné rodu *Rhizoctonia*. Výrazně se nelišila ani frekvence izolace zmíněných hub, což poukazuje na zásadní vliv okolního prostředí, které zajišťuje jak mikroklima, tak například zásobu diaspor hub (Bayman & al. 1997). Konkrétní vliv různého prostředí růstu na endofytické houby v kořenech ukazují Suryanarayanan a Vijaykrishna ve své studii opěrných kořenů banyánu (*Ficus benghalensis*), které rostou nejdříve na vzduchu a až poté se zanořují do půdy. Počet druhů endofytických hub v kořeni a počet segmentů, kolonizovaných konkrétním druhem, se výrazně zvýšil poté, co kořen vrostl do půdy. Předpoklad, že půda je hlavním zdrojem endofytů kolonizujících kořeny potvrzuje i kontrolní soubor kořenů, které rostly ve sterilní půdě. Z nich byl izolován pouze jeden druh (*Trichoderma* sp.) ze čtrnácti druhů rostoucích v kořenech v nesterilní půdě (Suryanarayanan & Vijaykrishna 2001).

Významným, ale málo prozkoumaným faktorem ovlivňujícím kolonizaci kořenů endofyty jsou konkrétní vlastnosti půdy. Některé endofytické houby preferují stanoviště po disturbanci s půdou chudou na humus a vystavenou působení počasí více než v zapojených porostech, například druhy *Phialocephala fortinii* či *Penicillium janthinellum*. Stanoviště v pokročilejším stádiu sukcese s dobře vyvinutým humusovým horizontem a stálejším mikroklimatem pak typicky kolonizují rody *Meliniomyces* a *Umbelopsis* (Summerbell 2005). Druhovou diverzitu endofytických hub může ovlivňovat i vlhkost půdy. Například druhy z rodů *Cylindrocarpon* a *Trichoderma* kolonizují téměř výhradně kořeny rákosu (*Phragmites australis*) rostoucí na relativně sušších stanovištích, zatímco rod *Cladosporium* preferuje rákosové kořeny ze silně zamokřených stanovišť (Wirsel & al. 2001).

Mezi kořenové endofyty patří mnoho rozdílně adaptovaných skupin hub s různým vztahem k hostitelské rostlině – může jít o latentní patogeny kořenů, saprotrofní houby rhizosféry s endofytickou částí životního cyklu nebo mutualistické symbionty. Podle definice endofytizmu v podstatě můžeme mezi endofyty kořenů počítat i mykorhizní houby, ale protože jde (na rozdíl od jiných endofytů) o charakteristickou, vysoce specializovanou symbiózu s hostitelem a o odlišné spektrum taxonů, jsou studovány odděleně (Stone & al. 2004).

Přesto není mezi houbami tvořícími mykorhizu a endofyty úplně jasná hranice. Některé skupiny hub mohou některé hostitelské rostliny kolonizovat endofyticky a s jinými tvořit mykorhizu. Například houby z řádu Sebaciales tvoří ektomykorhizu, erikoidní a orchideoidní mykorhizu (s autotrofními i heterotrofními orchidejemi) a zároveň jsou schopné žít endofyticky uvnitř dalších druhů rostlin, ale pouze v kořenech. Tato schopnost kořenového endofytizmu je pravděpodobně pleziomorfním znakem celého řádu, protože se vyskytuje napříč celým jeho fylogenetickým stromem (Selosse & al. 2009).

Mutualistické endofytické houby mohou zvyšovat odolnost rostlin vůči abiotickému stresu. Například druh *Piriformospora indica* zvyšuje u kolonizovaných rostlin ječmene odolnost vůči soli v půdě, pravděpodobně díky produkci antioxidantů. Ty likvidují reaktivní formy kyslíku (superoxidy, peroxid vodíku a hydroxylové radikály), které se v rostlinách akumulují při růstu v suchém či zasoleném prostředí (Baltruschat & al. 2008). Některé endofytické houby mají schopnost potlačovat infekci kořenovými patogeny. Ve studii kořenů čínské zelí (*Brassica chinensis*) se prokázalo, že endofyt *Heteroconium chaetospora* dokáže zabránit infekci kořenů patogenním druhem *Plasmodiophora brassicae* i u rostlinek pěstovaných v nesterilní půdě (Narisawa & al. 1998).

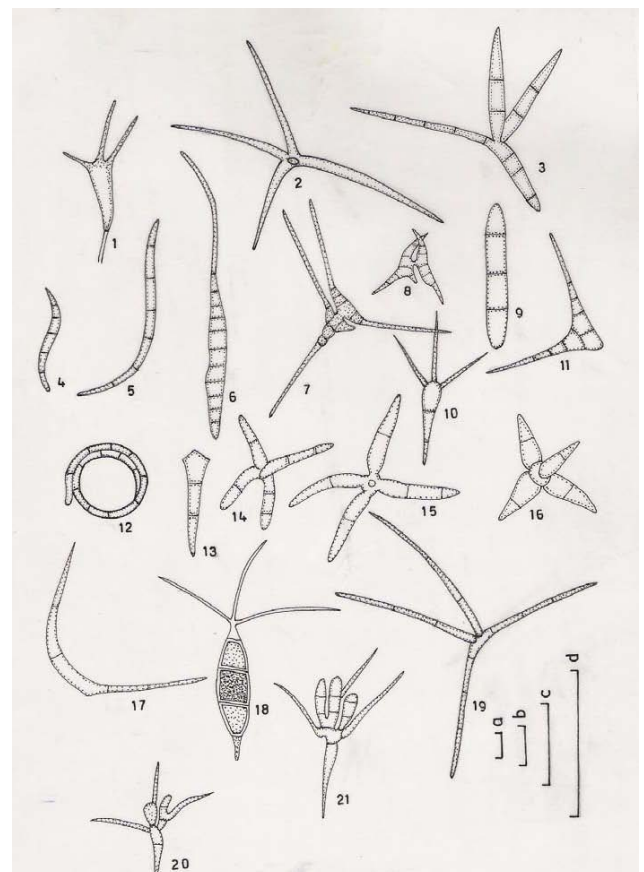
Často pozorovanými a studovanými kořenovými endofyty jsou houby s tlustostěnnými, přehrádkovanými, tmavě pigmentovanými hyfami, které zůstávají sterilní nebo sporulují až po delší době kultivace. Souhrnně se tyto houby označují jako „dark septate endophytes“ („DSE“). Častým předmětem studií se staly pravděpodobně také kvůli snadné viditelnosti jak v kultuře, tak přímo v preparátech z rostlinných pletiv. Z taxonomického hlediska je ale toto uskupení heterogenní, protože ukládání melaninu do

buněčné stěny je pouze shodnou adaptací na život v konkrétním prostředí a o fylogenezi nic nevyovídá, dokonce se může lišit i u různých izolátů stejného druhu (Addy & al. 2005).

Molekulární studie ukazují, že mezi izolovanými kmeny DSE převažuje rod *Phialocephala* (Menkis & al. 2004). Dalšími rody z této skupiny jsou pak rody *Cadophora*, *Chloridium*, *Cryptosporiopsis*, *Exophiala*, *Heteroconium*, *Leptodontidium*, *Oidiodendron*, *Phialophora*, *Scytalidium* nebo *Trichocladium* (Addy & al. 2005).

Jelikož se jedná o heterogenní skupinu hub, spektrum interakcí s hostitelskou rostlinou je také velmi pestré – od parazitizmu přes komenzálizmus až po mutualistické soužití. Některé houby z okruhu DSE zvyšují rezistenci kolonizovaných rostlin proti napadení patogenními houbami (Narisawa & al. 1998). Častěji se tyto houby vyskytují ve vyšších nadmořských výškách (Ahlich & Sieber 1996); předpokládá se, že v extrémních prostředích s vysokou mírou abiotického stresu (horské oblasti, tundra či naopak velmi suché habitaty) mohou fungovat podobně jako mykorrhizní houby, které v těchto podmínkách nejsou schopné přežít (Addy & al. 2005). Konkrétně druh *Phialocephala fortini* roste v kořenových pletivech hostitelské rostliny intercelulárně i intracelulárně a uvnitř buněk tvoří sklerocia. U některých hostitelských rostlin (zde *Pinus contorta*) může navíc tvořit spleť hyf, která se podobá Hartigově síti u ektomykorrhizních hub (O'Dell & al. 1993).

Přestože některé houby řazené mezi DSE tvoří morfologické struktury podobné mykorrhizním a byly u nich pozorovány příznivé účinky na hostitelskou rostlinu (zvýšení růstové rychlosti a příjmu minerálních živin), v některých ohledech se ale od typicky mykorrhizních hub liší a jejich role v interakci s rostlinou není zcela jasná (Jumpponen 2001).



Obr. 8. Konidie vodních hyfomycetů izolovaných z himálajských dřevin. Sati & al. 2008.

Častými endofyty především v kořenech břehových rostlin jsou i hyfomycety s konidiami adaptovanými na šíření vodou, které jsou buď spirálně stočené, nebo s dlouhými výběžky, které umožňují zachycení konidie na substrátu (Obr. 8). Mnoho druhů dřevin i bylin kolonizuje druh *Cylindrocarpon aquaticum* nebo různé druhy rodu *Tetracladium*.

Zajímavým prostředím z hlediska druhové diverzity endofytických hub jsou mangrovové porosty, které představují dynamické rozhraní několika ekosystémů. Studie endofytů z opěrných a dýchacích kořenů čtyř druhů mangrove (*Acanthus ilicifolius*, *Avicennia officinalis*, *Rhizophora mucronata* a *Sonneratia caseolaris*) ukázala, že mohou být kolonizovány půdními, sladkovodními i mořskými druhy hub. Důležitým parametrem, který v tomto prostředí ovlivňuje druhové spektrum endofytických hub a jejich izolační frekvenci, je rozsah kolísání vodní hladiny mezi přílivem a odlivem: některé druhy hub mohou být vázány na specifický rozsah kolísání hladiny (Ananda & Sridhar 2002).

Také kořeny travin mohou být kolonizovány nesystémovými endofytickými houbami, protože systémoví endofyti z čeledi Clavicipitaceae prorůstají pouze nadzemní orgány travin a v kořenech se nevyskytují. Tímto faktem se mnoho prací nezabývá, z kořenů travin však byly popsány některé druhy vodních hyfomycetů (Sati & Belwal 2005, Sati & al. 2008).

Endofytické houby kolonizující kořeny byly studovány u mnoha druhů dřevin i bylin, avšak relativně málo studií se zabývá srovnáním těchto endofytů s houbami, izolovanými z odlišných rostlinných částí (Bayman & al. 1997, Blodgett & al. 2000, Cao & al. 2002, Kharwar & al. 2008).

Závěr

Jednotlivé části rostlin se od sebe liší specifickými parametry kolonizace endofytickými houbami, například denzitou kolonizace, druhovou diverzitou kolonizujících endofytů či četností výskytu těchto druhů. Rozdíly mezi rostlinnými částmi jsou ovlivněny jednak konkrétními vlastnostmi rostlinného pletiva (dostupnost živin pro houbu, dostupnost kyslíku, doba životnosti pletiva a další), jednak vlastnostmi okolního prostředí, které limitují především spektrum druhů endofytických hub schopných kolonizovat danou rostlinnou část.

Nejvýrazněji se mezi sebou liší endofytické houby z kořenů a z nadzemních částí rostlin. Tento rozdíl je způsoben značnou odlišností vnějšího prostředí, u epifytických rostoucích orchidejí se kořeny od ostatních rostlinných orgánů liší jen minimálně (Bayman & al. 1997). Rozdíly mezi nadzemními částmi rostlin jsou pak dány především odlišností různých typů pletiv, jejichž kolonizace vyžaduje specifické adaptace endofytů, týkající se životního cyklu, enzymatické výbavy a dalších. Výrazně se odlišuje především kolonizace dřevních pletiv.

Přestože rozdíly mezi jednotlivými rostlinnými částmi jsou výrazné, jejich zkoumání a srovnávání se mnoho studií nevěnuje. Překážkami porovnávání výsledků tohoto typu prací jsou především rozdíly v použité metodice a také omezená možnost kvantifikace výsledků.

Druhové spektrum endofytických hub izolovaných z dané rostlinné části záleží především na použité metodice. Odlišné výsledky přinesla ve studii endofytických hub mangrovů kultivace na agarové půdě, ve vlhké komůrce a v bublinkové komůrce (Ananda & Sridhar 2002). Stejně tak se lišila druhová diverzita endofytických hub z kořenů dubu, izolovaných při kultivaci ve vlhké komůrce a při použití metody založené na silné povrchové sterilizaci (Novotný 2003a). Lišit se mohou i druhy hub izolované z různých agarových půd, některé půdy například potlačují rychlost růstu houbových kolonií a umožňují tak zachytit i pomalu rostoucí druhy hub (Bayman & al. 1998). Počet izolovaných druhů se kvůli různé rychlosti růstu jednotlivých hub různí i při rozdílné době inkubace (Arnold 2007). Zcela jiný pohled pak přináší metody, které nepoužívají klasickou kultivaci, například environmentální PCR. Tyto metody umožňují určit i druhy hub, které v klasické kultuře rostou velmi pomalu či vůbec (například některé bazidiomycety) a naopak ukazují, že četnost některých hub rychle

rostoucích v kultuře může být při použití klasických metod nadhodnocena (Arnold & al. 2007).

Ke kvantifikaci výsledků se nejčastěji používá určení frekvence kolonizace, která vyjadřuje procento kolonizovaných štěpinek či segmentů. Toto číslo ale do značné míry závisí na velikosti těchto segmentů (Arnold 2007). Možnost kvantifikace frekvence kolonizace i izolovaných hub také ztěžuje fakt, že z celé rostliny (či ještě markantněji dřeviny) je většinou odebráno jen několik vzorků o relativně malém objemu. S počtem odebraných vzorků stoupá také počet izolovaných druhů, protože je možné zachytit i vzácněji se vyskytující houby. Ke znázornění efektivity mapování druhové diverzity se používají saturační křivky, ale jen málo studií s nimi pracuje (Arnold & al. 2007).

Pro informativní srovnání endofytické kolonizace více rostlinných částí se jeví jako ideální práce v rámci jedné studie, za použití totožné metodiky izolace hub i kvantifikace. Takovýchto studií existuje však zatím jenom několik (Blodget & al. 2000, Santos & al. 2003, Kharwar & al. 2008). Tento typ práce tedy může přinést ještě mnoho nových informací o výskytu a ekologii endofytických hub v různých částech rostlin.

Praktická část

Úvod

Přestože endofytické houby jsou v současné době intenzivně zkoumány, jen málo studií se věnuje ucelenému zkoumání diverzity hub v celé rostlině. Proto jsem se ve své studii zabývala srovnáním endofytické kolonizace v dřevních částech jilmu vazu (*Ulmus laevis*), konkrétně srovnáním pletiv (borka a lýko, dřevo) z větví, kmene a kořenů. Jilm vaz byl pro tuto práci vybrán především proto, že z pohledu diverzity endofytických hub se jedná o jednu z nejméně prozkoumaných dřevin rostoucích v České republice.

Cíle

Praktická část mé bakalářské práce byla koncipovaná jako pilotní studie pro budoucí potřeby diplomové práce. Jejím hlavním cílem bylo především osvojení si používané metodiky (kultivace živého materiálu, příprava agarových médií, práce s mikroskopickou technikou, determinace atd.) a její případná optimalizace (průběh povrchové sterilizace vzorků, používaná média). Mezi další cíle práce patří získání předběžných výsledků, které budou použity při zpracování diplomové práce, a také zkušeností s jejich interpretací. Získané výsledky by měly odpovědět na otázku, zda a jak se liší endofytická kolonizace v jednotlivých dřevních částech jilmu. V neposlední řadě bude tato pilotní studie využita k navržení postupu výzkumu pro diplomovou práci, především k vytvoření časového rozvrhu a určení počtu vzorků, který lze v dané době zpracovat a který poskytuje dostatečné podklady pro srovnání.

Získaná data také mohou být použita při zpracování výzkumného záměru MŠMT číslo 0021620828: Ekologické procesy v evoluci modelových skupin organismů – Interakce endofytických hub, na kterém pracují Alena Kubátová a Miroslav Kolařík.

Zdroj materiálu

Lokalita

Národní přírodní rezervace Libický luh se nachází ve Středočeském kraji, u obce Velký Osek, na pravém břehu Labe (Obr. 9 a 10). Jedná se o největší komplex úvalového lužního lesa v Čechách (rozloha 410 ha), který je chráněn od roku 1985. Původní pohyblivý tok Labe zde vytvořil velké množství tůní a slepých ramen, včetně meandru Starého Labe, který byl odříznut při regulaci koryta v 19. století.



Obr. 9. NPR Libický luh. Převzato z <http://mapy.cz>.

Většinu území pokrývají přirozené lesní porosty, jejichž charakter ovlivňuje především hloubka hladiny podzemní vody.

Území rezervace je ovlivněno mnoha nepříznivými zásahy: napřímení toku, odstranění periodického vlivu záplav, extenzivní rybářské hospodaření, vysazování nepůvodních druhů rostlin a další. Přesto se jedná o významnou lokalitu s mnoha vzácnými vlhkomilnými druhy (Rydlo 1993, Ložek & al. 2005).



Obr. 10. Umístění NPR Libický luh. Převzato z <http://maps.google.com>.

Jilm vaz (*Ulmus laevis*)

Jilm vaz je u nás typickou součástí stromového patra lužních lesů, vyskytuje se tedy především v údolích podél toků velkých řek a přilehlých oblastech. Je to strom velkých rozměrů, může dosahovat výšky až 35 m a průměru kmene více jak 1 m. Dožívá se až 400 let. Listy vyrůstající z velmi krátkého řapíku jsou střídavé, vejčitého tvaru s dvakrát zubatým okrajem a na spodní straně hustě chlupaté. Na bázi jsou výrazně asymetrické (Obr. 11).

Roste v místech s vysokou hladinou spodní vody, snáší krátkodobé záplavy, ale zároveň přežije i pokles hladiny v létě. Patří mezi náročné listnáče, protože je vázán na hluboké půdy s vysokým obsahem dusíku. Areál výskytu sahá od střední po východní Evropu, v severní a západní Evropě chybí. Výskyt tohoto druhu jilmu je v současné době značně redukován. Vysoušením mokřadů a regulací vodních toků se ztratila většina jeho původních stanovišť. Velké množství jilmů také podlehl dvěma vlnám grafiózy jilmů (také Holandská nemoc jilmů), jejichž původci byly patogenní houby *Ophiostoma ulmi* a *Ophiostoma novo-ulmi* (Úřadníček & al. 2001, Dvořák & al. 2006).



Obr. 11. Listy jilmu vazu (*Ulmus laevis*). Převzato z <http://www.biopix.dk/Photo.asp?Language=es&PhotoId=23076&Photo=Ulmus-laevis>.

Odběr materiálu

Materiál byl získán během dvou odběrů (září 2008 a září 2009) v NPR Libický luh s povolením Ministerstva životního prostředí (Výjimka pro odběr: usnesení vlády ČR ze dne 15. října 2007 č. 1161).

K odběru materiálu byly vybrány tři jilmy bez viditelných příznaků onemocnění, z lokalit Brůdek a Oseček (Tab. 4). Stromy patří do souboru zkoumaného již dříve v rámci záměru MŠMT, proto je zde uvedeno převzaté číslování stromů. Odebírala jsem tyto vzorky: borku s lýkovou částí z kmene (5x5 cm

číslo stromu	stáří stromu	průměr kmene	lokalita
UL16	středně starý	cca 25 cm	Brůdek
UL17	mladý	cca 10 cm	Brůdek
UL20	nejstarší	cca 65 cm	Oseček

Tab. 4. Označení zkoumaných stromů.

z výšky cca 1 m nad zemí), část kořene (15 cm, \varnothing 1-3 cm), část větve (15 cm, \varnothing 1-3 cm) a vývrt z kmene (cca 1 m nad zemí, \varnothing 0,5 cm). K ošetření ran byl použit stromový balzám (reg. č. 1228-2, účinná látka styrene-acrylate copolymer 20-24 %).

Zpracování materiálu

Zpracování odebraných vzorků

Druhý den po odběru jsem odebrané vzorky omyla pod tekoucí vodou, v případě potřeby nařezala na menší části a povrchově sterilizovala ponořením do 96% etanolu a 0,5% roztoku chlornanu sodného (Tab. 5). Ve sterilním prostředí jsem vzorky větví a kořenů rozdělila na borku s lýkovou částí a dřevní část, vývrt na vnější a centrální část a od borky z kmene oddělila dřevo. Následně jsem tyto části rozdělila na štěpinky (cca 1x0,5 cm) (Tab. 6) a po pěti kusech je umístila na Petriho misky s 2% malt agarem (MA) s přidáním streptomycinem (kvůli zamezení růstu bakterií). Kultivace takto získaných misek probíhala v termostatu při 25°C ve tmě, po tři měsíce.

	etanol	NaClO	etanol
vývrt	10 s	20 s	10 s
kořen a větev	1 min	3 min	30 s
borka	30 s	1 min	30 s

Tab. 5. Schéma průběhu povrchové sterilizace jednotlivých dřevních částí.

strom	část	počet štěpinek	
		odběr 2008	odběr 2009
UL16	vývrt	10	10
	kořen	10	20
	větev	0	10
	borka	10	10
UL17	vývrt	15	10
	kořen	10	20
	větev	10	10
	borka	10	10
UL20	vývrt	20	10
	kořen	10	20
	větev	10	10
	borka	10	10

Tab. 6. Počty štěpinek z jednotlivých dřevních částí.

Kultivace

Houbové kolonie vyrůstající ze štěpinek jsem průběžně izolovala na Petriho misky s bramborovo-mrkvovým agarem (PCA) nebo sladínovým agarem (SI 4°). K dlouhodobému uskladnění kultur jsem použila šikmé půdy s bramborovo-mrkvovým agarem (PCA) a sladínovým agarem (SI 4°).

Mikroskopické pozorování a fotodokumentace

Preparáty připravené v kyselině mléčné nebo v Meltzerově činidle jsem pozorovala a měřila na mikroskopu Olympus CX31 či Olympus BX51, na kterém lze i pořizovat mikrofotografie pomocí počítačového programu QuickPHOTO MICRO 2.3 (Promicra).

Předběžná determinace

Jednotlivé kmeny hub jsem určovala do rodu podle mikroskopických znaků konidií a konidiogenních buněk i podle makroskopického vzhledu kolonie s pomocí determinační literatury (von Arx 1970, Carmichael & al. 1980, Barnett & Hunter 1998).

Výsledky a diskuze

Celkem se mi podařilo z dřevních částí jilmu vazy izolovat 144 kmenů hub. Při srovnání hlavních dřevních částí jsou patrné rozdíly ve frekvenci kolonizace štěpinek z jednotlivých částí i v druhovém složení endofytických hub.

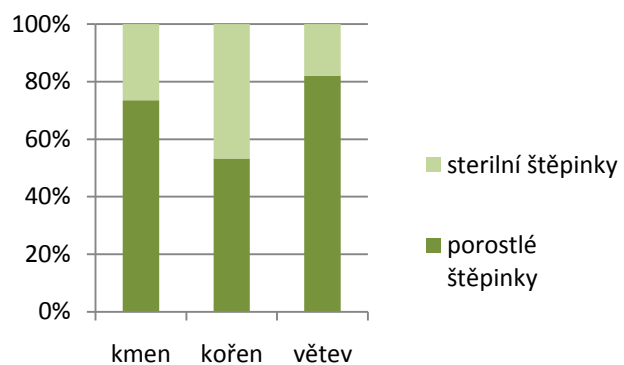
Frekvence kolonizace

Kořeny se od kmenů a větví liší výrazně nízkou frekvencí kolonizace endofytickými houbami – pouze 53,3 % (Obr. 12). Tento výsledek souhlasí s výsledky uvedenými v rešeršní části, které zdůrazňují vliv okolního prostředí na druhovou diverzitu endofytických hub v různých rostlinných částech. Oproti atmosféře je v půdě odlišná vlhkost i spektrum spor, které mohou potenciálně kolonizovat hostitelskou rostlinu.

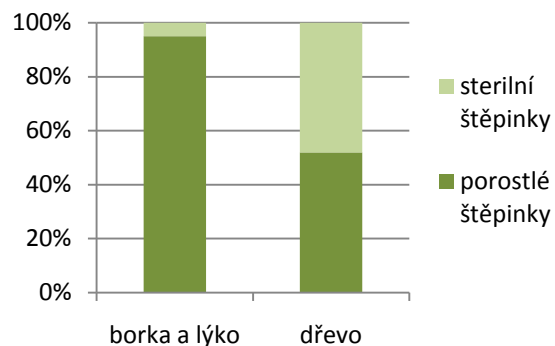
Zásadní je i odlišnost kolonizace dřeva od borky s lýkem (Obr. 13). Hlavní roli zde pravděpodobně hraje dostupnost kyslíku (která velmi rychle klesá směrem ke středu kmene) a živin (která znevýhodňuje druhy se slabší enzymatickou výbavou). Kolonizace dřeva je také obtížnější i kvůli jeho horší dostupnosti pro endofytické houby.

Druhová diverzita

Ve všech dřevních částech jilmu vazy se shodně vyskytuje rod *Xylaria* a jeho anamorfní stádium *Nodulisporium* (Obr. 17), což jsou typičtí endofytičtí kolonizátoři dřevních pletiv rostlin (Tab. 7, 8, 9, 10).



Obr. 12. Frekvence kolonizace štěpinek z hlavních dřevních částí jilmu vazy (*Ulmus laevis*).



Obr. 13. Srovnání frekvence kolonizace štěpinek z různých pletiv kmene jilmu vazy (*Ulmus laevis*).

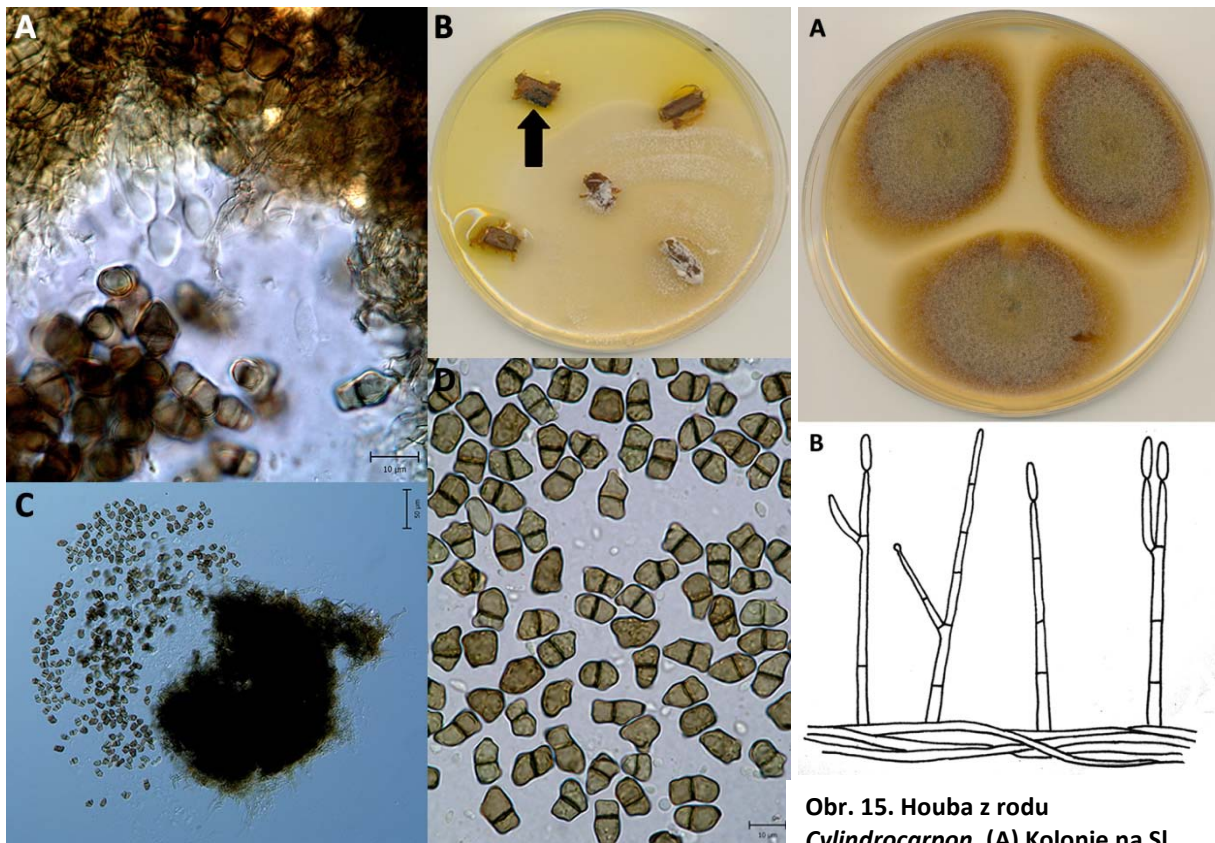
Kořeny

Z hlediska druhového spektra endofytických hub se opět nejvíce lišily kořeny (Tab. 9). Pouze v kořenech se vyskytovaly rody *Cylindrocarpon* (Obr. 15), *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Chloridium* či *Penicillium* s bradavčitými konidiemi, tvořící v substrátu růžový pigment (ze stromu UL17).

Výsledky studie kořenů dubů potvrzují, že endofytické houby náležící do rodu *Trichoderma* se vyskytují převážně ve dřevě (případně také v živých pletivech subperidermální kůry) tlustších kořenů s průměrem větším než 1 cm (Novotný 2003b).

Endofytické houby z rodu *Cylindrocarpon* byly izolovány z kořenů mnoha druhů rostlin (Novotný 2001, Ananda & Sridhar 2002, Sati & Belwal 2005, Sati & al. 2008, Wirsal & al. 2001). V rámci studie, kterou provedl Wirsal & al. (2001), byl rod *Cylindrocarpon* izolován výhradně z kořenů rákosu (*Phragmites australis*), rostoucího na sušších, nezamokřených stanovištích.

Pouze z kořenů byl také izolován prozatím neurčený coelomycet A17 (Obr. 14) a neurčený bazidiomycet A94 tvořící rhizomorfy (Obr. 16).



Obr. 14. Neurčený coelomycet A17. (A) Konidiogenní buňky; (B) Kolonie na štěpince; (C) Konidioma; (D) Konidie. Foto: A. Kovaříčková.

Obr. 15. Houba z rodu *Cylindrocarpon*. (A) Kolonie na SI 2°, stáří 2 týdny; (B) Konidiogenní buňky. Foto a kresba : A. Kovaříčková.



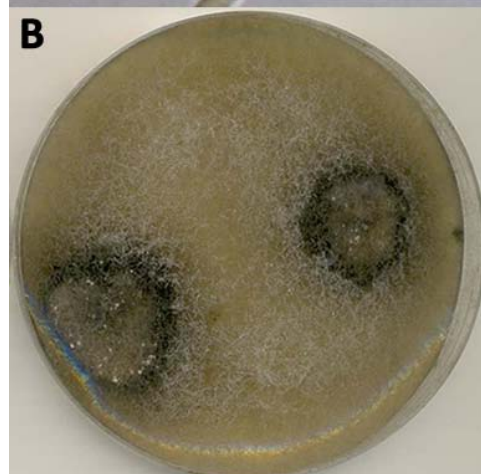
Obr. 16. Neurčený bazidiomycet tvoří rhizomorfy. Foto: A. Kovaříčková.



Obr. 17. Anamorfa rodu *Xylaria*: Konidiogenní buňky. Foto: A. Kovaříčková.

Nadzemní části

U nadzemních dřevních částí nejsou rozdíly tak markantní. Ze všech nadzemních částí byl velmi často izolován rod *Phomopsis* (Obr. 18), který byl z kořenů izolován pouze jednou. Houby z rodu *Phomopsis* izoloval Brayford (1990) z peridermu jilmu a morfologicky stejné kmeny i z peridermu dalších listnatých dřevin. Ve větvích jilmu rod *Phomopsis* dominuje spolu s druhem *Coniothyrium fuckelii* (Tomita 2003). Významným druhem je rod *Phomopsis oblonga*, který přirozeně reguluje výskyt grafiózy jilmů (způsobované



←Obr. 18. Houba z rodu *Phomopsis*: kolonie na PCA, stáří 4 týdny. Foto: A. Kovaříčková.

Obr. 19. Houba z rodu *Nigrospora*. (A) Konidiogenní buňka; (B) Kolonie na PCA, stáří 5 týdnů. Foto: A. Kovaříčková.

napadením houbami rodu *Ophiostoma*), neboť lýko kolonizované touto houbou je neatraktivní pro přenašeče grafiózy z rodu *Scolytus* (Dvořák & al. 2006).

Pouze z borky a lýka kmene byly izolovány rody *Acremonium*, *Fusarium* a také rod *Nigrospora* (Obr. 19), který je hojný v teplejších klimatických oblastech v půdě a na tlejících rostlinách (Tab. 7).

Ze dřeva kmene byl na rozdíl od ostatních nadzemních dřevních částí často izolován rod *Penicillium*, zhruba stejně často jako rod *Phomopsis*, který v ostatních nadzemních částech výrazně převládá. Houby z rodu *Penicillium* pravděpodobně preferují již odumřelá pletiva dřeva běle, což potvrzuje fakt, že byly z nejstaršího stromu UL20 s největším průměrem kmene izolovány pouze jednou. Pouze ze dřeva kmene byl také izolován rod *Cladosporium*, který má podobné ekologické nároky jako rod *Penicillium*. Nevyskytovaly se zde naopak houby podobné rodu *Phoma*, které byly izolovány ze všech ostatních dřevních částí (Tab. 8).

kmen	rod endofytické houby	strom
A2	<i>Fusarium</i>	16
A14	<i>Phomopsis</i>	16
A15	<i>Phomopsis</i>	16
A42	<i>Phomopsis</i>	16
A43	<i>Phomopsis</i>	16
A44	<i>Phomopsis</i>	16
A45	sterilní	16
A46	<i>Phomopsis</i>	16
A70	sterilní	16
A71	neurčený kmen	16
A72	neurčený kmen	16
A73	neurčený kmen	16
A78	neurčený kmen	16
A121	<i>Phomopsis</i>	16
A122	sterilní	16
A144	neurčený kmen	16
A5	sterilní	17
A6	<i>Nigrospora</i>	17
A20	<i>Phomopsis</i>	17
A21	<i>Nigrospora</i>	17
A35	<i>Phomopsis</i>	17
A53	sterilní	17
A54	<i>Fusarium</i>	17
A55	<i>Phomopsis</i>	17
A56	sterilní	17
A113	<i>Nodulisporium</i>	17
A128	sterilní	17
A129	sterilní	17
A130	<i>Phomopsis</i>	17
A131	<i>Phoma-like</i>	17
A132	sterilní	17
A1	<i>Nigrospora</i>	20
A7	<i>Phomopsis</i>	20
A31	<i>Gliocladium</i>	20
A62	<i>Phomopsis</i>	20
A63	<i>Phomopsis</i>	20
A64	<i>Phomopsis</i>	20
A65	<i>Phomopsis</i>	20
A66	<i>Phomopsis</i>	20
A101	<i>Xylaria</i>	20
A102	<i>Phomopsis</i>	20
A115	sterilní	20
A120	<i>Acremonium</i>	20
A139	neurčený kmen	20
A140	sterilní	20
A141	neurčený kmen	20
A145	neurčený kmen	20

Tab. 7. Endofytické houby izolované z kmenů (borka a lýko)

kmen	rod endofytické houby	strom
A3	<i>Penicillium</i>	16
A10	sterilní	16
A11	<i>Penicillium</i>	16
A36	sterilní	16
A37	<i>Penicillium</i>	16
A38	sterilní	16
A100	neurčený kmen	16
A126	sterilní	16
A16	<i>Phomopsis</i>	17
A22	<i>Xylaria</i>	17
A23	sterilní	17
A24	<i>Penicillium</i>	17
A27	<i>Phomopsis</i>	17
A28	<i>Phomopsis</i>	17
A40	<i>Phomopsis</i>	17
A41	<i>Penicillium</i>	17
A57	<i>Phomopsis</i>	17
A105	<i>Penicillium</i>	17
A8	<i>Cladosporium</i>	20
A9	<i>Phomopsis</i>	20
A26	<i>Nodulisporium</i>	20
A58	<i>Phomopsis</i>	20
A67	<i>Nodulisporium</i>	20
A69	<i>Cladosporium</i>	20
A106	<i>Penicillium</i>	20

Tab. 8. Endofytické houby izolované z kmenů (dřevo)

kmen	rod endofytické houby	strom
A12	<i>Nodulisporium</i>	16
A13	sterilní	16
A39	neurčený kmen	16
A84	<i>Cylindrocarpon</i>	16
A85	sterilní	16
A98	<i>Acremonium</i>	16
A99	neurčený kmen	16
A109	sterilní	16
A17	neurčený kmen	17
A18	<i>Penicillium</i> (růžový pigment)	17
A29	<i>Clonostachys</i>	17
A34	<i>Penicillium</i> (růžový pigment)	17
A47	<i>Clonostachys</i>	17
A48	<i>Penicillium</i> (růžový pigment)	17
A49	<i>Penicillium</i> (růžový pigment)	17
A50	<i>Penicillium</i> (růžový pigment)	17
A74	neurčený kmen	17
A75	<i>Penicillium</i> (růžový pigment)	17
A76	neurčený kmen	17
A87	<i>Cylindrocarpon</i>	17
A88	<i>Cylindrocarpon</i>	17
A89	<i>Phoma</i> -like	17
A90	<i>Fusarium</i>	17
A91	<i>Phomopsis</i>	17
A92	<i>Penicillium</i>	17
A93	<i>Trichoderma</i>	17
A111	<i>Penicillium</i> (růžový pigment)	17
A153	sterilní	17
A94	bazidiomycet (rhizomorfa)	20
A95	sterilní	20
A96	sterilní (stejně jako A95)	20
A97	sterilní (stejně jako A95)	20
A104	<i>Penicillium</i>	20
A107	sterilní	20
A112	neurčený kmen	20
A118	neurčený kmen	20
A119	<i>Chloridium</i>	20
A142	sterilní	20
A143	(stejná jako A142)	20
A151	sterilní	20
A152	sterilní	20

Tab. 9. Endofytické houby izolované z kořenů

kmen	rod endofytické houby	strom
A79	<i>Phomopsis</i>	16
A80	<i>Phomopsis</i>	16
A81	<i>Phomopsis</i>	16
A82	<i>Phomopsis</i>	16
A83	<i>Phomopsis</i>	16
A108	neurčený kmen	16
A114	<i>Nodulisporium</i>	16
A124	<i>Phomopsis</i>	16
A125	<i>Nodulisporium</i>	16
A19	<i>Phomopsis</i>	17
A33	<i>Phomopsis</i>	17
A51	neurčený kmen	17
A52	sterilní	17
A133	<i>Phoma</i> -like	17
A134	sterilní	17
A136	<i>Phomopsis</i>	17
A137	sterilní	17
A138	sterilní	17
A25	sterilní	20
A30	<i>Penicillium</i>	20
A32	sterilní	20
A59	sterilní	20
A60	<i>Nodulisporium</i>	20
A61	sterilní	20
A146	<i>Phomopsis</i>	20
A147	sterilní	20
A148	neurčený kmen	20
A149	<i>Phomopsis</i>	20
A150	<i>Phomopsis</i>	20

Tab. 10. Endofytické houby izolované z větví

Seznam použité literatury

- Addy H. D., Piercey M. M. & Currah P. S. (2005):** Microfungal endophytes in roots. – Canadian Journal of Botany 83: 1-13.
- Ahlich K. & Sieber T. N. (1996):** The profusion of dark septate endophytic fungi in non-ectomycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. – New Phytologist 132(2): 259-270.
- Ananda K. & Sridhar K. R. (2002):** Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. – Canadian Journal of Microbiology 48(10): 871-878.
- Arnold A. E. (2007):** Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. – Fungal Biology Reviews 21: 51–66.
- Arnold A. E., Henk D. A., Eells R. L., Lutzoni F. & Vilgalys R. (2007):** Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. – Mycologia 99(2): 185–206.
- Arnold A. E. & Lutzoni F. (2007):** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? – Ecology 88(3): 541–549.
- Arx J. A. v. (1970):** The genera of fungi sporulating in pure culture. – J. Cramer, Lehre.
- Azevedo J. L., W. Maccheroni J. & Pereira J. O. (2000):** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. – Electronic Journal of Biotechnology 3(1): 40-65.
- Bacon C. W. & Hill N. S. (1996):** Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. – In: S. C. Redlin & L. M. Carris [eds.], Endophytic fungi in grasses and woody plants, APS Press, Saint Paul, 155-178.
- Bacon C. W., Porter J. K., Robbins J. D. & Luttrell E. S. (1977):** *Epochloë typhina* from Toxic Tall Fescue Grasses. – Applied and Environmental Microbiology 34(5): 576-581.
- Baltruschat H., Fodor J., Harrach B. D., Niemczyk E., Barna B., Gullner G., Janeczko A., Kogel K., Schäfer P., Schwarczinger I., Zuccaro A. & Skoczowski A. (2008):** Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. – New Phytologist 180: 501-510.
- Barnett H. L. & Hunter B. B. (1998):** Illustrated genera of imperfect fungi, Fourth edition. – ASP Press, Saint Paul.
- Baum S., Sieber T. N., Schwarze F. W. M. R. & Fink S. (2003):** Latent infections of *Fomes fomentarius* in the xylem of European beech (*Fagus sylvatica*). – Mycological Progress 2(2): 141–148.
- Bayman P., Angulo-Sandoval P., Báez-Ortiz Z. & Lodge D. J. (1998):** Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. – Mycological research 102(8): 944–948.

- Bayman P., Lebrón L. L., Tremblay R. L. & Lodge D. J. (1997):** Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). – *New Phytologist* 135: 143-149.
- Blodgett J. T., Swart W. J., Louw S. & Weeks W. J. (2000):** Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles, stems, and roots. – *Mycologia* 92(5): 853-859.
- Brayford D. (1990):** Variation in *Phomopsis* isolates from *Ulmus* species in the British Isles and Italy. – *Mycological research* 94(5): 691-697.
- Cao L. X., You J. L. & Zhou S. N. (2002):** Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. – *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 169–171.
- Carmichael J. W., Kendrick W. B., Connors I. L. & Sigler L. (1980):** Genera of hyphomycetes. – University of Alberta Press, Edmonton.
- Carroll G. (1988):** Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. – *Ecology* 69(1): 2-9.
- Carroll G. & Petrini O. (1983):** Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. – *Mycologia* 75(1): 53-63.
- Danti R., Sieber T. N. & Sanguineti G. (2002):** Endophytic mycobiota in bark of European beech (*Fagus sylvatica*) in the Apennines. – *Mycological research* 106(11): 1343–1348.
- Dvořák M., Palovčíková D. & Jankovský L. (2006):** The occurrence of endophytic fungus *Phomopsis oblonga* on elms in the area of southern Bohemia. – *Journal of Forest Science* 52(11): 531-535.
- Fisher P. J., Petrini O., Petrini L. E. & Sutton B. C. (1994):** Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. – *New Phytologist* 127: 133-137.
- Freeman S. & Rodriguez R. J. (1993):** Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. – *Science* 260(5104): 75-78.
- Ganley R. J. & Newcombe G. (2006):** Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. – *Mycological research* 110(3): 318-327.
- Higgins K. L., Arnold A. E., Miadlikowska J., Sarvate S. D. & Lutzoni F. (2007):** Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 543–555.
- Hoffman M. T. & Arnold A. E. (2008):** Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. – *Mycological research* 112: 331-344.
- Chapela I. H. (1989):** Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study. – *New Phytologist* 113: 65-75.
- Jumpponen A. (2001):** Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? – *Mycorrhiza* 11(4): 207-211.

- Juniper B. E. (1991):** The leaf from the inside and the outside: a microbe's perspective. – In: J. H. Andrews & S. S. Hirano [eds.], *Microbial ecology of leaves*, Springer, New York, 21-42.
- Kharwar R. N., Verma V. C., Strobel G. & Ezra D. (2008):** The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. – *Current science* 95(2): 228-233.
- Korittová C. (2008):** Endofytické houby v dřevinách. – Ms. [Bakalářská práce; depon. in: knihovna Katedry botaniky Přf UK, Praha.]
- Kowalski T. & Kehr R. D. (1992):** Endophytic fungal colonization of branch bases of several forest tree species. – *Sydowia* 44(2): 137-168.
- Kowalski T. & Kehr R. D. (1996):** Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species. – In: S. C. Redlin & L. M. Carris [eds.], *Endophytic fungi in grasses and woody plants*, APS Press, Saint Paul, 67-86.
- Lodge D. J., Fisher P. J. & Sutton B. C. (1996):** Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. – *Mycologia* 88(5): 733-738.
- Ložek V., Kubíková J., Špryňar P. & kolektiv a. (2005):** Chráněná území České republiky, XIII. Střední Čechy. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.
- Menkis A., Allmer J., Vasiliauskas R., Lygis V., Stenlid J. & Finlay R. (2004):** Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris – *Mycological research* 108(8): 965-973.
- Müller C. B. & Krauss J. (2005):** Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. – *Current Opinion in Plant Biology* 8: 450-456.
- Narisawa K., Tokumasu S. & Hashiba T. (1998):** Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. – *Plant Pathology* 47: 206-210.
- Novotný D. (2001):** Contribution to the knowledge of the mycoflora in roots of oaks with and without tracheomycotic symptoms. – *Czech mycology* 53(3): 211-222.
- Novotný D. (2003a):** A comparison of two methods for the study of microscopic fungi associated with oak roots. – *Czech mycology* 55(1-2): 73-82.
- Novotný D. (2003b):** Ekologie mikroskopických hub dubů, se zřetelem na kořenové endofyty a ophiostomatální houby. – Ms. [Dizertační práce; depon. in: knihovna Katedry botaniky Přf UK, Praha.]
- O'Dell T. E., Massicotte H. B. & Trappe J. M. (1993):** Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. – *New Phytologist* 124(1): 93-100.
- Oses R., Valenzuela S., Freer J., Baeza J. & Rodríguez J. (2006):** Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. – *International Biodeterioration & Biodegradation* 57: 129-135.

Osés R., Valenzuela S., Freer J., Sanfuentes E. & Rodríguez J. (2008): Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. – *Fungal Diversity* 33: 77-86.

Rydlo J. (1993): Zanikající mokřady v Polabí. 2. Libický luh. – *Muzeum a současnost, řada přírodovědná* 7: 91-208.

Saikkonen K. (2007): Forest structure and fungal endophytes. – *Fungal Biology Reviews* 21: 67–74.

Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M. & Sullivan T. J. (1998): Fungal endophytes: a continuum of Interactions with host plants. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.

Santos R. M. G. d., Rodrigues-Fo E., Rocha W. C. & Teixeira M. F. S. (2003): Endophytic fungi from *Melia azedarach*. – *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 767–770.

Sati S. C. & Belwal M. (2005): Aquatic hyphomycetes as endophytes of riparian plant roots. – *Mycologia* 97(1): 45–49.

Sati S. C., Belwal M. & Pargaen N. (2008): Diversity of water borne conidial fungi as root endophytes in temperate forest plants of Western Himalaya. – *Nature and Science* 6(3): 59-65.

Selosse M., Dubois M. & Alvarez N. (2009): Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? – *Mycological research* 113: 1062-1069.

Schardl C. L., Leuchtman A. & Spiering M. J. (2004): Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. – *Annual Review of Plant Biology* 55: 315-340.

Schulz B. & Boyle C. (2005): The endophytic continuum. – *Mycological research* 109(6): 661–686.

Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A. & Krohn K. (2002): Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. – *Mycological research* 106(9): 996-1004.

Sieber T. N. (2007): Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? – *Fungal Biology Reviews* 21: 75-89

Stone J. K., Polishook J. D. & White J. F. (2004): Endophytic fungi. – In: G. M. Mueller, G. F. Bills & M. S. Foster [eds.], *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier Academic Press, Burlington, 241-270.

Summerbell R. C. (2005): Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: influence of site factors on fungal distributions. – *Studies in Mycology* 53: 121–145.

Suryanarayanan T. S. & Vijaykrishna D. (2001): Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. – *Fungal Diversity* 8: 155-161.

Tomita F. (2003): Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. – *Fungal Diversity* 14: 187-204.

Toti L., Viret O., Horat G. & Petrini O. (1993): Detection of the endophyte *Discula umbrinella* in buds and twigs of *Fagus sylvatica*. – European Journal of Forest Pathology 23: 147-152.

Unterseher M., Reiher A., Finstermeier K., Otto P. & Morawetz W. (2007): Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. – Mycological Progress 6: 201-212.

Úřadníček L., Maděra P., Kolibáčová S., Koblížek J. & Šefl J. (2001): Dřeviny České republiky. – Matice lesnická, Písek.

White J. F. & Morgan-Jones G. (1996): Morphological and physiological adaptations of Balansieae and trends in the evolution of grass endophytes. – In: S. C. Redlin & L. M. Carris [eds.], Endophytic fungi in grasses and woody plants, APS Press, Saint Paul, 133-154.

Wilson D. (1995): Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. – Oikos 73(2): 274-276.

Wilson D. & Carroll G. C. (1994): Infection studies of *Discula quercina*, an endophyte of *Quercus garryana*. – Mycologia 86(5): 635-647.

Wirsel S. G. R., Leibinger W., Ernst M. & Mendgen K. (2001): Genetic diversity of fungi closely associated with common reed. – New Phytologist 149(3): 589-598.