

Univerzita Karlova v Praze

Endofytické houby v dřevinách

Bakalářská práce

Celie Korittová

školitel: Karel Prášil

Katedra botaniky

2008

Obsah

Úvod.....	4
Hostitelská specifita	6
Orgánová/pletivová specifita	9
Rozsah kolonizace.....	10
Striktní endofyté.....	12
Fakultativní patogeni.....	14
Primární dekompozitoři	17
Jak je to s mutualismem?	19
Evoluce a diverzita.....	22
Závěr	24
Děkuji.....	25
Literatura.....	26

Abstrakt

Endofyty jsou organismy žijící uvnitř rostlinných pletiv aniž by působily příznaky nějakého onemocnění. Tato životní forma se vyskytuje v životním cyklu širokého spektra hub, většinou vřeckovýtrusých, méně často i stopkovýtrusých. Životní strategie endofytů jsou rozmanité, od striktních endofytů přes latentní patogeny až po primární dekompozitory. Travní endofyty jsou považováni za mutualisty a mutualismus byl pozorován i u některých i u některých endofytů dřevin, jeho význam však bývá přeceňován. Cílem této práce je podat přehled o ekologických, ekofyziologických a evolučních aspektech endofytismu a rozebrat možné přístupy endofytických hub k hostitelským rostlinám.

Abstract

The definition of endophytism used in this review is that it is a stage when the fungus lives within the plant tissue without causing any damage to its host. Such stage occurs in the life cycle of many ascomycetes and some basidiomycetes. These fungi have diverse life strategies, usually being primary decomposers or latent pathogens. A mutualism is known between grasses and endophytes and it was observed among woody plants' endophytes too. However, the role of mutualism is commonly being overestimated. The aim of this review is to present the up-to-date knowledge about ecology, ecophysiology and evolution of endophytic fungi and particularly to survey their potential attitudes to host plants.

klíčová slova: endofyti, felofyti, vřeckovýtrusé houby, koevoluce, mutualismus, komenzalismus, parazitismus, dekompozice

key words: endophytes, phellophytes, ascomycetes, coevolution, mutualistic symbiosis, comensalism, parasitism, decomposition

Úvod

Termín endofyt byl zaveden De Barym pro označení houby, jejíž hyfy pronikají do rostlinného pletiva (De Bary, 1866, in Carroll, 1986). Později byl přejat a používán v nejrůznějších významech: od velmi širokých, zahrnujících i parazitické rostliny, po velmi úzké, obsahující pouze houby rostoucí po celý životní cyklus bez viditelných příznaků uvnitř rostlin (Stone et al., 2000; Schulz & Boyle, 2005).

Většinou je však endofytismus chápán jako aktuální životní forma a endofyty jsou definovány jako organismy, které v daném okamžiku žijí uvnitř rostlinných pletiv aniž by působily viditelné příznaky, tj. žijí v asymptomatické symbióze (Schulz & Boyle, 2005; Wilson, 2000). Tohoto pojetí se budu snažit držet i v této práci.

Zpravidla bývají rozlišovány dva typy endofytismu, některými autory nazývané ustálený (constitutive) a vyvolaný (inducible). Tyto termíny jsou ovšem značně zavádějící.

Ustálený endofytismus je ekologicky i taxonomicky vyhraněná symbióza mezi houbami z čeledi Clavicipitaceae a rostlinami z čeledi Poaceae, při níž houba systémově kolonizuje rostlinu a prorůstá i do semen, jimiž se šíří (tj. šíří se vertikálně). Tato symbióza je považována za mutualistickou. Vzhledem ke značnému rozsahu infekce je pro rostlinu energeticky náročná, ale houby jsou schopné produkovat látky toxické nebo chuťově nepříjemné pro herbivory a poskytují tak hostitelským travám selekční výhodu. Ustálený endofytismus je poměrně dobře prozkoumán, protože má bezprostřední ekonomický význam, a to jak negativní (otravy dobytka), tak pozitivní (potenciální využití pro biologickou ochranu obilnin před hmyzími škůdci).

Naproti tomu pod termín „vyvolaný endofytismus“ bývá shrnováno všechno ostatní. Endofytismu se mohou účastnit houby ze širokého spektra taxonů. Ačkoli většina endofytů jsou vřeckovýtrusé houby, některé patří i mezi stopkovýtrusé a výjimečně bývají izolovány i houby spájivé (Lygis, 2005). Pokud jde o spektrum hostitelských rostlin, endofytické houby byly izolovány ze všech dosud zkoumaných druhů od mechorostů až po stromy.

Nejen taxonomicky, ale ani ekologicky nejsou endofytické houby jednotné (Schulz & Boyle, 2005; Novotný, 2004). Stadium endofyta se může vyskytovat v životním cyklu široké škály hub s rozmanitými životními strategiemi:

- 1) Patogenní houby s fází latence, během které kolonizují pletiva hostitele (Gange, 1996; Sinclair & Cerkauskas, 1996).

- 2) Fakultativní patogeni rozvíjející se pouze v případě, že hostitel je oslaben stresem (Sinclair & Cerkauskas, 1996).
- 3) Primární dekompozitoři
- 4) Mutualističtí symbionti
- 5) Houby proniknuvší do rostlinného pletiva náhodně a krátkodobě v něm přežívající (Schulz & Boyle, 2005)

Cílem mé bakalářské práce je shrnout informace o ekologických, ekofyziologických a evolučních aspektech endofytismu a zejména rozebrat možné přístupy endofytických hub k jejich hostitelským rostlinám.

Hostitelská specifita

Z hostitelských dřevin bývají zpravidla izolovány desítky druhů endofytických hub (Ganley & Newcombe, 2006; Kowalski & Kehr, 1992; Bills & Polishook, 2000), z toho ale obvykle jen několik (nebo jen jediný) bývá zastoupeno ve větší míře (Petrini, 1996). Příklady jsou *Ophiovalsa suffusa* a *Phomopsis* sp. v *Alnus rubra* (Sieber et al., 1990) nebo *Pocillopycnis umensis* a *Sirodothis* sp. v *Picea abies* (Sieber, 1989). Tyto dominantní druhy hub jsou většinou hostitelsky specifické pro daný druh nebo skupinu příbuzných druhů hostitelů, na které jsou adaptovány (Petrini, 1996).

Jak ukázaly studie na dvou druzích endofytických hub z buku – *Discula umbrinella* a *Hypoxylon fragiforme*, hostitelská specifita je do značné míry ovlivněna procesy, které se odehrávají na samém počátku kolonizace: přichycením spory na substrát a její aktivací.

Spory rodu *Hypoxylon* zůstávají v nepřítomnosti hostitele v klidovém stavu. Zachytí-li však specifický chemický signál, během několika minut zareagují uvolněním z exosporia. Tím dojde k odhalení vnitřního obalu a zahájení procesů přichycení, klíčení a pronikání do hostitele. Tyto procesy už nemusí být řízeny látkami charakteristickými pro buk – například přichycení je zajišťováno lektiny na povrchu hostitele, které vážou chitin, glukózu nebo mannózu obsažené ve vnitřním obalu spory odhaleném aktivací (Petrini, 1996).

Zatímco *Hypoxylon fragiforme* byl studován jako modelový příklad hostitelsky specifické aktivace, *Discula umbrinella* posloužila ke studiu specifity přichycení na hostitelský povrch. Tato houba je běžná jako endofyt buků, ale může žít i v kaštanovnících a dubech. Bylo prokázáno, že konidie se v mnohem větší míře zachycují na povrchu listů buku, než na listech obou příbuzných stromů, a naopak množství konidií zachycené na listech ječmene bylo mnohem menší (ječmen byl použit pro srovnání jako nepřibuzná rostlina, která pro studovanou houbu není potenciálním hostitelem). *Discula umbrinella* má na povrchu konidií slizovou pochvu a předpokládá se, že polysacharidy nebo enzymy v ní obsažené mají své protějšky, s nimiž se specificky vážou, v povrchových molekulách bukových listů (Toti et al., 1992).

Druhově specifické interakce se uplatňují i v pozdějších fázích kolonizace, hloubka jejich poznání je ale mnohem menší.

Tyto interakce byly studovány v modelových zjednodušených systémech – v duálních kulturách endofytů a kalusů hostitelských rostlin. Ukázalo se, že většina endofytů je

přítomností živých hostitelských buněk stimulována k rychlejšímu růstu. Houby, které na kalus nereagovaly, nebo jím byly dokonce inhibovány, byly druhy typické pro starší větve, ve kterých je jen malý podíl živých buněk (Hendry et al., 1993). O druhové specifitě stimulace endofyta kalusem svědčí srovnání růstu endofytů v přítomnosti kalusu hostitelské a nehostitelské rostliny. Ačkoli obě rostliny byly ze stejné čeledi Lamiaceae, nehostitelský kalus stimuloval houby méně nebo vůbec (Peters et al., 1998).

Pro existenci hostitelské specifity, která se uplatňuje v pozdějších fázích kolonizace, hovoří i skutečnost, že pletiva jedle a jmelí, která spolu těsně sousedí, jsou obývána velmi odlišnými společenstvy endofytů.

V žádné z prací, které jsem prostudovala, bohužel nebyly navrženy hypotézy objasňující příčiny a mechanismy této složky specifity.

Kromě pozitivní stimulace hub danému hostiteli vlastních ovlivňuje rostlina skladbu svého společenstva endofytů i eliminací hub, které na ní nejsou adaptovány.

Například evropská borovice reagovala na amerického zástupce rodu *Diplodia* rychlou tvorbou pryskyřičných kanálků (během čtyř dní, zatímco tvorba pryskyřičných kanálků v reakci na mechanické zranění trvala dvanáct dní), čímž houbě zabránila v kolonizaci svých pletiv. Na evropského zástupce rodu *Diplodia*, který je jejím přirozeným endofytem, nereagovala a kolonizaci tak houbě umožnila (Luchi et al., 2005, in Slippers & Wingfield, 2007).

Zůstává otázkou, jakými mechanismy rostlina houby rozlišuje a zda se na toleranci hostitele vůči endofytovi vůbec podílí nějaká adaptace ze strany rostliny, nebo zda se jedná pouze o „maskování“, jímž se houba snaží uniknout pozornosti. Takovým případem je *Colleotrichum lindemuthianum* z fazolí, které během asymptomatické fáze svého životního cyklu produkuje glykoprotein podobný přirozeným složkám buněčné stěny rostlin, takže není rozeznáno jako cizorodé (Perfect et al., 1998, in Sieber, 2007).

Míra hostitelské specifity endofytů se může lišit v závislosti na biotopu, který jejich hostitelé obývají. Naznačují to výsledky srovnání endofytických hub z cypřišovitých dřevin rostoucích v temperátním pásu a v aridních oblastech subtropů. Zdá se, že ve velmi suchých oblastech působí selekční tlak proti hostitelské specifitě, neboť v takovém klimatu je pro houbu mnohem zásadnější co nejrychleji se dostat z extrémního vnějšího prostředí do poměrně stabilního prostředí uvnitř hostitelské rostliny (Hoffman & Arnold, 2008).

Tato hypotéza by mohla vysvětlovat také skutečnost, že *Neofusicoccum australe* je ve

východní Austrálii typické pro akácie a jen velmi výjimečně bývá izolováno z eukalyptů, zatímco v západní Austrálii je na eukalyptu i dalších jedenácti druzích rostlin dominantním endofytem (Slippers & Wingfield, 2007).

Orgánová/pletivová specifita

Uvážíme-li fyziologické rozdíly mezi různými rostlinnými pletivy a nepatrnou velikost houbových vláken, která jim umožňuje vnímat tyto rozdíly i v měřítku jednotlivých buněk, je přirozené, že se u endofytů projevuje značná orgánová a hlavně pletivová specifita. Příčinou je jednak potřeba hub adaptovat se na konkrétní podmínky (různá pletiva obsahují různé látky, k jejichž zpracování musí houba produkovat různé enzymy) a jednak rozdělení nik umožňující koexistenci více druhů. Obě tyto příčiny se prolínají: rozdělení nik je zprostředkováno rozdílnými adaptacemi a nutnost adaptovat se je naléhavější v prostředí s vyšší kompeticí (Petrini et al., 1992; Carroll & Petrini, 1983).

Příkladem zdokumentovaným na mikroskopické úrovni jsou endofyty z listů růže, kteří byli pozorováni mezi cévními svazky, ale nikoli v mezofylu (Salgado et al., 2007). Důvodem může být vyšší dostupnost živin v cévních svazcích nebo přísnější obranné mechanismy v mezofylu.

U endofytů buku byla pozorována odlišná reakce na kalus hostitelské rostliny mezi endofyty z menších větviček a endofyty ze silnějších větví. V menších (a tedy mladších) větvičkách je větší podíl živých buněk. Houby, které v nich rostou, musí být na přítomnost živých buněk adaptovány, což se projevilo stimulací růstu v přítomnosti kalusu. V silnějších (starších) větvích je podíl živých buněk menší. Houby tedy příslušné adaptace nepotřebují a ve zmíněném experimentu se to projevilo tak, že byly přítomností kalusu inhibovány (Hendry et al., 1993).

I orgán tak malý, jako je jehlice, lze rozdělit na ještě menší mikrohabitaty. V jehlicích se vyskytují minimálně dvě odlišné potravní gildy: „řapíkové houby“ rostoucí pouze v řapíku a „čepelové houby“, které rostou jak v řapíku, tak i v čepeli. „Řapíkové houby“ mají schopnost rozkládat celulózu, hemicelulózy a pektiny. „Čepelové houby“ mají mnohem omezenější enzymatickou výbavu a rostou téměř jen na pektinech (Carroll & Petrini, 1983).

Rozdělení nik v jehlicích bylo studováno též z hlediska apoplastu a symplastu. Endofytické houby izolované z borových jehlic byly kultivovány na médiu chudém na dusík. Ukázalo se, že houby z čeledi Rhytismataceae (především rod *Lophodermium*), které jsou v jehlicích borovice dominantními endofyty, na tomto médiu nerostly, zatímco ostatní izolovaní endofyty ano. Předpokládá se, že houby tolerantní k nedostatku dusíku rostou v apoplastu, zatímco houby, které vyžadují vysoký obsah dusíku, jsou omezeny na symplast (Ganley & Newcombe, 2006).

Rozsah kolonizace

Zatímco pro travní endofyty (Clavicipitaceae) je charakteristické, že hostitelskou rostlinu kolonizují systémově, u ostatních endofytů se předpokládá, že tvoří prostorově omezené lokální infekce (Sieber, 2007).

Extrémním příkladem (což ale vůbec nemusí znamenat, že je výjimečný), je *Rhabdocline parkeri*, endofyt běžný v jehlicích douglasky. Po vyklíčení tato houba proniká pomocí enzymů a apresoria do epidermální buňky jehlice a v oné jediné buňce vytváří miniaturní mycelium. Následuje latentní fáze, během které houba neroste. Z přítomnosti velkého množství ribosomů a výrazného jádérka ovšem vyplývá, že i v tomto stadiu je mycelium značně aktivní. Latentní fáze může trvat 2 až 7 let a je ukončena až těsně před opadem jehlic. Tehdy *Rhabdocline* obnovuje růst a vysílá haustoria do okolních buněk. Záhy po opadu sporuluje a infikuje další generace funkčních jehlic (Stone, 1987).

Endofyté tvořící srovnatelně malá několikabuněčná mycelia byli pozorováni také mezi cévními svazky v listech růže (Salgado et al., 2007) a v epidermálních buňkách několika druhů sítin (Cabral et al., 1993).

O velmi omezeném rozsahu kolonizace svědčí i skutečnost, že v jediné smrkové jehlici může koexistovat větší počet (až 31) geneticky odlišných kmenů rodu *Lophodermium* (Müller et al., 2001), nebo v jediném eukalyptovém listu až čtrnáct různých kmenů rodu *Neofusicoccum* (Smith, 2001, in Slippers & Wingfield, 2007). Podobně z pouhého 1,5 cm² borky kaštanovníku bylo izolováno šest druhů hub (Bissegger & Sieber, 1994). V těchto případech se ale může kromě prostorového omezení uplatňovat i fyziologická specifita a velmi detailní rozdělení nik.

Otázkou zůstává, jaké mechanismy udržují endofytické houby v latentní fázi. V případě *Rhabdocline* se předpokládá, že infikovaná buňka je zabita hypersenzitivní reakcí a růstu houby do dalších buněk brání cytostatika produkovaná hostitelem. Je ale také možné, že houba zastavuje růst sama od sebe a že se několikabuněčná intracelulární fáze stala přirozenou součástí jejího životního cyklu v důsledku koevoluce s hostitelem. Obnovení růstu je pak způsobeno buď tím, že regulační mechanismy ze strany rostliny přestanou během senescence působit, nebo je naopak reakcí houby na látky, které se objevují právě během senescence a slouží houbě jako indikátory blížícího se opadu (Sieber, 2007).

Další nedořešenou otázkou je, zda je kolonizace jediné buňky strategií běžnou i u endofytů na jiných hostitelích nebo dokonce v jiných pletivech, než je epidermis. Jinou

možnou růstovou formou jsou intercelulární tenkostěnné améboidní stélky, jaké byly pozorovány u *Ophiostoma novo-ulmi* za určitých experimentálních podmínek (Ouelette et al., 1995, in Sieber, 2007).

U endofytů, kteří infikují cévní svazky, se předpokládá, že vytvářejí kvasinkovité buňky nebo jiné drobné infekční jednotky (např. artrospory), které mohou být roznášeny xylémem a šířit se po celé dřevině. Izoláty z různých částí hostitele jsou pak geneticky identické, přestože jednotlivá mycelia jsou omezeného rozsahu (Hendry et al., 1993).

Striktní endofyté

Existence endofytických hub, které jsou po celý životní cyklus skryté uvnitř hostitele a šíří se pouze semeny na další generaci je dobře známá u trav. Jejich přítomnost v jiných skupinách rostlin je vzácná nebo přehlížena.

U rostliny *Ipomea asarifolia* z čeledi Convolvulaceae byla objevena symbióza s houbou z čeledi Clavicipitaceae. Stejně jako Clavicipitaceae u trav, i tato je šířena semeny a produkuje alkaloidy (Kucht et al., 2004, in Rudgers & Clay, 2007).

Určité indicie naznačují, že by se striktní endofytismus mohl vyskytovat i u některých skupin hub z čeledi Botryosphaeriaceae.

V molekulárně fylogenetických studiích endofytických hub z různých hostitelů se objevuje samostatná větev sesterská k *Botryosphaeria ribis* a obsahující výlučně houby nalezené jako endofyty (Higgins et al., 2007; Hoffman & Arnold, 2008; Arnold et al., 2007). To může (ač nemusí) znamenat, že se tyto houby jinak, než jako endofyté, nevyskytují.

Výskytu striktního endofytismu u čeledi Botryosphaeriaceae odpovídá i skutečnost, že byly nalezeny i v semenech a velmi pravděpodobně byly těmito semeny přenášeny na další generaci hostitelských rostlin (Gure et al., 2005, in Slippers & Wingfield, 2007). Systémová infekce hostitele (včetně semen) je prvním krokem na cestě vedoucí ke striktním endofytům.

Botryosphaeria dothidea a *Neofusicoccum* spp., jejichž výskyt v eukalyptech na různých lokalitách byl zkoumán, jsou mnohem hojnější v hostitelských rostlinách vysazených mimo přirozenou oblast výskytu, než v rostlinách rostoucích v jejich původní domovině. To může být interpretováno dvěma protichůdnými způsoby. Buď jako projev oslabení rostliny nepříznivými podmínkami cizího prostředí, v jehož důsledku není rostlina schopna zabránit houbě v infekci, nebo jako důsledek schopnosti těchto hub přenášet se i semeny a využít uvolněné niky. V oblastech mimo areál přirozeného výskytu hostitele totiž nejsou přítomny spory saprotrofních či patogenních hub schopných daného hostitele infikovat, které v oblastech přirozeného výskytu vertikálně se šířícím endofytům konkurují (Slippers & Wingfield, 2007).

Zdá se, že v čeledi Botryosphaeriaceae se vyskytuje celé spektrum strategií od patogenů a saprotrofů až po striktní endofyty včetně mnoha přechodných typů. Tyto úvahy jsou ale zatím pouhými spekulacemi. To, že zmiňovaná skupina sesterská k *Botryosphaeria ribis* neobsahuje jiné, než endofytické zástupce, může být artefakt způsobený nedostatkem sekvencí od saprotrofních nebo slabě patogenních hub a přítomnost endofytů v semenech nemusí být nutně

důsledkem systémové infekce, ani nemusí vést k následné infekci semenáčků.

Dalším kandidátem na systémového endofyta dřevin je *Apiognomonium errabunda*, endofyt známý hlavně z listů buků, která byla nalezena ve třiceti procentech zkoumaných bukovic (Petrini et al., 1992).

Fakultativní patogeni

Houby s touto životní strategií se za normálních okolností na zdravém hostiteli chovají jako endofyté, tj. jejich přítomnost je asymptomatická. Za určitých okolností (nepříznivých pro hostitele nebo naopak příznivých pro houbu) se ale mohou chovat jako patogeni a způsobovat příznaky onemocnění. Spouštěčem, který vyvolá patogenní chování bývá nejčastěji sucho, ale může to být také mechanické poškození, napadení rostliny jinými (více agresivními) patogeny, mráz, nedostatek světla (v příliš hustém porostu) nebo nedostatek živin v půdě (Slippers & Wingfield, 2007).

Důvodem, proč za běžných podmínek choroba nepůsobí, je dlouhé období společné evoluce, jímž houby a jejich hostitelé prošli. Dlouhodobě mohly přežít pouze takové houby, které nevyhubily všechny své hostitele nebo které nezpůsobily příliš velký selekční tlak, jímž by hostitele přinutily k vyvinutí přísných obranných mechanismů. V typickém případě houba ani po vypuknutí choroby nezabije hostitele celého. Spouštěcí mechanismy jsou obvykle vyladěny tak jemně, aby se poškození omezilo např. jen na jednu větev nebo na určitý podíl listů. Tak například je-li houba aktivována nedostatkem slunečního záření dopadajícího na hostitelská pletiva, je pravděpodobné, že onemocnění se projeví jen ve spodních částech koruny, zatímco horní část, která má větší přísun světla, zůstane nepoškozená (Sieber, 2007).

Někdy ale regulační mechanismy selžou a choroba propukne v celé rostlině nebo v celé populaci. Příklady takových epidemií byly zaznamenány u některých fakultativně patogenních druhů z čeledi Botryosphaeriaceae. Náhlé hromadné odumírání stromů může působit dojmem, že patogen byl neočekávaně zavlečen a rychle se šíří; ve skutečnosti ale byl původce onemocnění už dávno přítomen uvnitř stromů a jeho náhlá velkoplošná aktivace byla způsobena nějakým stresovým faktorem, jemuž je celá populace vystavena – zpravidla extrémním suchem. Ze stejného důvodu také dochází k velkým ekonomickým ztrátám na plantážích dřevin vysazených mimo přirozenou oblast výskytu (Slippers & Wingfield, 2007).

Stejně mechanismy mohou být také důvodem, proč v extrémních biotopech (v oblastech častého sucha nebo naopak v bažinatých oblastech) je obvykle v rostlinách menší hustota a menší diverzita endofytů, než např. v pralesích (Petrini et al., 1992). V takových oblastech by totiž k aktivaci fakultativních patogenů docházelo příliš často a v příliš velkém rozsahu a rostliny tudíž musely vyvinout mnohem přísnější obranné mechanismy – často takové, které houby zastaví ještě před proniknutím do hostitele.

Dá se říci, že většina endofytů jsou takové houby, proti nimž se rostlina brání omezením

jejich růstu a nikoli zamezením jejich vstupu. Projevuje se to například v rozdílu mezi infekčními schopnostmi bezprostředních patogenů a fakultativních patogenů jehlic. Agresivní bezprostředně patogenní houby jsou obvykle schopny infikovat pouze mladé jehlice, jejichž obranné mechanismy dosud nejsou plně vyvinuty. Naproti tomu fakultativně patogenní endofyty mají schopnost pronikat do jehlic nezávisle na jejich věku. Cenou, kterou platí za „vpuštění“, je omezení růstu. Předpokládá se, že tyto endofyty obnoví růst a způsobí opad jehlic poté, co jejich množství přesáhne určitou mezní hodnotu. V podmínkách vhodných pro růst hostitele není této hodnoty dosaženo dříve, než nastává přirozený opad, v nepříznivých podmínkách ale může být překročena dříve (Sieber, 2007).

Ve stínu pod korunovým zápojem jsou infekce endofyty hojnější, než na světlinách (Arnold & Herre, 2003, in Hoffman & Arnold, 2008; Helander et al., 1994, in Sieber, 2007). Sieber (2007) to považuje za důsledek vnějších podmínek příznivějších pro houby (např. vyšší vlhkost) a domnívá se, že poté, co množství infekcí dosáhne mezní hodnoty, způsobí opad. Tím jednak získají substrát pro saprotrofní fázi svého životního cyklu a jednak zbavují rostlinu neproduktivních orgánů, které spotřebují víc asimilátů, než samy vytvoří (tzv. parazitická biomasa). Tento model ale přinejmenším neodpovídá pravidlu Occamovy břitvy (Nejsprávnější řešení je to nejjednodušší.). Je mnohem pravděpodobnější, že velké množství infekcí je důsledkem oslabení zastíněných jehlic (strom neinvestuje do ochrany orgánů, které se mu nevyplácejí) a že strom sám navozuje opad, když pozná, že jehlice jsou ztrátové (Mikát, osobní sdělení).

Houby, které jsou aktivovány mechanickým poškozením hostitelské rostliny obvykle ve skutečnosti reagují na chemické změny. Ve zdravém hostiteli je taková houba omezoována nedostatkem kyslíku, dusíku nebo jiných potřebných látek. Mechanickým poškozením pletiva se dostupnost těchto látek zvýší a umožní houbě obnovit růst.

Typickým příkladem takové houby je *Fomes fomentarius*. Tato houba proniká do hostitelské dřeviny (většinou břízy nebo buku) skrze listové jizvy a kolonizuje xylém, ale po mnoho let může zůstat latentní a žít uvnitř stromu jako endofyt. Pokud ale dojde k popraskání větví (např. v důsledku silného větru), skrze miniaturní praskliny pronikne k houbě kyslík. Na tuto změnu chemismu houba zareaguje změnou životního stylu z endofyta na nekrotrofního parazita (Baum et al., 2003, in Sieber, 2007).

Fakultativní patogeni mohou být v některých situacích pro hostitelskou rostlinu i prospěšní. Například jedním z podnětů, který aktivuje fakultativně patogenního endofyta rodu

Apiognomonina, který způsobuje antraknózu, je nakladení vajíček hálkotvorného hmyzu do infikovaného listu. Po aktivaci *Apiognomonina* způsobí nekrózu napadeného listu, čímž herbivora připraví o potravu a tím ho zahubí. Újma, kterou rostlina utrpí ztrátou listu je vyvážena užitkem v podobě omezení populace jejího hmyzího škůdce (Pehl & Butin, 1994, in Sieber, 2007). *Apiognomonina* však nemůže být považována za mutualistického symbionta, neboť ovipozice hálkotvorného hmyzu je jen jedním z mnoha možných podnětů, které mohou vyvolat projevy choroby. Například v důsledku vlhkého teplého jara může *Apiognomonina* způsobit rozsáhlé škody, které jsou z pohledu hostitelské rostliny zcela zbytečné (Butin, 1983, in Sieber, 2007).

Houba, která na jednom hostiteli přijímá latentní endofytický stav, může být pro jiného hostitele agresivním patogenem. Je to způsobeno buď odlišným chováním houby v reakci na hostitele nebo nedostatečnou regulací ze strany rostliny. Takové případy se objevují obvykle poté, co je houba zavlečena do oblastí mimo svůj přirozený areál výskytu. Tam se setká s potenciálními hostiteli, s nimiž neprošla společným vývojem a s nimiž tudíž neumí komunikovat. Důsledkem mohou být rozsáhlé epidemie a drastický pokles hostitelských populací, jako se to stalo v případě tracheomykózy jilmů. Zabránit zavlečení takových hub je ale obtížné, protože na přirozeném hostiteli onemocnění nezpůsobují a karanténa tudíž neodhalí jejich přítomnost (Slippers & Wingfield, 2007).

Primární dekompozitoři

Do této kategorie patří kompetičně slabé saprotrofní houby, zejména zástupci vřeckovýtrusých hub. Období, kdy mají příležitost využívat svůj substrát, je velice krátké, neboť záhy po opadu jsou vytlačeny kompetičně zdatnějšími stopkovýtrusými houbami. Aby tuto krátkou příležitost nepromeškaly, adaptovaly se na endofytický způsob života, takže jsou v substrátu přítomny již předem.

Rychlost sukcese byla dokumentována na jedlových jehlicích, kde bylo společenstvo endofytů-primárních dekompozitorů úplně nahrazeno společenstvem saprotrofů typických pro opad během dvou měsíců po opadu jehlic (Canavesi, 1987, in Petrini et al., 1992).

Někdy je velmi těžké rozhodnout, zda danou houbu považovat za primárního dekompozitora nebo slabého patogena. Např. *Rhodocline parkeri* z douglasky, která byla popsána v kapitole o rozsahu kolonizace, obnovuje růst těsně před opadem jehlic, nikoli až po opadu. To jí umožňuje zadržet pro sebe živiny, které by hostitelská rostlina jinak z jehlic odtransportovala a použila pro vlastní potřebu. Jelikož infekce *Rhodocline* jsou sice malé, ale velmi početné, může to strom celkově oslabovat (Stone, 1987).

I mezi jednotlivými druhy endofytů je velká variabilita ve schopnosti obstát v kompetici o opad. Např. *Lophodermium piceae*, které zaujímá podobnou niku ve smrkových jehlicích, jakou má *Rhodocline parkeri* v jehlicích douglasky, tvoří 90 % endofytů izolovaných ze zelených jehlic. Tomu ale zdaleka neodpovídá jeho podíl na rozkladu jehlic v opadu, kde je často přerůstáno jinými druhy endofytů. Tyto houby, např. *Sclerophoma pythiophila* nebo *Tiarospora parca*, jsou sice méně hojné jako endofyté, ale jsou po opadu schopny ty jehlice, v nichž jsou přítomny, efektivně kolonizovat. *Lophodermium* evidentně sází na kvantitu. Přítomnost mnoha drobných infekcí v každé jehlici mu zaručuje, že alespoň v části jehlic bude jediným přítomným druhem a bude tak mít příležitost vysporulovat (Müller et al., 2001).

Zajímavou skupinou endofytů-saprotrofů jsou tzv. felofyté. Tyto houby v živých hostitelích nekolonizují živá pletiva, nýbrž odumřelá pletiva borky. Jsou tedy vlastně saprotrofy i v „endofytické“ fázi svého životního cyklu (Kowalski & Kehr, 1996). Teprve poté, co hostitelská dřevina nebo její část (např. nalomená větev) odumře, mohou felofytické houby kolonizovat i okolní dřevo (Griffith & Boddy, 1990). Jelikož tyto houby nemají schopnost pronikat do živých pletiv, je pravděpodobné, že (na rozdíl např. od výše zmiňovaných

primárních dekompozitorů jehlic) nepůsobí jako patogeni. Potenciální patogeni totiž zpravidla vykazují schopnost živé buňky zabíjet a chovat se jako nekrotrofní parazité (Kowalski & Kehr, 1996; Hendry et al., 1993).

Mezi felofytické houby patří např. *Phomopsis platanoidis* a *Fusarium lateritium* na jasanu nebo *Phomopsis quercella* a *Xylaria* sp. na buku (Griffith & Boddy, 1990).

Stejně jako jiní primární dekompozitoři, i felofyté jsou brzy nahrazeni jinými saprotrofními houbami (na jasanu hlavně *Acremonium* sp., *Libertella fraxinea* a *Peniophora lycii*), které jsou kompetičně schopnější (Griffith & Boddy, 1998).

Jak ukázal výzkum dekompozice jasanových, bukových a dubových větví, klíčový vliv na to, jaké houby budou odumřelé dřevo kolonizovat, má zřejmě vlhkost substrátu. Zatímco v laboratorních podmínkách dominovaly na všech třech druzích dřevin *Daldinia* sp. a *Xylaria* spp., na odumřelých větvích v přírodě nebyly tyto houby pozorovány. Srovnání vlhkostních poměrů ukázalo, že i přes snahu udržovat větve v laboratoři ve vlhku, vysychaly tam mnohem rychleji, než větve sledované v přírodě (Griffith & Boddy, 1990). Naděje konkrétního druhu houby na úspěšnou kolonizaci odumřelého dřeva tedy zřejmě závisí na klimatických poměrech lokality, pozici v koruně, hustotě okolního porostu a na počasí v době, kdy větev odumřela.

Jak je to s mutualismem?

Na základě poznatků o travních endofytech, kteří jsou mutualistickými symbionty a mají velký význam pro úspěch svých hostitelů, se dlouhou dobu všeobecně předpokládalo, že i ostatní endofyty jsou svým hostitelům prospěšné. Tuto hypotézu podporovaly i výsledky několika studií o vlivu endofytických hub na mortalitu herbivorního hmyzu. V posledních letech se od tohoto zjednodušujícího pohledu upouští a většina autorů vnímá endofyty jako heterogenní skupinu zahrnující kontinuum životních strategií od parazitů přes komenzály až po houby, které opravdu lze považovat za mutualisty (Sieber, 2007). Mutualistické vztahy mezi endofytickými houbami a jejich hostitelskými rostlinami se tedy vyskytují, ale jejich podíl a význam bývá obvykle nadhodnocován.

Nejčastější předpokládanou formou mutualismu je ochrana rostlin před herbivorním hmyzem. Tyto interakce bývají obvykle zkoumány na larvách hálkotvorného nebo minujícího hmyzu, neboť ty po celou dobu vývoje setrvávají v jediném listu, takže lze snadno monitorovat, jaké vlivy na ně působí (Faeth, 1997).

Stejně jako mnoho jiných aspektů života endofytických hub, i antagonismus vůči herbivornímu hmyzu byl asi nejlépe popsán u *Rhabdocline parkeri*. Zatímco konidie, které dopadnou na zdravé jehlice, pozastaví růst a přejdou do několikaletého latentního stadia, ty „šťastnější“, které se dostanou na povrch hálky vyvolané muškou rodu *Contarinia*, ji kolonizují a během měsíce začnou sporulovat. Infikované hálky jsou po několik měsíců bohatým zdrojem konidií. Mortalita larev v hálkách infikovaných *Rhabdocline parkeri* je výrazně větší, než v hálkách bez infekce. Zdá se tedy, že rostlina v pletivech ovlivněných hálkotvorným hmyzem rostlina houbu toleruje a houba na oplátku snižuje množství těchto parazitů (Carroll, 1986).

Spornější výsledky přinesl výzkum endofytických hub a minujícího hmyzu na dubech v křovinatých oblastech Arizony. Endofytické houby nevykazovaly žádný vliv na mortalitu larev v minách. Pokusy s umělým zvyšováním množství endofytů v hálkách ale ukázaly, že houby zpomalují vývoj larev a zvyšují tak jejich mortalitu nepřímo. Larva, která nedospěje před opadem listů, se totiž dospělosti nedožije. Pozitivní efekt endofytických hub se tedy projevuje teprve v dlouhodobějším měřítku: houba nezabrání konzumaci konkrétního listu, ale z dlouhodobého pohledu snižují endofyty populaci minujících herbivorů (Faeth, 1997 a, b). Z toho důvodu mutualismus působí spíše na úrovni populací, než na úrovni jedinců, a na straně hostitelských rostlin se pravděpodobně uplatňuje příbuzenský altruismus: drobné ztráty pro konkrétního jedince způsobené tolerovanou přítomností endofytických hub přinášejí užitek

celé populaci (Carroll, 1986).

Významná antagonistická interakce mezi endofytickou houbou a herbivorním hmyzem byla objevena při epidemiologickém výzkumu tracheomykózy jilmů. V jižním Walesu byly pozorovány populace jilmů, které sice obsahovaly stromy napadené tracheomykózou, ale choroba se v nich nešířila. Po jejich prozkoumání se ukázalo, že vývoj kůrovců, hlavních přenašečů tracheomykózní houby *Ceratocystis ulmi*, je v napadených stromech omezován endofytickou houbou *Phomopsis oblonga*, která se rozrůstá v kůře okolo jejich chodbiček. *Phomopsis* tím, že brání kůrovcům ve vývoji, chrání celou populaci jilmů, neboť po dosažení dospělosti by kůrovci osídlili další stromy a roznesli na ně inokulum *Ceratocystis* (Webber, 1981).

Mutualismus endofytů vůči jejich hostitelským rostlinám může mít také podobu antagonismu vůči jiným mikroorganismům. U mnoha kmenů endofytických hub byla pozorována produkce antibioticky aktivních látek (Fischer et al., 1984, in Petrini et al., 1992).

Např. *Fusarium moniliforme*, endofytická houba z kukuřice, brání patogennímu druhu *Aspergillus flavus* v napadání klasů (Wicklów et al., 1988, in Petrini et al., 1992).

Semenáčky kakaovníku inokulované endofytickými houbami vykazují větší odolnost, jsou-li vystaveny patogennímu chromalveolátu rodu *Phytophthora*, než kontrolní semenáčky bez endofytů (Arnold et al., 2003, in Sieber, 2007).

Antagonismus byl zaznamenán také mezi endofyticko-saprotrofním zástupcem rodu *Lophodermium* – *Lophodermium conigenum* – a jeho fytopatogenním protějškem *Lophodermium seditiosum*, jejichž výskyt na borových jehlicích se vzájemně vylučuje (Minter, 1981, in Carroll, 1986).

Další formou mutualismu, která tentokrát nezahrnuje antagonismus vůči žádnému jinému organismu, je symbiózou vyvolaná termotolerance. Tento fenomén byl pozorován na symbióze endofytické houby *Curvularia* sp. s její hostitelskou rostlinou *Dichanthelium lanuginosum*. *Dichanthelium lanuginosum* roste na termálních půdách (např. v národním parku Yellowstone), jejichž teplota může dosahovat až 50 °C. *Curvularia* sp. byla izolována jako endofyt z kořenů této rostliny. Pokusy s tímto druhem houby pěstovaným v čisté kultuře ukázaly, že mimo hostitelskou rostlinu není schopen přežít teploty vyšší, než 40 °C. Zároveň i hostitelské rostliny vypěstované bez endofytických hub při 50 °C začínaly sesychat, zatímco rostliny inokulované endofytem *Curvularia* sp. snášely i teplotu 65 °C působící po dobu 10 dní. Jako možný mechanismus vysvětlující indukovanou termotoleranci byla navržena produkce melaninu

houbou a následné rychlejší uvolňování tepla do prostředí pomocí této látky (Redman et al., 2002).

Evolve a diverzita

Jak již bylo řečeno, většina endofytických hub patří mezi vřeckovýtrusé a to hlavně do tříd Dothideomycetes, Sordariomycetes a Leotiomycetes.

Je zajímavé, že doba, kdy se rozdělily evoluční linie vedoucí k třídám Sordariomycetes a Leotiomycetes, se zřejmě časově shoduje s obdobím divergence nahosemenných a krytosemenných rostlin. Řád Diaporthales patřící do třídy Sordariomycetes obsahuje většinu dominantních endofytů z krytosemenných rostlin, zatímco řád Helotiales z třídy Leotiomycetes obsahuje většinu hub dominujících v rostlinách nahosemenných. Je tedy pravděpodobné, že asociace s hostitelskými rostlinami byla klíčovým impulzem, který vedl k rozrůznění těchto dvou velkých skupin hub.

Jaká však byla povaha této původní interakce mezi předky dnešních endofytických hub a primitivními cévnatými rostlinami, to zůstává zahaleno tajemstvím. Za miliony let společného vývoje (předpokládá se, že k divergenci došlo zhruba před 300 miliony let v pozdním karbonu), vystavena radikálním změnám klimatu i nově se objevujícím vlivům herbivorního hmyzu, mohla tato symbióza mnohokrát změnit svůj charakter i směr evoluce a rozrůznit se na ohromující spektrum různých typů.

V malém měřítku lze tuto proměnlivost pozorovat např. na rodu *Lophodermium* asociovaném s jehličnany. Endofytičtí zástupci tohoto rodu z jednoho druhu hostitele jsou blíže příbuzní patogenním zástupcům napadajícím tentýž druh hostitele, než endofytickým zástupcům z jiného druhu dřeviny. V takové situaci je těžké nebo zcela nemožné vypátrat, jaká byla životní strategie jejich společného předka.

Zástupci řádů Pleosporales, Dothideales a Mycosphaerellales (třída Dothideomycetes) jsou mezi krytosemenné a nahosemenné rostliny rozděleni celkem rovnoměrně, což odpovídá časnému oddělení této evoluční linie ještě před rozrůzněním rostlin. Na nižší taxonomické úrovni se však i u těchto skupin dá vysledovat určitá specializace, např. zástupci čeledi Botryosphaeriaceae jsou mnohem častější na krytosemenných hostitelích než na nahosemenných.

Zajímavé je, že u čeledi cypřišovitých, ač patří mezi nahosemenné, jsou endofytické houby z třídy Leotiomycetes nalézány jen zřídka. Mnohem hojnější jsou zástupci třídy Sordariomycetes, jinak charakterističtí pro krytosemenné, a nejhojnějšími endofyty těchto dřevin jsou druhy z třídy Dothideomycetes. Na posouzení významu takových výjimek je však ještě příliš brzy, neboť fylogenetické souvislosti mezi houbami a rostlinami byly zatím

načrtnuty jen v hrubých obrysech (Hoffman & Arnold, 2008; Slippers & Wingfield, 2007; Sieber, 2007; Higgins et al., 2007).

Předběžné informace o diverzitě endofytických hub v různých hostitelích a o jejich hostitelské specifitě lze využít i pro úvahy o celkovém počtu druhů hub. Většina druhů hostitelských rostlin hostí kromě generalistů i několik hostitelsky specifických druhů endofytů. Množství cévnatých rostlin je odhadováno na 250 000 – 300 000 druhů. Za předpokladu, že průměrný počet druhově specifických endofytických hub je dva druhy endofytů na jeden druh rostliny, existuje na světě 500 000 – 600 000 druhů endofytických hub. V současnosti je popsáno asi 80 000 druhů hub, z toho 36 000 mikroskopických zástupců asociovaných s rostlinami. 565 000 tedy nejspíš čeká uvnitř rostlin na své objevení (Schmit & Mueller, 2007, in Sieber, 2007). Někteří autoři odhadují celkový počet endofytů dokonce na 1,3 milionu druhů (Dreyfuss & Chapela, 1992, in Petrini, 1992).

Závěr

Endofytické stadium vyskytující se v životním cyklu mnohých hub může být svým významem přirovnáno k tahu ptáků. Je to významné a zajímavé období v jejich životě, jehož existence po dlouhou dobu unikala pozornosti vědců.

V posledních 20 – 30 letech se výzkum endofytismu stal módním trendem a nashromáždilo se velké množství prací na toto téma. Bohužel, některé aspekty života endofytů bývají opomíjeny. Zarážející je například to, jak málo informací máme o rozsahu kolonizace. Přitom tyto znalosti jsou nezbytné pro smysluplné úvahy o mutualismu či parazitismu, o fyziologické a komunikační regulaci i o významu endofytické fáze pro houby samotné.

Přetrvává také mnoho předsudků plynoucích z rostlinocentrického pohledu na problematiku této symbiózy. Jedním z takových předsudků je i častý automatický předpoklad, že endofytické houby jsou mutualisté. Lidé mají sklony vnímat houby jako faktor prostředí působící na rostliny, nikoli jako svébytné organismy se složitou sítí vztahů s nejrůznějšími složkami okolního světa. Zapomínají, že houby mají mnohem větší vliv samy na sebe, než na hostitelskou rostlinu.

Děkuji

- 1) Svému školiteli Karlu Prášilovi za nesmírnou ochotu a vstřícnost a za včasné umožnění přístupu k rychlovarné konvici, která mě v zimních měsících mnohokrát zachránila před jistou smrtí.
- 2) Členům oddělení bezcévných rostlin a zejména mykologické pracovní skupině za to, že mi byli následovánímhodným příkladem.
- 3) Žábě Konvalinkové za milou společnost.
- 4) Davidovi Novotnému za poskytnutí mnoha zajímavých článků.
- 5) Mirkovi Kolaříkovi za inspirativní podněty.
- 6) Duchovi A. C. J. Cordy, který bdí nad všemi mykology.
- 7) SJJOTP za morální podporu a za připomínání, že věda je krásná.
- 8) Zdeňkovi Janovskému za tolik věcí, že by to vydalo na samostatnou bakalářku.
- 9) Kompotu, Knedlíku, Koláči, Kolínkám, Mlíku, Erlenkám, Agarů, Mandarince, Sýru, Zelené hmotě, Pomazánce, Čaji, Dřívkům a Bagetě za dobré rodinné zázemí.
- 10) Velké Rorippě za všestrannou podporu.
- 11) Františku Šustovi, který mi před pěti lety taktně naznačil, že jestli se chci dostat na Přírodovědu, neměla bych propadat z chemie.
- 12) *Rhodocline parkeri*, že na sobě nechala vyzkoumat tolik zajímavých věcí.
- 13) Pepovi Lhotskému, za formulaci „Pepovy břitvy“.
- 14) Počasí, že bylo po většinu doby, kdy jsem tuto práci psala, mizerné a tudíž podlamovalo mou pracovní morálku méně, než kdyby svítilo sluníčko.
- 15) A Standovi Vosolsobě za technickou pomoc, morální podporu a zejména za četné inspirativní rozhovory o tajemstvích přírody a možnostech současné vědy tato tajemství odhalovat.

Literatura

Arnold,A.E., Mejia,L.C., Kylo,D., Rojas,E.I., Maynard,Z., Robbins,N., and Herre,E.A. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:15649-15654.

Arnold,A.E. and Herre,E.A. (2003) Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* **95**:388-398.

Arnold,A.E., Henk,D.A., Eells,R.L., Lutzoni,F., and Vilgalys,R. (2007) Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* **99**:185-206.

Baum,S., Sieber,T.N., Schwarze,F.W.M.R., and Fink,S. (2003) Latent infections of *Fomes fomentarius* in the xylem of European beech (*Fagus sylvatica*). *Mycological progress* **2**:141-148.

Bills,G.F. and Polishook,J.D. (2000) Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyoides*. *Sydowia* **44**:1-15.

Bissegger,M. and Sieber,T.N. (1994) Assemblages of Endophytic Fungi in Coppice Shoots of Castanea-Sativa. *Mycologia* **86**:648-655.

Butin,H. (1983) *Krankheiten der Wald- und Parkbäume*. Stuttgart.

Cabral,D., Stone,J.K., and Carroll,G.C. (1993) The Internal Mycobiota of Juncus Spp - Microscopic and Cultural Observations of Infection Patterns. *Mycological Research* **97**:367-376.

Canavesi, F. Beziehungen zwischen Endophytischen Pilzen von *Abies alba* Mill. und den Pilzen der Nadelstreue. 1987. Swiss Federal Institute of Technology.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Carroll,G. (1983) Patterns of Substrate Utilization by Some Fungal Endophytes from Coniferous Foliage. *Mycologia* **75**:53-63.

Carroll,G.C. (1986) The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In *Microbiology of the phyllosphere*, N.J.Fokkema and J.van den Heuvel, eds pp. 205-222.

de Bary,A. (1866) Morphologie und Physiologie der pilze, Flechten und Myxomyceten. In *Hofmeister's Handbook of Physiological Botany*, (Leipzig).

Dreyfuss,M.M. and Chapela,I.H. (1992) The potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. In *The Discovery of Novel Natural Products with Therapeutic Potential*.

Faeth,S.H. (1997) Fungal endophytes in oak trees: Experimental analyses of interactions with leafminers. *Ecology* **78**:820-827.

Faeth,S.H. (1997) Fungal endophytes in oak trees: Long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology* **78**:810-819.

Fischer,P.J., Anson,A.E., and Petrini,O. (1984) Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. *Botanica Helvetica*.

Gange,A.C. (1996) Positive effects of endophyte infection on sycamore aphids. *Oikos* **75**:500-510.

Ganley,R.J. (2006) Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* **110**:318-327.

Griffith,G.S. (1988) Fungal Communities in Attached Ash (*Fraxinus-Excelsior*) Twigs. *Transactions of the British*

Mycological Society **91**:599-606.

Griffith,G.S. (1990) Fungal Decomposition of Attached Angiosperm Twigs .1. Decay Community-Development in Ash, Beech and Oak. *New Phytologist* **116**:407-415.

Gure,A., Slippers,B., and Stenlid,J. (2005) Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp nov. *Mycological Research* **109**:1005-1014.

Hendry,S.J. (1993) Interactions Between Callus-Cultures of European Beech, Indigenous Ascomycetes and Derived Fungal Extracts. *New Phytologist* **123**:421-428.

Higgins,K., Arnold,A., and Miadlikowska (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. and Arnold,A.E. (2008) Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research* **112**:331-344.

Kowalski,T. and Kehr,R.D. (1992) Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia* **44**:137-168.

Kowalski,T. and Kehr,R.D. (1996) Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species. In *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*, S.C.Redlin and L.M.Carris, eds.

Kucht,S., Gross,J., Hussein,Y., Grothe,T., Keller,U., Basar,S., Konig,W.A., Steiner,U., and Leistner,E. (2004) Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides. *Planta* **219**:619-625.

Luchi,N., Ma,R., Capretti,P., and Bonello,P. (2005) Systemic induction of traumatic resin ducts and resin flow in Austrian pine by wounding and inoculation with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Planta* **221**:75-84.

Lygis,V., Vasiliauskas,R., Larsson,K.H., and Stenlid,J. (2005) Wood-inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. *Scandinavian Journal of Forest Research* **20**:337-346.

Minter,D.W. (1981) Possible biological control of *Lophodermium seditiosum*. In *Current Research on Conifer Needle Diseases*, C.S.Millar, ed.

Mueller,G.M. and Schmit,J.P. (2007) Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation* **16**:1-5.

Mueller,G.M., Schmit,J.P., Leacock,P.R., Buyck,B., Cifuentes,J., Desjardin,D.E., Halling,R.E., Hjortstam,K., Iturriaga,T., Larsson,K.H., Lodge,D.J., May,T.W., Minter,D., Rajchenberg,M., Redhead,S.A., Ryvardeen,L., Trappe,J.M., Watling,R., and Wu,Q.W. (2007) Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation* **16**:37-48.

Muller,M.M., Valjakka,R., Suokko,A., and Hantula,J. (2001) Diversity of endophytic fungi of single Norway spruce needles and their role as pioneer decomposers. *Molecular Ecology* **10**:1801-1810.

Novotný,D. (2004) Endofytické houby rostlin. *Mykologické listy*.

Ouellette,G.B., Methot,N., Champerland,H., Cote,C., and Lafontaine,J.-G. (1995) Cytology of irregular growth forms of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* growing through millipore filter membranes and sterilized elm wood sections. *Canadian Journal of Microbiology* **41**:1095-1110.

Pehl,L. and Butin,H. (1994) Endophytische Pilze in Blättern von Laubbäumen und ihre Beziehungen zu Blattgallen (Zooecidien). *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* **297**:1-56.

- Perfect,S.E., O'Connell,R.J., Green,E.F., Doering-Saad,C., and Green,J.R.** (1998) Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the Colletotrichum-bean interaction. *Plant Journal* **15**:273-279.
- Peters,S., Draeger,S., Aust,H.J., and Schulz,B.** (1998) Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia* **90**:360-367.
- Petrini,O., Sieber,T.N., Toti,L., and Viret,O.** (1992) Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*.
- Petrini,O.** (1996) Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi. In *Endophytic Fungi in Grasses and Woody plants*, S.C.Redlin and L.M.Carris, eds pp. 87-100.
- Redman,R., Sheehan,K., Stout,R., Rodriguez,R., and Henson,J.** (2002) Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* **298**.
- Salgado,C., Cepero,M.C., Realpe,E., and Restrepo,S.** (2007) Histological analyses of the fungal endophytes in *Rosa hybrida*. *Revista Iberoamericana de Micología* **24**:323-324.
- Schmit,J.P. and Mueller,G.M.** (2007) An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* **16**:99-111.
- Schulz,B.** (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**:661-686.
- Sieber,T.N.** (1989) Endophytic Fungi in Twigs of Healthy and Diseased Norway Spruce and White Fir. *Mycological Research* **92**:322-326.
- Sieber,T.N., Siebercanavesi,F., and Dorworth,C.E.** (1991) Endophytic Fungi of Red Alder (*Alnus-Rubra*) Leaves and Twigs in British-Columbia. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **69**:407-411.
- Sieber,T.N.** (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal biology reviews* **21**:75-89.
- Sinclair,J.B. and Cerkauskas,R.F.** (1996) Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*, S.C.Redlin and L.M.Carris, eds pp. 3-29.
- Slippers,B. and Winfield,M.J.** (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews* **21**:90-106.
- Smith, H. Biology of *Botryosphaeria dothidea* and *Sphaeropsis sapinea* as endophytes of Eucalypts and Pines in South Africa. 2001. University of Pretoria.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Stone,J.K.** (1987) Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations of uninfected epidermal cells. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **66**:45-54.
- Stone,J.K., Bacon,C.W., and White,J.F.** (2000) An Overview of endophytic Microbes: Endophytism Defined. In *Microbial Endophytes*, C.W.Bacon and J.F.White, eds pp. 3-29.
- Toti,L., Viret,O., Chapela,I.H., and Petrini,O.** (1992) Differential Attachment by Conidia of the Endophyte, *Discula-Umbrella* (Berk and Br) Morelet, to Host and Nonhost Surfaces. *New Phytologist* **121**:469-475.
- Webber,J.** (1981) A Natural Biological-Control of Dutch Elm Disease. *Nature* **292**:449-451.
- Wicklow,D.T., Horn,B.W., Shotwell,O.L., Hesseltine,C.W., and Caldwell,R.W.** (1988) Fungal Interference with *Aspergillus-Flavus* Infection and Aflatoxin Contamination of Maize Grown in A Controlled Environment. *Phytopathology* **78**:68-74.