

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin



**Dark Septate Endophytes – všudypřítomní endofyté
kořenů rostlin se stále opomíjeným ekofyziologickým
potenciálem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tereza Lukešová

Školitel: Martin Vohník

Praha 2010

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Martin Vohník, Ph.D. (Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK & Oddělení mykorhizních symbióz BÚ AVČR v.v.i.)

Konzultantka bakalářské práce:

doc. RNDr. Jana Albrechtová, Ph.D. (Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK & Oddělení mykorhizních symbióz BÚ AVČR v.v.i.)

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Dr. Martina Vohníka a doc. Jany Albrechtové a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze dne 28. 4. 2010

Tereza Lukešová

Použité zkratky

DSE – z anglického „dark septate endophytes“

PAC – z anglického „*Phialocephala fortinii* – *Acephala applanata* species complex“

AM – arbuskulární mykorhiza

AMF – arbuskulárně mykorhizní houby

ErM – erikoidní mykorhiza

ErMF – erikoidně mykorhizní houby

OrM – ochideoidní mykorhiza

EcM – ektomykorhiza

EcMF – ektomykorhizní houby

ISSR-PCR – z anglického „intersimple sequence repeat–polymerase chain reaction“

CSP – z anglického „cryptic species“

ITS – z anglického „internal transcribed spacer“

RFLP – z anglického „restriction fragment length polymorfism“

Děkuji svému školiteli Martinu Vohníkovi, konzultantce Janě Albrechtové a kolegovi Petru Kohoutovi za shovívavost, trpělivost a konstruktivní připomínky k mé práci.

Abstrakt

Všechny rostliny žijící v přirozených ekosystémech interagují s houbami – jejich symbiózy mohou být mutualistické, parazitické nebo neutrální. Nejrozšířenější mutualistická asociace s houbami se vyskytuje přibližně u 70 až 90% terestrických cévnatých rostlin a je nazývána mykorhizní symbiózou. Pravděpodobně ještě častější je endofytická symbióza, kdy houba kolonizuje živá rostlinná pletiva bez vyvolání silné obranné reakce rostliny. Tato bakalářská práce shrnuje některé starší, stejně jako i novější články a review o ekofyziologii nejrozšířenějších kořenových endofytů, tzv. *dark septate endophytes* (DSE), a o jejich vlivu na rostliny.

DSE jsou všudypřítomní kolonizátoři kořenů terestrických i vodních rostlin. Nejčastější DSE izolovaní z kořenů mnoha různých rostlin severní polokoule patří do komplexu *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* (PAC). Přestože některé PAC druhy mohou vytvářet ektomykorhizní struktury, většina z nich v kořeni žádné struktury podobné mykorhizním nevytváří. Namísto toho vytváří mezi- a vnitrobuněčná mikrosklerocia a převážně melanizované hyfy se ztlustlou buněčnou stěnou.

DSE na rozdíl od mykorhizní symbiózy nemusí ovlivňovat příjem živin hostitelem, ale mohou hrát roli v toleranci rostliny k suchu, extrémním teplotám a znečištění půdy těžkými kovy, a také v ochraně před patogeny a herbivory. DSE mohou působit na rostlinná společenstva ovlivňováním mykorhizních hub a jiných mikroorganismů v půdě okolo kořenů. Přestože se DSE vyskytují téměř u všech rostlinných čeledí a jsou schopni působit na fitness rostliny, je jejich ekologická role stále neprozkoumaná.

Klíčová slova

Interakce mezi houbami a rostlinami, Dark Septate Endophytes, komplex druhů *Phialocephala fortinii* – *Acephala applanata*, mykorhizní symbióza

Abstract

In natural ecosystems, all plants coexist with fungi. This results in various plant-fungus symbioses, either mutualistic, parasitic or endophytic. For example, the mycorrhizal symbiosis is a mutualistic association that occurs in ca 70 to 90 % of all terrestrial higher plants. Probably even more widespread association is endophytism, when a fungus colonizes different living plant tissues without causing a strong plant defense response. This bachelor's thesis summarizes some older as well as recent papers and reviews on the ecophysiology of the most widespread root endophytes, the Dark Septate Endophytes (DSE), and their impacts on plants.

DSE are ubiquitous root colonizers of terrestrial and aquatic plants. The most frequent DSEs isolated from the roots of different plants from Northern Hemisphere belong to the *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* species complex (PAC). Although some of the PAC species are able to form ectomycorrhizal structures, most of them do not form any mycorrhiza-like structures in the root. Instead, they form inter- and intracellular microsclerotia and mostly melanised septate hyphae with thick cell walls.

In contrast to the mycorrhizal symbiosis, DSE do not necessarily influence the host nutrient uptake, but they may play a role in plant drought, extreme temperature and heavy metal pollution tolerance and in protection against pathogens and herbivores. DSE may have impact on plant communities by affecting the mycorrhizal fungi and other microorganisms in the mycorrhizosphere. Even though DSE are present in almost all plant families and are able to influence plant fitness and whole plant communities, their ecological role is still largely unexplored.

Key words

Plant-fungus interaction, dark septate endophytes, *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* species complex, mycorrhizal symbiosis, ecophysiological function of dark septate endophytes

Poznámka něž začnete číst, zejména pro systematické mykology

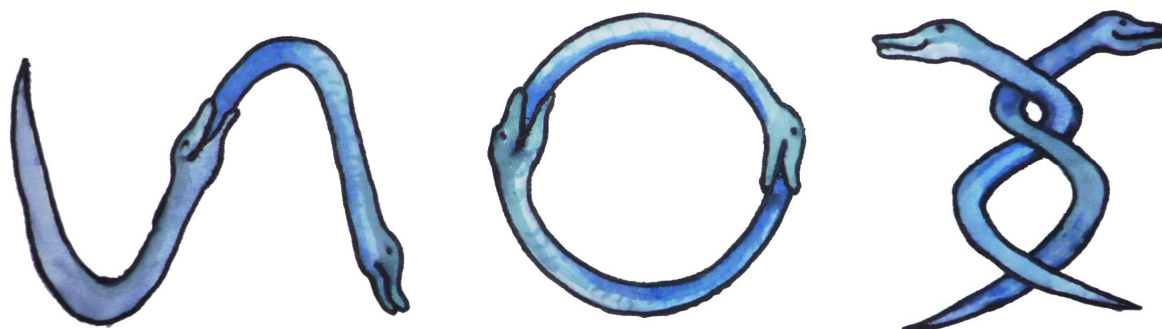
Nejvíce prozkoumaný DSE taxon *Phialocephala fortinii* byl v roce 2008 pomocí molekulárních technik rozdělen do několika druhů. Články publikované před tímto datem používají název „*P. fortinii*“ pro jeden konkrétní druh, i když se ve skutečnosti jedná o komplex druhů. Proto v takových případech používám označení „*P. fortinii* s.l.“, a to tehdy, jedná-li se o jeden konkrétní izolát ze skupiny PAC.

Obsah

Použité zkratky	3
Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract	5
Key words	5
Poznámka na okraj	6
Obsah	7
1. Úvod	8
2. Historie poznávání DSE	9
3. Zástupci DSE	10
3.1 Komplex druhů <i>Phialocephala fortinii</i> s.l. – <i>Acephala applanata</i>	10
4. Charakterizace DSE	12
4.1. Morfologie	12
4.2 Zařazení do systému	14
5. Hostitelské rostliny	15
5.1. Nahosemenné	15
5.2. Dvouděložné	16
5.3 Jednoděložné	17
6. Geografický výskyt DSE	17
7. Význam DSE pro hostitelskou rostlinu	18
7.1 Vliv DSE na příjem živin	19
7.2 Tolerance k suchu a extrémním teplotám	21
7.3 Vysoký obsah těžkých kovů v půdě	22
7.4 Ochrana před herbivory a patogeny	22
7.5 Ovlivnění složení rostlinných společenstev	23
8. Závěr	24
Seznam použité literatury	25

1. Úvod

Rostliny a houby spolu koexistují velice dlouhou dobu, pravděpodobně již od dob kolonizace souše (Selosse & Le Tacon, 1998) a za tuto dobu mezi nimi došlo k ustavení snad všech možných druhů symbióz – od parazitických po mutualistické. Jednou z nejrozšířenějších je mykorhizní symbióza, tedy oboustranně prospěšné soužití určité skupiny půdních hub a kořenů vyšších rostlin, kdy rostlina poskytuje houbě část svých asimilátů a houba zásobuje rostlinu živinami a vodou. Za nejstarší typ je považována arbuskulární mykorhizní symbióza (AM), která se vyvinula před přibližně 400 až 450 miliony let. Vznik ostatních mykorhizních symbióz jako je ektomykorhizní (EcM), erikoidní (ErM) nebo orchideoidní (OrM) je datován na přelom Mesozoika a Kenozoika (Cairney, 2000). V rámci mykorhizní symbiózy došlo i k evoluci parazitických vztahů, parazitovat může jak houba na rostlině, tak rostlina na houbě, jak je tomu např. u mykoheterotrofních rostlin, které samy nejsou schopny fotosyntézy a jsou zcela závislé na uhlíku z okolních fotosyntetizujících rostlin, který získávají prostřednictvím sdílených mykorhizních hub.



Obrázek 1. Schéma některých významných symbióz mezi houbou a rostlinou - parazitismus, mutualismus (balancovaný parazitismus), endofytismus

Neméně běžnou symbiózou rostlin a hub je endofytismus, tedy nesespecifické soužití, při kterém nejsou na první pohled pozorovány žádné vlivy houby na rostlinu – ani obranné reakce, které vyvolávají parazité, ani zlepšení zásobení živinami jako u mykorhizní symbiózy. Přesto však někteří endofyty vliv na své hostitele mají – mohou napomáhat v ochraně proti patogenům a herbivorům, zvyšovat toleranci ke stresovým podmínkám (např. vysoké teploty, nedostatek vody) a eventuálně se podílet na příjmu živin. Proto by bylo lépe kořenové endofyty definovat jako houby, které obývají živá rostlinná pletiva, ale nedochází u nich ke vzniku struktur typických pro mykorhizní nebo patogenní houby (Addy *et al.*, 2005). Koexistence mykobionta (houby) a fytobionta (hostitelské rostliny) se nazývá asociace.

Kořenoví endofyty, kteří mají tmavé přepážkované hyfy, jsou nazýváni *dark septate endophytes* (DSE) (Stoyke & Currah, 1991). Nejedná se o skupinu definovanou fylogeneticky, ale spíše ekologicky a anatomicko-morfologicky. Byli nalezeni nejen u většiny terestrických rostlin (Jumpponen & Trappe, 1998), ale také u rostlin rostoucích ve vodním prostředí (Sraj-Krzic *et al.*, 2006). Nejdůležitějšími zástupci DSE jsou houby z komplexu *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* (PAC; z angl. *P. fortinii* – *A. applanata* species complex), kteří se svými hostiteli vytvářejí parazitické, neutrální i mutualistické charakteristiky symbiózy v závislosti na kombinaci zúčastněných, jejich ontogenetickém vývoji a podmínkách vnějšího prostředí. Své hostitele a tím i celá rostlinná společenstva mohou DSE ovlivňovat také díky interakcím s jinými mikroorganismy v půdě, hlavně s mykorrhizními houbami.

2. Historie poznávání DSE

Kořenoví endofyty byly z rostlin izolovány již na počátku 20. století Gallaudem a Peyronem (Jumpponen & Trappe, 1998). V roce 1922 Melin izoloval při práci s ektomykorrhizami hnědá



Obrázek 2. Kolonizace kořene rododendronu tmavými přepážkovanými hyfami – DSE asociace. Překresleno podle fotografie pořízené M. Vohníkem

až načernalá mycelia, která při resyntézních pokusech netvořila ektomykorhizy a nazval je souhrnně *Mycelium radialis atrovirens* (MRA). Jejich asociaci s kořeny popsal jako „pseudomykorhizní“, tedy jako symbiózu, při které na rozdíl od působení ektomykorhizních hub (EcMF) nedochází ke zlepšení příjmu živin. Na rozdíl od EcM se při ní nevytvářela Hartigova síť ani hyfový plášť a buňky kořene byly kolonizovány výhradně vnitrobuněčně (Melin, 1922).

Houba, kterou Melin takto vyizoloval, pravděpodobně patřila do okruhu *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox s.l. *P. fortinii* byla popsána v roce 1985 na základě morfologických znaků (Wang & Wilcox, 1985) a většina tmavých přehrádkovaných endofytů pozorovaných v kořenech rostlin byla od té doby označována jako tento druh. Díky moderním molekulárním technikám používaným pro identifikaci DSE hub došlo v rámci komplexu *P. fortinii* s.l. k vylišení několika kryptických druhů, což mj. vedlo k ustavení nového monotypického rodu (*Acephala*) a popisu několika nových druhů rodu *Phialocephala*.

Název *dark septate endofytes* (DSE) byl zaveden v roce 1991, podle tmavých přehrádkovaných hyf (Stoyke & Currah, 1991), které byly pozorovány v kořenech hostitelských rostlin. Původ této skupiny je polyfyletický a je možné ji definovat zejména na základě ekologických charakteristik jako houby žijící endofytickým způsobem v rostlinných pletivech, jež pravděpodobně nevytvářejí žádné specifické struktury pro příjem živin z hostitelské rostliny, čímž se odlišují od mykorhizních symbióz.

3. Zástupci DSE

Nejčastějšími endofyty izolovanými z kořenů rostlin jsou zástupci PAC. Mezi DSE je možné zařadit i mnoho dalších rodů v závislosti na vymezení skupiny, například *Cadophora finlandica* Wang & Wilcox, *Chloridium paucisporum* Wang & Wilcox, *Heteroconium chaetospira* Grove či *Leptodontidium orchidicola* Singler & Currah, které jsou ve srovnání s PAC zkoumány spíše okrajově.

3.1 Komplex druhů *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata*

P. fortinii byla popsána a odlišena od podobného druhu *Phialocephala dimorphospora* Kendrick na základě morfologických znaků – struktury konidií, konidioforů, konidiogenních hlavic, límečků či rychlosti růstu mycelia a jeho barvy na konkrétním médiu (Wang & Wilcox, 1985).

Při studiu genetické struktury *P. fortinii* s použitím *intersimple sequence repeat-polymerase chain reaction* (ISSR-PCR) a izozymové analýzy byla zjištěna vysoká variabilita jejího genomu, která svědčila o tom, že tento taxon zahrnuje větší množství kryptických druhů



Obrázek 3. Konidiofor *P. fortinii* s.l. Původní fotografie M. Vohník

odhalit (Grunig *et al.*, 2004).

V roce 2005 byl z *P. fortinii* s.l. oddělen monotypický rod s jediným druhem *Acephala applanata* Grünig & Sieber, který se odlišoval nejen molekulárně, ale i morfologicky – měl nižší rychlost růstu mycelia na médiu a menší množství vzdušného mycelia. Vyčlenění tohoto druhu podpořily různé molekulární analýzy – izozymy, ISSR-PCR, RFLP i ITS sekvence (Grunig & Sieber, 2005). *P. fortinii* a *A. applanata* se často vyskytují společně, jsou si morfologicky velmi podobné a fylogeneticky blízce příbuzné, a proto bývají označovány jako „*Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* species complex” (PAC). Do tohoto komplexu jsou řazeny i všechny ostatní druhy dosud vyčleněné z *P. fortinii* s.l., tedy *Phialocephala europaea* Grünig & Sieber, *Phialocephala helvetica* Grünig & Sieber, *Phialocephala letzii* Grünig & Sieber, *Phialocephala subalpina* Grünig & Sieber, *Phialocephala turiciensis* Grünig & Sieber a *Phialocephala uotolensis* Grünig & Sieber (Grunig *et al.*, 2008b). V minulém roce (2009) byly popsány další tři PAC blízce příbuzné druhy – *Phaeomollisia piceae* Sieber & Grünig, *Phialocephala glacialis* Sieber & Grünig (Grunig *et al.*, 2009) a *Acephala macrosclerotiorum* Münzenberger & Bubner (Munzenberger *et al.*, 2009).

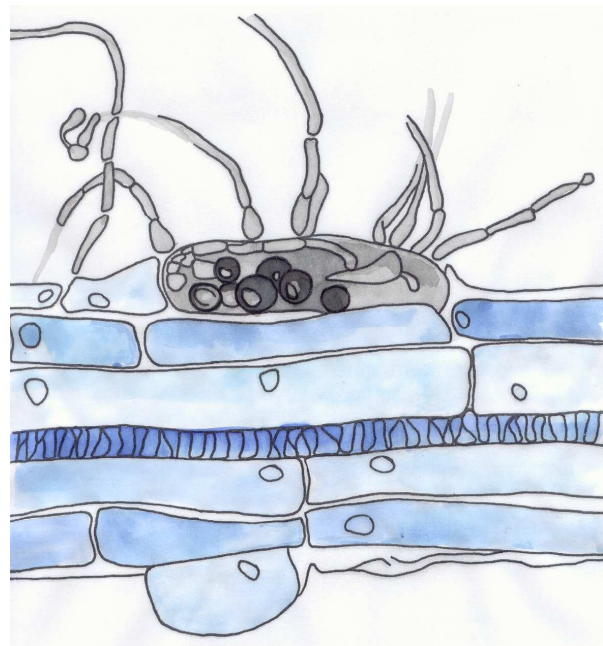
PAC je považován za skupinu s velmi nízkou hostitelskou specificitou, která se vyskytuje na všech typech stanovišť. Tato univerzálnost však může být pouze zdánlivá –

jednotlivé CSP mohou být specializovány na konkrétní stanoviště či hostitele. *Phialocephala sphaeroides* Wilson, druh popsáný na základě morfologie, enzymatických schopností a analýzy DNA, byl izolován pouze z rostlin rostoucích na vysoce kyselých stanovištích (pH 3,9), zatímco *P. fortinii* s.l. se vyskytovala i na stanovišti s pH 6,5 (Wilson *et al.*, 2004). Podobně může mít rozdělení *P. fortinii* s.l. do několika druhů vliv na interpretování výsledků týkajících se vlivu na hostitelské rostliny. To, že stejné rostliny reagovaly na kolonizaci PAC různě, by mohlo být dáno tím, že ve skutečnosti byly inokulovány různými kryptickými PAC druhy.

4. Charakterizace DSE

Přestože se DSE vyskytují v kořenech velkého množství rostlin různých čeledí a lze proto očekávat, že hrají významnou ekologickou roli, je tato skupina relativně málo prozkoumaná. V mnoha studiích se vyskytuje pouze okrajově a větší pozornost je věnována houbám, které vytvářejí se svými hostiteli mykorhizní symbiózu.

Morfologicky mohou být charakterizováni hlavně na základě struktur nalézáných v kořenech hostitelských rostlin – melanizovaných přehrádkovaných hyf a mikrosklerocií. Díky této charakteristice však mohou být mezi DSE zahrnuty také houby jim jen vzdáleně příbuzné (Grunig *et al.*, 2008b) a některé druhy DSE, které v kořenech tvoří hyalinní hyfy, by naopak měly být podle této definice ze skupiny vyřazeny. Proto bylo navrženo, aby byl pro tuto skupinu hub používán spíše název „septate endophytes“ (Odell *et al.*, 1993; Peterson *et al.*, 2008).



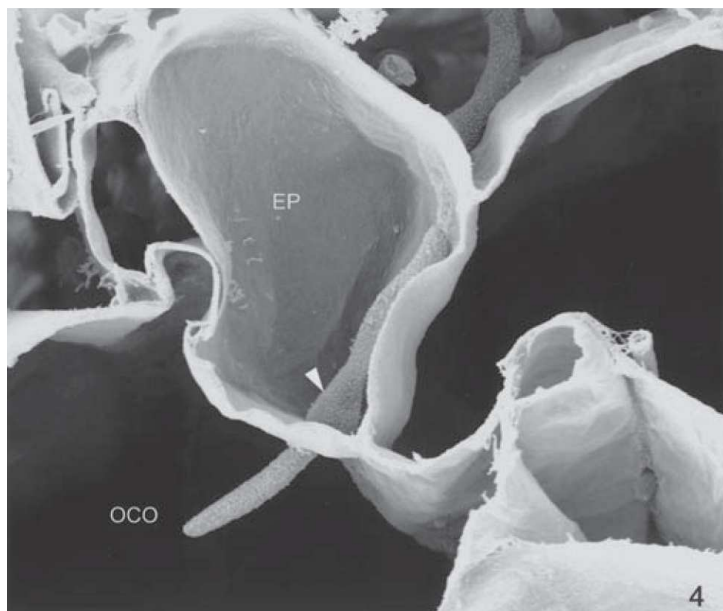
Obrázek 4. Kolonizace rhizodermální buňky kořene brusnice borůvky. Překresleno podle fotografie pořízené M. Vohníkem.

4.1. Morfologie

Hlavní charakteristickou strukturou DSE jsou tmavé přehrádkované hyfy, které mezi- i vnitrobuněčně kolonizují kořeny hostitelských rostlin. Jednotlivé hyfy prorůstají mezi vrstvou rhizodermálních a kortikálních buněk, přičemž mohou pronikat do vnitřního prostoru buněk (Jumpponen & Trappe, 1998). Vnitrobuněčné hyfy pravděpodobně nejsou obaleny

perifungální membránou (Peterson *et al.*, 2008), která je typickou strukturou poukazující na mutualistický vztah mezi houbou a rostlinou, ale fibrilárním materiálem, pravděpodobně rostlinného původu, jehož funkce i původ jsou prozatím málo prozkoumané (Yonezawa *et al.*, 2004). Tmavé zbarvení hyf je způsobeno množstvím melaninu v buněčné stěně, některé hyfy však mohou být zcela bezbarvé, hyalinní. Pro jejich vizualizaci je nutné použít speciální barviva, např. Sudan IV (Barrow & Aaltonen, 2001), které probarvuje lipidy a zviditelňuje tak i hyfy, které se běžnými barvicími metodami (př. trypanová modř) neobarví.

Barrow a Aaltonen (2001) studovali DSE v průběhu jednoho roku u *Atriplex canescens* Pursh v Jižním Novém Mexiku. V zimním období, kdy byly rostliny dormantní, pozorovali v kořenech větší množství tmavých hyf a mikrosklerocí, které jsou díky obsahu melaninu lépe vybaveny pro nepříznivé podmínky, které v tomto období panují. Naproti tomu v obdobích zvýšené fyziologické aktivity byly rostliny kolonizovány především hyalinními



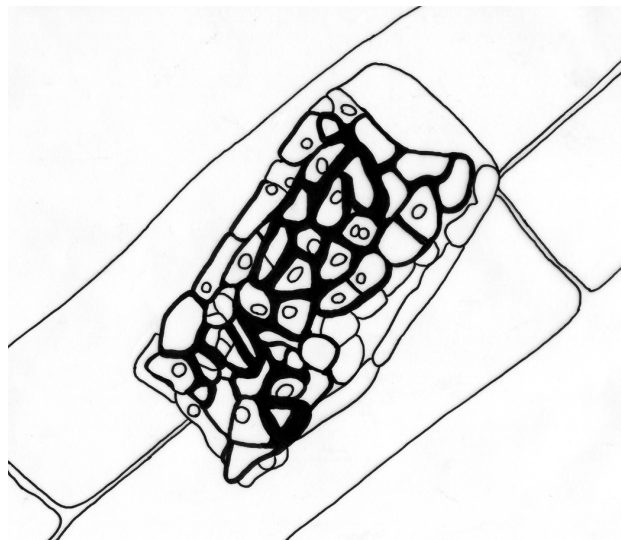
Obrázek 5. Struktura podobná apesoriu AMF. Převzato z (Yonezawa *et al.*, 2004)

hyfami, které mají tenčí a tím také propustnější buněčné stěny. Autoři proto považují hyalinní hyfy za fyziologicky aktivní struktury a uvažují o jejich funkci při výměně látek mezi hostitelem a houbou (Barrow & Aaltonen, 2001).

Při průchodu hyfy stěnou rostlinné buňky se na ní může vytvářet útvar připomínající apesorium AM hub, kdy je hyfa na vnější straně buněčné stěny hostitele mírně ztlustlá (Yu *et al.*,

2001). Průnik hyfy v rostlinné buňce pravděpodobně nespouští silnější obrannou odezvu a ani buněčná stěna nejeví známky degradace, což spolu s faktem, že DSE neproniká do cévních svazků rostliny může svědčit o neutrální nebo oboustranně prospěšné symbióze (Yonezawa *et al.*, 2004). Yu a kol. (2001) naproti tomu pozorovali průnik hyf *P. fortinii* s.l. do meristémů a centrálního válce kořenů *Asparagus officinalis* L., což je v přírodních podmínkách pozorováno jen zřídka. Autoři předpokládali, že důvodem pro vytvoření této netypické kolonizace byl vliv prostředí, ve kterém byly oba partneři pěstováni (Yu *et al.*, 2001).

Ve vnitřním prostoru hostitelských buněk vytváří houba dobře pozorovatelné struktury – shluky tlustostěnných oblých buněk nazývané mikrosclerocia. Jejich funkce není zcela jasná, podle některých hypotéz mohou sloužit jako disperzní propagule (Grunig *et al.*, 2004). Jsou tlustostěnné, mají silně melanizované buněčné stěny, což je může ochránit před nepříznivým působením vysokých i nízkých teplot a sucha. Obsahují zásobní látky jako polyfosfát, proteiny a glykogen (Yu *et al.*, 2001).



Obrázek 6. Mikrosclerocium. Překresleno podle fotografie pořízené M. Vohníkem.

Pohlavní rozmnožování u DSE dosud nebylo pozorováno, ale molekulární analýzy naznačují, že k sexuální reprodukci dochází. Není zřejmé, zda se

jedná o sexuální nebo parasexuální rozmnožování a jak častá rekombinace je, či kdy k ní naposledy došlo. V roce 2008 byla nalezena teleomorfa druhu *Phaeomollisia piceae*, který je blízkce příbuzný PAC, což podporuje existenci rekombinace u PAC (Grunig *et al.*, 2008b). Nepohlavní konidie jsou malé, tenkostěnné a v podmínkách *in vitro* jsou pozorovány pouze ojedinelé. Zdá se tedy, že pravděpodobně nehrají důležitou roli při rozšiřování *P. fortinii* s.l. (Grunig *et al.*, 2004).

DSE mohou vytvářet také struktury podobné ektomykorhizním – na povrchu kořene hyfový plášť a mezi buňkami hostitelské rostliny „labyrinthine tissue“, které je morfologicky podobné Hartigově síti (Odell *et al.*, 1993). U semenáčků *Pinus sylvestris* L. inokulovaných blízkým příbuzným PAC *A. macrosclerotiorum* byla pozorována dobře vyvinutá Hartigova síť i hyfový plášť (Munzenberger *et al.*, 2009).

4.2 Zařazení do systému

Identifikace DSE je značně složitá – morfologická charakterizace ztroskotává na neochotě hub sporulovat, někteří DSE vytváření konidie (nepohlavní spóry) pouze po vystavení dlouhodobému snížení teplot a nebo vůbec (Jumpponen & Trappe, 1998). Při fylogenetických analýzách hub jsou používány zejména sekvence vnitřních prepisovaných mezerníků (*internal transcribed spacers*), konkrétně ITS1 a ITS2, jejich využití u DSE je však kvůli příliš vysoké variabilitě omezené. Proto jsou pro identifikaci DSE používány vícelokusové molekulární markery jako je např. *single-copy restriction fragment length polymorphism* (RFLP),

mikrosatelity (Grunig *et al.*, 2008b) a pro definitivní odlišení jednotlivých druhů PAC je potřeba použít např. kombinaci dvou kódujících (beta-tubulin a translační elongační faktor [EF-1alpha]) a 3 nekódujících úseků DNA (Grunig *et al.*, 2008a).

Již v roce 1998 byli DSE zařazeni mezi Deuteromycetes přičemž vztah anamorfa – teleomorfa byl neznámý. Morfologie jejich konidií naznačovala příslušnost k askomycetům, ale umístění v rámci této skupiny zůstalo otázkou – byli řazeni do skupin Pleosporales, Pezizales a Leotidales (Jumpponen & Trappe, 1998). Molekulárními fylogenetickými technikami bylo zařazení DSE mezi askomycety potvrzeno, přičemž část byla umístěna do skupiny Leotidales a část mimo ni (Grunig *et al.*, 2002).

5. Hostitelské rostliny

DSE byli izolováni z více než 600 druhů hostitelských rostlin, a to jak mykotrofních (AM, ErM, EcM, OrM), tak i nemykotrofních (Jumpponen & Trappe, 1998). Kořenové endofyty byli nalezeni i u čínského zelí (*Brassica campestris* L.) z čeledi *Cruciferae*, jejíž zástupci tvoří mykorhizní symbiózy jen sporadicky (Usuki & Narisawa, 2007). DSE byly, vzhledem k tomu, že kolonizují rostlinné skupiny s různými životními strategiemi, pokládány za endofyty s malou nebo žádnou hostitelskou specificitou (Jumpponen & Trappe, 1998) Jejich specificita může být ovlivněna jak biotickými (přítomnost kompetitorů, včetně ostatních DSE, půdní mikroorganismy), tak i abiotickými faktory (Grunig *et al.*, 2008b).

5.1. Nahosemenné

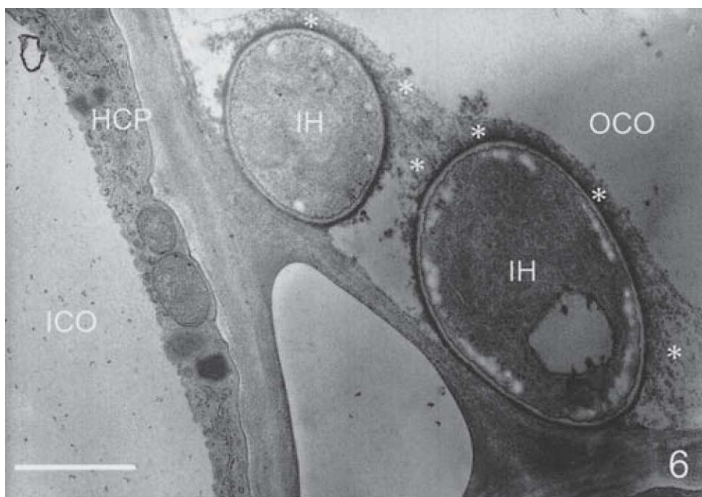
DSE kolonizace, především kolonizace *P. fortinii* s.l., je velmi často pozorována v kořenech čeledi *Pinaceae*. Wang a Wilcox publikovali studii, kdy byl druh *Pinus resinosa* kolonizován endofytem *P. fortinii* s.l. a autoři, podobně jako E. Melin (Melin, 1922), klasifikovali tuto asociaci jako pseudomykorhizní (Wang & Wilcox, 1985). Blízký příbuzný PAC *A. macrosclerotiorum* byl izolován z ektomykorhizní špičky kořene *P. sylvestris* a při resyntéze *in vitro* tvořil dobře vyvinutou Hartigovu síť, která prorůstala až k endodermis, i hyfový plášť se sklerocií, podle kterých byl druh pojmenován (Munzenberger *et al.*, 2009). U semenáčků *Pinus strobus* L. inokulovaných *P. fortinii* s.l. došlo k vytvoření jemného hyfového pláště na povrchu kořene, Hartigovy sítě a i vnitrobuněčných hyf, které nepronikaly do cévního svazku, ale nebyla pozorována mikrosklerocia. Hyfy uvnitř buňky byly obaleny amorfním materiálem, který pravděpodobně pocházel od hostitele a cytoplazma hostitelských buněk jevila známky degradace (Peterson *et al.*, 2008).

5.2. Dvouděložné

Interakce mezi DSE a zástupci dvouděložných rostlin tvořících EcM symbiózu byla pozorována u čeledi *Salicaceae*. DSE se u této čeledi vyskytovali, ale v menším množství než EcMF (Becerra *et al.*, 2009). U hybridní osiky *Populus tremula* L.×*Populus tremuloides* Michx. byla při pěstování na experimentální ploše pozorována kolonizace *P. fortinii* s.l., při které se vytvářely nevětvené mykorhizní špičky (Kaldorf *et al.*, 2004). V *in vitro* pokusu s tímto hybridem nedošlo k vytvoření ektomykorhiz ani s *P. fortinii* s.l. ani s *A. macrosclerotiorum*, která vytvářela ektomykorhizy s *P. sylvestris* (Munzenberger *et al.*, 2009).

Vřesovcovité rostliny v přírodních podmínkách asociují s DSE (Zhang *et al.*, 2009) a vliv *P. fortinii* s.l. na hostitelskou rostlinu *in vitro* může být neutrální (Vohník *et al.*, 2003) nebo i slabě pozitivní. U *Rhododendron* cv. Azurro byl pozorován pozitivní vliv na biomasu kořene rostliny, byl ale závislý na konkrétním izolátu a na přítomnosti ErM houby *Oidiodendron maius* Barron (Vohník *et al.*, 2005).

U běžně nemykotrofních druhů rostlin byly DSE pozorovány např. u druhu *B. campestris*, který byl kolonizován houbou *H. chaetospora*. Houba vnitrobuněčně kolonizovala epidermální buňky kořene a nikdy nepronikala do centrálního válce. Degradace buněčné stěny nebyla pozorována, vnitrobuněčné hyfy nebyly obaleny membránou, ale fibrilárním materiálem (Yonezawa *et al.*, 2004). U dalšího nemykotrofního zástupce dvouděložných huseničku *Arabidopsis thaliana* L. byla pozorována kolonizace u semenáčků. V ranných stádiích kolonizace *P. fortinii* s.l. nepronikala do cévního svazku, ale postupem doby došlo k degradaci cév i sítkovic floému. Vnitrobuněčné hyfy byly vždy obaleny fibrilárním materiálem, ale perifungální membrána pozorována nebyla a při průchodu hyf z buňky do buňky docházelo k mírnému narušení buněčné stěny (Peterson *et al.*, 2008).



Obrázek 7. Fibrilární materiál obalující hyfy *Heteroconium chaetospora* ve vnitřním prostoru buňky *Brassica campestris* L. Převzato z (Yonezawa *et al.*, 2004)

5.3 Jednoděložné

DSE se běžně vyskytují u zástupců trav a jiných jednoděložných rostlin (Jumpponen & Trappe, 1998). Důležitou roli by mohli hrát při vývoji protokormu orchidejí, kde byl u druhu *Dactylorhiza praetermissa* Druce pozorován pozitivní vliv inokulace *P. fortinii* s.l. v podmínkách *in vitro*. Autoři uvažovali o možnosti, že *P. fortinii* s.l. je prvotním kolonizátorem protokormů a v průběhu vývoje rostliny je vystřídána neurčeným orchideoidně mykorhizním basidomycetem (Zimmerman & Peterson, 2007). DSE se hojně vyskytují společně s AMF v kořenech travin (Lingfei *et al.*, 2005; Upton *et al.*, 2008) a mohou mít pozitivní vliv na příjem živin, jak ukázal *in vitro* experiment s trávou *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua* Dumort. a kořenovým endofytem *Phialophora graminicola* Deacon, kdy došlo ke zvýšení obsahu P v celé rostlině a N v kořenech (Newsham, 1999).

6. Geografický výskyt DSE

DSE byly izolovány z rostlin po celém světě, přičemž většina studií pochází ze Severní Ameriky a z Evropy, jižní polokoule je prostudována méně (Grunig *et al.*, 2008b). Kolonizace byla pozorována ve všech typech habitatů (Mandyam & Jumpponen, 2005), včetně tropických (Rains *et al.*, 2003) a polárních oblastí, kde byla dokonce častější než mykorhizní asociace (Newsham *et al.*, 2009).

Kolonizace rostlin byla v různých oblastech velmi variabilní a DSE se častěji vyskytovali v oblastech s extrémnějšími podmínkami – ve vyšších nadmořských výškách či na sušších stanovištích. Vliv na četnost DSE asociací v dané oblasti může mít také roční doba, protože se kolonizace kořene endofyty a mykorhizními houbami může měnit v průběhu vegetační sezóny (Mandyam & Jumpponen, 2005). Společenstva DSE hub jsou dynamicky i prostorově poměrně stabilní (Queloz *et al.*, 2005) a jejich propagule nejsou příliš mobilní, jsou však schopny překonat období dlouhého stresu (Wagg *et al.*, 2008).

V osmdesátých letech minulého století byla v rakouských Alpách sledována kolonizace EcMF, AMF a DSE na 5 různých lokalitách v různých nadmořských výškách. Více než polovina studovaných rostlin vykazovala typickou AM kolonizaci a u necelé třetiny byly v kořenech pozorovány DSE, přičemž kolonizace závisela na nadmořské výšce. DSE byla nejčastější na vrcholcích hor mezi 3100 a 3200 m. n. m. Z toho autoři usuzovali, že DSE kolonizace je běžnější ve vyšších nadmořských výškách (Read & Haselwandter, 1981). Při studiu závislosti kolonizace AMF a DSE na nadmořské výšce po dobu jednoho vegetačního období na subarktických loukách v severním Finsku nebyla na rozdíl od výsledků Reada a Haselwandtera (1981) nalezena žádná pozitivní korelace mezi nadmořskou výškou a DSE

kolonizací. Kolonizace byla závislá hlavně na druhu hostitele a DSE byly běžnými endofyty kořenů společně s AMF (Ruotsalainen, 2003).

Rozšíření kořenových endofytů je ovlivněno především místně specifickými edafickými a mikrobiálními společenstvy a abiotickými podmínkami prostředí. (Summerbell, 2005). V oblasti severního Ontaria v Kanadě byli sledováni endofyté v kořenech *Picea mariana* Mill. a vliv prostředí na strukturu jejich společenstev. Houby z okruhu *P. fortinii* s.l. byly běžnými endofyty s častějším výskytem na stresovaný stanovištích s nižším obsahem humusu v půdě. Vyskytovaly se i na ostatních zkoumaných plochách, ale méně často a byly izolovány pouze z ektomykorhiz (Summerbell, 2005). Tendence DSE vyskytovat se v oblastech s vyšším stresem byla pozorovány i v kostarickém tropickém deštném pralese u 18 druhů epifytních a terestrických rostlin (Rains *et al.*, 2003).

Mandyam a Jumpponen (2005) při studium kořenových endofytů v Kansasu (USA) pozorovali, že kolonizace DSE zůstávala stabilní po celou sezonu, zatímco arbuskulární mykorhiza se na počátku vegetační sezony vyskytovala méně často než DSE, ale později v sezoně se dostala na srovnatelnou úroveň. Časová dynamika tedy může hrát významnou roli při studiu kolonizace kořenů rostlin endofytními i mykorhizními houbami (Mandyam & Jumpponen, 2005).

DSE se neomezují pouze na terestrické prostředí, mohou kolonizovat i kořeny rostlin rostoucích pod vodní hladinou. U osmi druhů cévnatých rostlin (*Alisma plantago-aquatica* L., *Mentha aquatica* L., *Myosotis scorpioides* L., *Oenanthe fistulosa* L., *Gratiola officinalis* L., *Glyceria fluitans* L., *Sium latifolium* L. a *Teucrium scordium* L.) byla pozorována souběžná kolonizace AMF a DSE. V kořenech sedmi z nich byla nalezena mikrosklerocia neurčeného druhu nebo druhů hub, které kolonizovaly kořen tmavými přepážkovanými hyfami (Sraj-Krzic *et al.*, 2006).

7. Význam DSE pro hostitelskou rostlinu

Vzhledem k tomu, že DSE se vyskytují v kořenech rostlin rostoucích ve všech zeměpisných šířkách a nadmořských výškách a u naprosté většiny druhů, je pravděpodobné, že svými účinky ovlivňují celá rostlinná společenstva. Vztah mezi mykobintem a fytobiontem se pohybuje od mutualismu až po parazitismus (Jumpponen, 2001). Endofyt může rostlinu ovlivnit v oblasti příjmu živin, zvýšit její odolnost vůči různým stresovým faktorům, jako např. vysoké teplotě, suchu, napadení herbivory a patogeny, ale také nemusí mít na hostitele vůbec žádný pozorovatelný vliv.

7.1 Vliv DSE na příjem živin

Mykorrhizní houby, na rozdíl od DSE, vytvářejí v hostitelských kořenech struktury se zvětšeným povrchem, na kterých se uskutečňuje výměna látek. Tyto struktury mohou být vnitrobuněčné (arbuskuly, pelotony, hyfová klubíčka) nebo mezibuněčné (Hartigova síť). DSE většinou takové struktury zřejmě nevytvářejí, a proto pokud u nich dochází k výměně živin s hostitelskou rostlinou, není dosud známo na kterých strukturách se uskutečňuje.

U severoamerické trávy rodu *Bouteloua* byly v síťkových buňkách cévních svazků pozorovány hyalinní hyfy, které nejsou při použití klasických barvicích technik viditelné, protože jejich buněčná stěna je chudá na chitin a melanin. Tyto látky zajišťují hyfám hub ochranu v nepříznivých podmínkách, ale ve vnitřním prostředí kořene už tato ochrana není tak nutná a navíc tenká nemelanizovaná buněčná stěna je více propustná a snadněji přes ni mohou procházet živiny. V obdobích aktivního růstu hostitelské rostliny všechny hyfy v kořeni obsahovaly lipidová tělíška, přičemž nejčastěji byla pozorována v hyalinních hyfách v síťkových buňkách. Autoři se domnívali, že právě v těchto hyfách dochází k příjmu asimilátů a jejich přeměně na lipidy (Barrow, 2003). Závěry této studie jsou sporné, protože buňky ve kterých byly hyfy pozorovány jsou pravděpodobně články cévic nebo parenchymatické buňky cévního svazku (Peterson *et al.*, 2008).

Pro zkoumání vlivu DSE na hostitelské rostliny se používají hlavně *in vitro* pokusy, při kterých může dojít díky nastavení experimentálních podmínek ke značnému zkreslení oproti přirozeným podmínkám. Například při vysokém obsahu živin v médiu, na kterém byly pěstovány semenáčky *B. campestris*, houba nevstupovala do kořene a chovala se jako saprotrof, zatímco na médiu s menší koncentrací C a N ke kolonizaci docházelo a endofyt se pravděpodobně choval mutualisticky (Usuki & Narisawa, 2007). Podobně při pokusu se semeny orchideje *D. praetermissa*, které jsou v ranných stádiích vývoje, díky absenci endospermu a nevyvinutému embryu, na kolonizaci houbou zcela závislé. Při nízkých koncentracích C docházelo k parazitaci semen houbou a při dodání živin dostupných pro DSE se vývoj semen signifikantně zlepšil (Zimmerman & Peterson, 2007). Jumpponen a kol. (1998) pozorovali pozitivní vliv inokulace *P. fortinii* s.l. na růst *Pinus contorta* Douglas, ale koncentrace P a N v jehlicích byla nižší než u nekolonizovaných rostlin. V tomto případě pravděpodobně došlo ke stimulaci tvorby biomasy díky respiraci houby v uzavřeném systému (Jumpponen *et al.*, 1998).

Endofyt může mít vliv na rostlinu i v případě, že nedojde k průniku hyf do kořene. Při zkoumání vlivu nízkých teplot na AM a DSE asociaci nebyla pozorována žádná kolonizace DSE a přesto došlo k zvýšení obsahu N v rostlině a k zlepšení vývoje semen. Inokulum které

bylo přidáno do *in vitro* systému znamenalo pouze zanedbatelný přírůstek živin, proto autorky tento jev vysvětlují jako působení saprotrofních vlastností *P. fortinii* s.l., díky kterým došlo k zvýšení množství živin dostupných pro rostlinu *Gnaphalium norvegicum* L. v substrátu (Ruotsalainen & Kytoviita, 2004).

DSE produkují řadu hydrolytických enzymů a mají proto přístup k C, N a P v detritu (Mandyam & Jumpponen, 2005). Dusík i fosfor se v půdě vyskytují převážně ve složitých organických formách, které bez přeměny na anorganické formy pomocí hub, bakterií a jiných půdních mikroorganismů, nejsou rostliny schopné přijímat (Smith and Read 1997). Rostliny jsou schopny z půdy přijímat pouze některé aminokyseliny.

Které formy N přijímá fyto biont a které myko biont bylo sledováno při pěstování semenáčků *B. campestris* v nádobách horizontálně rozdělených pomocí dvouvrstvé membrány, která neumožňovala difuzi živin ani prorůstání kořenů, zatímco hyfy houby *H. chaetospira* mohly procházet póry. Horní část obsahovala basální médium bez zdroje N a do spodního kompartmentu byl přidán některý ze zdrojů N a glukóza. Houba měla dobrý přístup k N, protože větší část jejího mycelia se nacházela ve spodním kompartmentu nádoby, tedy tam kde byla vyšší koncentrace N. Inokulace, stejně jako druh zdroje N, měla signifikantní vliv na růst rostlin. Houba dokázala využít, v přítomnosti dostatečného množství C, všechny jí poskytnuté zdroje N (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aminokyseliny Gln, Gly, Leu, Phe, Val) a zatímco rostlina pouze NaNO_3 a aminokyselinu Gln. Pokud byly rostliny kolonizovány houbou, byly schopny využít všech pět aminokyselin a NaNO_3 – jejich suchá hmotnost byla signifikantně vyšší než u kontrolních rostlin, které byly pěstovány bez endofyta (Usuki & Narisawa, 2007). Není jasné jak je N transportován do rostliny, zda je v formě dostupné pro rostlinu uvolňován do média či jsou využívány nějaké jiné mechanismy.

Podobně byl příjem živin pozorován u semenek orchideje *D. praetermissa*, ale tentokrát byl sledován příjem C. Semena byla kultivována na médiu s dostupnými a nedostupnými cukry. Vývoj protokormu byl nejlepší na živném roztoku s obsahem sacharózy, která je přímým zdrojem C pro semeno. U semen inokulovaných *P. fortinii* s.l. a pěstovaných na médiu, které neobsahovalo zdroj C využitelný rostlinou (v tomto případě ovesný extrakt), byla rychlost vývoje poněkud nižší, ale stále byla signifikantně vyšší než u semen na médiu bez sacharózy a bez inokulace (Zimmerman & Peterson, 2007). Přímý důkaz pro transport živin mezi fyto biontem a myko biontem zatím neexistuje.

Transport asimilátů z hostitelské rostliny byl studován u *B. campestris*. DSE *H. chaetospira* rostoucí s hostitelskou rostlinou na médiu bez přídavku glukózy dosáhl skoro stejného objemu biomasy jako ten, který rostl na médiu s přídavkem glukózy. V systému, kde

houba neměla přístup k jinému zdroji uhlíku muselo dojít k transportu asimilátů z autotrofa – rostliny – do mykobionta. Nebylo jasné jak k transportu docházelo, zda měla houba přístup pouze k exudátům vylučovaným kořeny či k výměně živin docházelo na specializovaných strukturách uvnitř kořene. Děje v kořeni byly pozorovány pomocí izotopu ^{13}C . V nekolonizovaných kořenech byla vysoká koncentrace sacharózy, při kolonizaci DSE její koncentrace klesala a naopak stoupala koncentrace mannitolu, který je specifickým cukrem v hyfách hub. Z toho autoři usoudili, že sacharóza byla transportována do hyf endofyta přímo v kořeni a tam přeměněna na mannitol (Usuki & Narisawa, 2007).

Zůstává otázkou jestli k takovýmto pochodům může docházet v podmínkách mimo přísně kontrolovatelné laboratorní prostředí a jestli může být vztah rostlina-DSE opravdu mutualistický, tj. výhodný pro obě strany. Jestli se při malé změně podmínek “oboustranný balancovaný parazitismus“ nezmění na jednostranný parazitismus ze strany houby, jako to pozoroval Melin na začátku minulého století.

7.2 Tolerance k suchu a extrémním teplotám

DSE mohou rostlině poskytovat ochranu proti působení extrémních teplot, jako to sledovali Redman a kol. (2002) u rostliny *Dichantheium lanuginosum* popis rostoucí na geotermálních půdách v severní Americe, kde se teploty půdy během roku pohybují mezi 20 a 50 °C. Mykobiont určený jako *Curvularia* sp. sice nepatří mezi přímo DSE, ale má melanizované buněčné stěny a proto může být jeho vliv na rostlinu analogický. Pokud byli mykobiont a fytoiont pěstováni samostatně, nebyli schopni odolávat vysokým teplotám, zatímco při společném růstu, kdy endofyt kolonizoval kořeny a listy, byly rostliny schopny růstu i při 50 °C po 3 dny a dokonce při maximální teplotě 65 °C. Autoři uvažovali o dvou možných vysvětleních; jednak endofyt produkuje v rostlinných orgánech melanin, který může způsobovat disipaci tepla a nebo také vázat kyslíkové radikály, které se uvolňují při tepelném stresu. Druhou možností je, že houba funguje jako spouštěč obranné reakce rostliny a ta je pak schopna reagovat na stresové podmínky rychleji a efektivněji (Redman *et al.*, 2002).

Vztah mezi hostitelskou rostlinou a jejími kořenovými endofyty v aridních podmínkách jihozápadních USA byl zkoumán u trávy z rodu *Bouteloua*. Rostliny byly kolonizovány téměř výhradně DSE a na povrchu jejich kořenů byla pozorována hustá síť tvořená mucilagenními hyfami, které by mohly hrát roli v příjmu vody a ochraně kořene proti vysychání. Hyfy na povrchu kořene byly spojeny s hyfami v cévním svazku a autoři proto spekulovali, že by mohlo docházet k transportu asimilátů z cévního svazku do mucilagenních hyf, kde by byly přeměněny na polysacharidy chránící kořen a umožňující lepší příjem vody a živin.

V aridních podmínkách, kde je dostatek světla pro fotosyntetickou činnost rostlin a nedostatek živin a vody v půdě, by podobná symbióza mohla být prospěšná pro obě strany (Barrow, 2003).

7.3 Vysoký obsah těžkých kovů v půdě

Tolerance DSE k vysokému obsahu těžkých kovů v půdě byla studována na hadcové půdě, chudé na K^+ a Ca^{2+} , ale obsahující velké až toxické množství Ni^{2+} a Cr^{3+} . V těchto podmínkách je ztížen příjem prvků, které se v půdě vyskytují jako dvojmocné ionty (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) a jsou nezbytné pro správný vývoj rostliny. Mykorhizní houby jsou pro rostliny velmi důležité, protože mohou snížit relativní příjem toxických prvků a zlepšit příjem prvků esenciálních a DSE by mohli působit obdobně. Nejčastějším DSE izolovaným z ektomykorhizních špiček *P. sylvestris* a *Q. petraea* z hadcových půd byl izolát spadající do okruhu *P. fortinii* s.l. V laboratoři byl schopný růstu při koncentraci Ni 6 mM, přičemž jiné houby (např. *C. finlandica*) byly inhibovány již při koncentraci 0,75 mM. Při resyntézních pokusech s *P. fortinii* s.l. v aseptických *in vitro* kulturách nebyly v kořenech rostlin pozorovány žádné typicky mykorhizní struktury a vnitrobuněčná kolonizace měla negativní vliv na životaschopnost hostitelské rostliny. Autoři předpokládali, že *P. fortinii* s.l. netvořila mykorhizní symbiózu s *P. sylvestris*, ale velice často se vyskytovala uvnitř ektomykorhiz. (Urban *et al.*, 2008).

7.4 Ochrana před herbivory a patogeny

DSE mohou hostitelské rostliny do jisté míry chránit před působením patogenů a herbivorů. Listoví endofyty mohou hrát roli v ochraně rostlinných pletiv před poškozením patogeny – např. u tropického keře *Theobroma cacao* L. byly listy kolonizované sedmi různými endofyty z rodů *Colletotrichum*, *Xylaria* a *Fusarium/Nectria* méně poškozené houbovým patogenem *Phytophthora* sp. než listy bez endofytů (Arnold *et al.*, 2003). Tato ochrana může záviset na konkrétním druhu hostitelské rostliny; ve studii zabývající se listovými endofyty bylinných druhů bylo pro *Leucanthemum vulgare* Lam. působení endofyta prospěšné a naopak *Cirsium arvense* (L.) Scop. vykazovalo větší poškození herbivorem (Gange *et al.*, 2007).

Kořenoví endofyty vykazují podobné vlastnosti. U *B. campestris* byl pozorován pozitivní vliv na ochranu proti napadením houbou *Verticillium longisporum* Karapapa Stark. V aseptických podmínkách byly určeny tři izoláty, které snižovaly napadení – dva izoláty *P. fortinii* s.l. a jeden neznámý druh DSE. *P. fortinii* s.l. v podmínkách *in situ* nezlepšovala ochranou reakci rostliny, zatímco neznámý DSE snižoval napadení až o 88%. V pletivech byly pozorovány tmavé ztlustěliny buněčné stěny, které se u rostlin kolonizovaných *P.*

fortinii nenacházely. Tyto modifikace buněčné stěny v kortikálních a epidermálních buňkách svědčí o tom, že rostlina zahájila obrannou reakci. Jak konkrétně se na tom podílel DSE nebylo jasné, ale mohl působit jako mechanická bariéra ohraničující místa napadená patogenem (Narisawa *et al.*, 2004).

7.5 Ovlivnění složení rostlinných společenstev

DSE houby jsou zastoupeny téměř ve všech typech ekosystémů a kolonizují většinu rostlinných druhů, které na kolonizaci reagují různě, je proto pravděpodobné, že mohou hrát roli v složení rostlinných společenstev (Mandyam & Jumpponen, 2005). Účinky se mohou lišit podle podmínek prostředí, druhu mykobionta, fytoionta i ostatních organismů ve společenstvu. Díky tomu je velmi složité určit konkrétní mechanismy jakými DSE působí.

DSE často kolonizují kořeny rostlin, které žijí v symbióze s mykorhizními houbami a mohou různými způsoby ovlivňovat tvorbu a průběh jejich asociace. Vliv exudátů DSE *Dreschlera* sp. na kolonizaci AM houbou byl pozorován u rostliny *Lolium multiflorum* Lam. Spory *Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck klíčící na médiu s přídavkem exudátů měly delší hyfy než na médiu bez nich. Naproti tomu na houbu kolonizující kořeny rostlin měly exudáty v nízkých koncentracích negativní vliv – zabraňovaly rozvoji mimokořenového mycelia. Důvod, proč byly mimokořenová a presymbiotická fáze ovlivněny stejnými exudáty různými způsoby, zatím není jasný. Je možné, že při ustanovení symbiózy dojde u AM houby k fyziologickým změnám a proto na ní mají DSE jiný vliv (Scervino *et al.*, 2009).

DSE mohou ovlivňovat příjem živin rostlinou tím, že přímo interagují s jejím mykorhizním partnerem. Při inokulaci *Rhododendron* cv. Azurro závisela koncentrace P v rostlinách nejen na konkrétním použitém izolátu *P. fortinii* s.l., ale také na tom, zda byly rostliny inokulovány zároveň s DSE také ErM houbou (ErMF) *O. maius*. Nejvyšší koncentrace P byla naměřena u rostlin inokulovaných pouze *O. maius*, zatímco při společné kolonizaci byl vždy celkový obsah P nižší (Vohník *et al.*, 2005).

Výskyt hub asociujících s kořeny rostlin v půdě může hrát klíčovou roli při obsazování nových habitatů, jako je například odkrytá moréna po ústupu ledovce. Cázares a kol. (2005) studovali kolonizaci ledovcové morény v North Cascades Mountains v USA. Výsledky podporovali hypotézu, že růst rostlin na nově odkryté půdě souvisí s dostupností propagulí hub, s nimiž tvoří mykorhizní symbiózu. V ranných stádiích sukcese rostliny vykazovaly jen malou kolonizaci houbami a byly schopné přežít bez mykorhizní asociace. Postupem času se zvyšovalo množství rostlin kolonizovaných EcMF, ErMF a DSE. Spory EcMF a ErMF se mohou šířit vzduchem, proto mohlo dojít k jejich rozšíření na nově odkrytou oblast. Jak došlo

k rozšíření DSE je otázkou, autoři článku se domnívali, že se DSE rozšiřují vzduchem, oproti tomu Grünig (2008) poukazoval na to, že zástupci PAC nebyli nalezeni v sporových pastech (Kausrud *et al.*, 2005) a ke sporulaci dochází jen zřídka (Grünig *et al.*, 2008b). Kolonizace AMF byla nízká, důvodem mohlo být to, že spory AMF se rozšiřují pomaleji – s půdou, na živočišných (př. kopyta zvířat) apod. (Cazares *et al.*, 2005).

8. Závěr

Přestože se DSE, tedy hlavně zástupci PAC, vyskytují prakticky ve všech habitatech a u všech rostlinných čeledí, je jejich význam pro hostitelskou rostlinu stále velmi málo prozkoumán. V porovnání s mykorhizní symbiózou je DSE asociace méně specifická a nemusí při ní docházet k oboustranné výměně živin. Někteří zástupci PAC mohou vytvářet struktury charakteristické pro mykorhizní symbiózu – např. *A. macrosclerotiorum* vytváří u *P. sylvestris* Hartigovu síť a hyfový plášť, ale ve většině případů je jejich kolonizace charakteristická pouze mikrosklerocií a tmavými přehrádkovanými hyfami ve vnitřním prostoru buněk i mimo něj. Podobně jako mykorhizní houby mohou DSE pozitivně ovlivňovat příjem živin, často ale asociují s kořeny bez zjevného vlivu na rostlinu.

DSE neovlivňují své hostitele pouze v oblasti živin, mohou rostlinu částečně chránit před účinky extrémních podmínek na daném stanovišti (vysoké teploty, nedostatek vody, vysoký obsah těžkých kovů) či proti působení stresových faktorů (herbivoři a patogeni). Tyto účinky na rostlinu závisí na daných podmínkách a také na druhu fykobionta a mykobionta. DSE se často vyskytují v kořenech rostlin společně s mykorhizními houbami a mohou pozitivně i negativně ovlivňovat efektivitu mykorhizní symbiózy a také působit na ostatní mikroorganismy v půdě či v kořeni.

Přestože DSE mají velký potenciál ekofyziologicky ovlivňovat celá rostlinná společenstva a pravděpodobně se v ekosystémech vyskytují častěji než mykorhizní houby, jejich ekologický vliv často neprávem uniká naší pozornosti. Především jejich interakce s mykorhizními houbami je dosud pravým polem neoraným a skýtá potenciálně velmi zajímavé směry výzkumu DSE.

Seznam použité literatury

- Addy HD, Piercey MM, Currah RS. 2005.** Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **83**: 1-13.
- Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. 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.
- Barrow JR. 2003.** Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* **13**: 239-247.
- Barrow JR, Aaltonen RE. 2001.** Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza* **11**: 199-205.
- Becerra AG, Nouhra ER, Silva MP, McKay D. 2009.** Ectomycorrhizae, arbuscular mycorrhizae, and dark-septate fungi on *Salix humboldtiana* in two riparian populations from central Argentina. *Mycoscience* **50**: 343-352.
- Cairney JWG. 2000.** Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften* **87**: 467-475.
- Cazares E, Trappe JM, Jumpponen A. 2005.** Mycorrhiza-plant colonization patterns on a subalpine glacier forefront as a model system of primary succession. *Mycorrhiza* **15**: 405-416.
- Gange AC, Dey S, Currie AF, Sutton BC. 2007.** Site- and species-specific differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants. *Journal of Ecology* **95**: 614-622.
- Grunig CR, Duo A, Sieber TN, Holdenrieder O. 2008a.** Assignment of species rank to six reproductively isolated cryptic species of the *Phialocephala fortinii* s.l.-*Acephala applanata* species complex. *Mycologia* **100**: 47-67.
- Grunig CR, McDonald BA, Sieber TN, Rogers SO, Holdenrieder O. 2004.** Evidence for subdivision of the root-endophyte *Phialocephala fortinii* into cryptic species and recombination within species. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 676-687.
- Grunig CR, Queloz V, Duo A, Sieber TN. 2009.** Phylogeny of *Phaeomollisia piceae* gen. sp nov.: a dark, septate, conifer-needle endophyte and its relationships to *Phialocephala* and *Acephala*. *Mycological Research* **113**: 207-221.
- Grunig CR, Queloz V, Sieber TN, Holdenrieder O. 2008b.** Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l. - *Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. *Botany-Botanique* **86**: 1355-1369.
- Grunig CR, Sieber TN. 2005.** Molecular and phenotypic description of the widespread root symbiont *Acephala applanata* gen. et sp nov., formerly known as dark-septate endophyte Type 1. *Mycologia* **97**: 628-640.
- Grunig CR, Sieber TN, Holdenrieder O. 2001.** Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR–PCR) amplification. *Mycological Research* **105**: 24-32.

- Grunig CR, Sieber TN, Rogers SO, Holdenrieder O. 2002.** Genetic variability among strains of *Phialocephala fortinii* and phylogenetic analysis of the genus *Phialocephala* based on rDNA ITS sequence comparisons. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **80**: 1239-1249.
- Jumpponen A. 2001.** Dark septate endophytes - are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11**: 207-211.
- Jumpponen A, Mattson KG, Trappe JM. 1998.** Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* **7**: 261-265.
- Jumpponen A, Trappe JM. 1998.** Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist* **140**: 295-310.
- Kaldorf M, Renker C, Fladung M, Buscot F. 2004.** Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. *Mycorrhiza* **14**: 295-306.
- Kausrud H, Lie M, Stensrud O, Ohlson M. 2005.** Molecular characterization of airborne fungal spores in boreal forests of contrasting human disturbance. *Mycologia* **97**: 1215.
- Lingfei L, Anna Y, Zhiwei Z. 2005.** Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. *FEMS microbiology ecology* **54**: 367-374.
- Mandyam K, Jumpponen A. 2005.** Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* 173-189.
- Melin E. 1922.** On the Mycorrhizas of *Pinus Silvestris* L. and *Picea Abies* Karst: A Preliminary Note. *Journal of Ecology* **9**: 254-257.
- Munzenberger B, Bubner B, Wollecke J, Sieber TN, Bauer R, Fladung M, Huttli RF. 2009.** The ectomycorrhizal morphotype *Pinihiza sclerotia* is formed by *Acephala macrosclerotiorum* sp nov., a close relative of *Phialocephala fortinii*. *Mycorrhiza* **19**: 481-492.
- Narisawa K, Usuki F, Hashiba T. 2004.** Control of verticillium yellows in chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LtVB3. *Phytopathology* **94**: 412-418.
- Newsham KK. 1999.** *Phialophora graminicola*, a dark septate fungus, is a beneficial associate of the grass *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*. *New Phytologist* **144**: 517-524.
- Newsham KK, Upson R, Read DJ. 2009.** Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology* **2**: 10-20.
- Odell TE, Massicotte HB, Trappe JM. 1993.** Root Colonization of *Lupinus-Latifolius* Agardh and *Pinus-Contorta* Dougl by *Phialocephala-Fortinii* Wang and Wilcox. *New Phytologist* **124**: 93-100.
- Peterson RL, Wagg C, Pautler M. 2008.** Associations between microfungual endophytes and roots: do structural features indicate function? *Botany-Botanique* **86**: 445-456.

- Queloz V, Grunig CR, Sieber TN, Holdenrieder O. 2005.** Monitoring the spatial and temporal dynamics of a community of the tree-root endophyte *Phialocephala fortinii* sl. *New Phytologist* **168**: 651-660.
- Rains KC, Nadkarni NM, Bledsoe CS. 2003.** Epiphytic and terrestrial mycorrhizas in a lower montane Costa Rican cloud forest. *Mycorrhiza* **13**: 257-264.
- Read DJ, Haselwandter K. 1981.** Observations on the Mycorrhizal Status of Some Alpine Plant-Communities. *New Phytologist* **88**: 341-352.
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM. 2002.** Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* **298**: 1581.
- Ruotsalainen AL. 2003.** Mycorrhizal colonization and plant performance in arcto-alpine conditions. *ACTA-UNIVERSITATIS OULUENSIS SERIES A SCIENTIAE RERUM NATURALIUM*.
- Ruotsalainen AL, Kytoviita MM. 2004.** Mycorrhiza does not alter low temperature impact on *Gnaphalium norvegicum*. *Oecologia* **140**: 226-233.
- Scervino JM, Gottlieb A, Silvani VA, Pergola M, Fernandez L, Godeas AM. 2009.** Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 1753-1756.
- Selosse MA, Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 15-20.
- Sraj-Krzic N, Pongrac P, Klemenc M, Kladnik A, Regvar M, Gaberscik A. 2006.** Mycorrhizal colonisation in plants from intermittent aquatic habitats. *Aquatic Botany* **85**: 333-338.
- Stoyke G, Currah RS. 1991.** Endophytic fungi from the mycorrhizae of alpine ericoid plants. *CAN.J.BOT./J.CAN.BOT.* **69**: 347-352.
- Summerbell RC. 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* 121-145.
- Upton R, Newsham KK, Read DJ. 2008.** Root-Fungal Associations of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in the Maritime and Subantarctic. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* **40**: 592-599.
- Urban A, Puschenreiter M, Strauss J, Gorfer M. 2008.** Diversity and structure of ectomycorrhizal and co-associated fungal communities in a serpentine soil. *Mycorrhiza* **18**: 339-354.
- Usuki F, Narisawa H. 2007.** A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* **99**: 175-184.

- Vohník M, Albrechtova J, Vosatka M. 2005.** The inoculation with *Oidiodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake, foliar C : N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron* cv. Azurro. *Symbiosis* **40**: 87-96.
- Vohník M, Lukancic S, Bahor E, Regvar M, Vosatka M, Vodnik D. 2003.** Inoculation of *Rhododendron* cv. Belle-Heller with two strains of *Phialocephala fortinii* in two different substrates. *Folia Geobotanica* **38**: 191-200.
- Wagg C, Pautler M, Massicotte HB, Peterson RL. 2008.** The co-occurrence of ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedlings of four members of the Pinaceae. *Mycorrhiza* **18**: 103-110.
- Wang CJK, Wilcox HE. 1985.** New Species of Ectendomycorrhizal and Pseudomycorrhizal Fungi - *Phialophora*-Finlandia, *Chloridium*-Paucisporum, and *Phialocephala*-Fortinii. *Mycologia* **77**: 951-958.
- Wilson BJ, Addy HD, Tsuneda A, Hambleton S, Currah RS. 2004.** *Phialocephala sphaeroides* sp nov., a new species among the dark septate endophytes from a boreal wetland in Canada. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **82**: 607-617.
- Yonezawa M, Usuki F, Narisawa K, Takahashi J, Hashiba T. 2004.** Anatomical study on the interaction between the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira* and Chinese cabbage. *Mycoscience* **45**: 367-371.
- Yu T, Nassuth A, Peterson RL. 2001.** Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Canadian Journal of Microbiology* **47**: 741-753.
- Zhang C, Yin LJ, Dai SL. 2009.** Diversity of root-associated fungal endophytes in *Rhododendron fortunei* in subtropical forests of China. *Mycorrhiza* **19**: 417-423.
- Zimmerman E, Peterson RL. 2007.** Effect of a dark septate fungal endophyte on seed germination and protocorm development in a terrestrial orchid. *Symbiosis* **43**: 45-52.