



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Katedra biologie ekosystémů

Složení společenstev endofytických mikroorganismů osídlujících listy hemiparazitických rostlin

Bakalářská práce

Ilona Svobodová

Vedoucí práce: RNDr. Dagmara Sirová, Ph.D.,

Školitel specialista: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

Biologické centrum AV ČR

České Budějovice, 2019

Svobodová, I., 2019: Složení společenstev endofytických mikroorganismů osídlujících listy hemiparazitických rostlin. [The community composition of endophytic microorganisms colonizing foliar parts of hemiparasitic plants. Bc. Thesis, in Czech.] 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Bakalářská práce se zabývá složením endofytických společenstev mikroorganismů ve foliárních částech vybraných středoevropských druhů parazitických rostlin a jejich potenciálních hostitelů. Zaměřuje se na popis struktury a diverzity společenstev bakterií a hub a případné rozdíly ve složení mikrobiomu mezi parazitickými a neparazitickými druhy rostlin.

Klíčová slova

Bakterie, Endosféra, Endofytické mikroorganismy, Hostitel, Houby, Interakce rostlina-mikrob, Podpora růstu, Mutualismus, Sekundární metabolity, Sekvenování nové generace, Složení společenstva

Annotation

This bachelor's thesis focuses on describing the community composition of endophytic microorganisms colonizing foliar parts of selected Central-Europaeian species of parasitic plants and their potential hosts. The aim is to find specific differences in the structure and diversity of bacterial and fungal endophytes between plant species with parasitic and non-parasitic life strategy.

Keywords

Bacteria, Community structure, Endosphere, Endophytic microbes, Fungi, Growth promotion, Mutualism, Next generation sequencing, Plant-microbe interactions, Plant host, Secondary metabolites

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovat RNDr. Dagmarě Sirové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení, její podnětné a cenné rady, připomínky, a zároveň za velkou trpělivost. Mé díky patří i prof. RNDr. Janu Lepšovi za vybrání hemiparazitických druhů rostlin a jejich nalezišť. Také bych chtěla poděkovat Evě Holé a Caiu Cesar Pires de Paulovi za pomoc v laboratoři a v experimentální části práce. Dále mé díky patří Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za pomoc při bioinformatickém zpracování sekvenačních dat.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	3
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
3.1	Rostlinný mikrobiom	4
3.1.1	Rostlinná endosféra a definice endofytických mikroorganismů	4
3.1.2	Rostliny s parazitickou životní strategií - experimentální skupina využítá v této práci 20	
4	METODIKA	22
4.1	Charakteristika lokalit	22
4.2	Sběr materiálu	25
4.2.1	Parazitické rostliny zahrnuté do vzorkování	25
4.2.2	Potencialní hostitelské rostliny zahrnuté do vzorkování	28
4.3	Zpracování materiálu a povrchová sterilizace listů	28
4.4	Izolace DNA a stanovení celkové koncentrace	28
4.5	PCR	29
4.5.1	PNA blokátory	29
4.5.2	Amplifikace 16S rRNA	31
4.6	Příprava sekvenačních knihoven, sekvenování a bioinformatické zpracování sekvenačních dat 32	
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
6	ZÁVĚR	43
7	REFERENCE	44

1 ÚVOD

Orgány a pletiva rostlin představují prostředí kolonizované velkým množstvím mikroorganismů. Vyjma epifytů, žijících na povrchu rostlin, rhizosférických mikrobů, nacházející se na rozhraní půdy a kořenového systému, či parazitických hub, napadajících kterýkoliv rostlinný orgán, tvoří rostlinný mikrobiom i mikroorganismy endofytické (Tadych, & White, 2019).

Většina mikroorganismů, žijících ve spojení s rostlinami, je schopná kolonizovat a přetrvávat pouze na povrchu rostlinné tkáně či v rhizosféře. Některé z nich jsou schopny proniknout z rhizosféry, popřípadě fylosféry, dovnitř rostlinné tkáně hostitele. Takové mikroorganismy nazýváme endofytické. Endofyty žijí v úzkém spojení s hostitelem po většinu svého životního cyklu (Bacon, & Hinton, 2006). Pro účely této práce jsem je definovala jako mikroorganismy, které alespoň část svého životního cyklu žijí uvnitř rostlinných pletiv a po tuto dobu nezpůsobují svému hostiteli žádné viditelné škody. Mezi endofytické mikroorganismy většinou zahrnujeme druhy ze tří skupin: *Archaea*, *Eubacteria* a *Fungi* (Vandenkoornhuysse et al., 2015).

Na počátku 70. let byl vztah mezi rostlinami a endofyty považován za neutrální: rostliny v jejich přítomnosti sice nevykazovali známky nemoci, ale ani žádný zjevný prospěch. Ukázalo se ale, že endofytické mikroorganismy mohou napomáhat rostlinnému růstu, poskytují ochranu proti abiotickým a biotickým faktorům, dále rezistenci hostitele vůči různým patogenům a herbivorům, a to produkcí antibiotik a jiných sekundárních metabolitů. Syntetizují některé fytohormony a hrají klíčovou úlohu v adaptaci hostitelské rostliny měnícímu se prostředí. V neposlední řadě mají schopnost mobilizovat nerozpustný fosfát a poskytovat hostiteli dusík pomocí procesu biologické fixace. Uvnitř rostlinných tkání mají zajištěnou dodávku potřebných živin a ochranu před neustálými výkyvy fyzikálně-chemických parametrů vnějšího prostředí. Nicméně tato tzv. endosféra není prostředím zcela bez stresu. Endofytické organismy se musí vypořádat s imunitní odpovědí hostitele či zvýšenou kompeticí v omezeném prostoru (Souhrnné informace v práci Azevedo et al., 2000).

Mezi nejdiskutovanější problémy současnosti patří otázka ochrany životního prostředí. Neustále rostoucí lidská populace na straně jedné a plýtvání potravinami na straně druhé vyvíjí enormní tlak na zvýšení produkce zemědělských plodin, což ústí v nadužívání chemických hnojiv, pesticidů, herbicidů a následnou degradaci půdy a ekosystémových funkcí obecně. Je zjevné, že rostlina a její mikrobiom tvoří ekologickou a evoluční jednotku (Uroz et al., 2019)

a jednou z možností, jak snížit negativní environmentální dopady, způsobené nadměrným používáním chemických látek v zemědělství, je využití přirozených schopností některých endofytů výrazně zlepšovat růstové vlastnosti rostlin. Bylo prokázáno, že různorodé endofytické mikrobiální komunity hrají jedinečnou roli ve fungování agroekosystémů (Miliute et al., 2015). Díky umělé inokulaci semen nebo semenáčků vybranými kmeny bakterií nebo hub získávají plodiny větší odolnost vůči různým stresovým faktorům, jako je např. zvýšená tolerance k chladu, větší odolnost k vysoušení, nebo odolnost vůči patogenům. Klíčovým faktorem pro budoucí využití endofytů je znalost jejich ekofyziologie, diverzity, funkce a povahy interakcí s rostlinnými hostiteli (Mei, & Flinn, 2009)

Většina dosud publikovaných prací se zabývá endofyty u jednotlivých, většinou ekonomicky významných, druhů (Qian et al., 2014; Zhou et al., 2015). Díky staletím umělé selekce je ale složení a funkce mikrobiomu u těchto rostlin výrazně pozměněno směrem k nižší produkci nežádoucích sekundárních metabolitů, které mají negativní vliv na chuť, konzumovatelnost, či jiné ekonomické využití (Pérez-Jaramillo et al., 2018). Úloha endofytických společenstev v přirozených ekosystémech zatím téměř není prozkoumána, rovněž jejich sledování v rámci určité skupiny rostlin s podobnou životní strategií, ale různou fylogenezí nebylo zatím publikováno. Ve své práci jsem se proto zaměřila na jasně ekologicky vyhraněnou modelovou skupinu – kořenové hemiparazitické rostliny, považované za klíčové „ekosystémové inženýry“, ovlivňující strukturu vegetace i dynamiku společenstev (Hatcher et al., 2012).

2 CÍLE PRÁCE

Hemiparazité zahrnují fylogeneticky příbuzné, ale i vzdálené druhy, které spojuje společná životní strategie. Na rozdíl od holoparazitů jsou to zelené rostliny, schopné fotosyntézy – od hostitelské rostliny přijímají zejména vodu a minerální živiny, a to prostřednictvím haustorií, napojených na dřevní část cévního svazku hostitele. Lze proto předpokládat, že jejich výrazně odlišné nakládání s živinami v porovnání s neparazitickými rostlinami bude mít významný vliv na jejich kolonizaci endofytickými mikroorganismy. Na základě tohoto předpokladu a literární rešerše jsem formulovala následující pracovní hypotézu:

Díky pravděpodobně větší dostupnosti minerálních i organických živin budou mít bakteriální společenstva foliární endosféry u parazitických druhů rostlin menší diverzitu, ale větší míru specifity než neparazitické druhy rostlin.

Cílem této práce je:

1. Shromáždění dostupné literatury vztahující se k ekofyziologické úloze endofytů u rostlin obecně
2. Terénní odběr vzorků listů třech hemiparazitických druhů a jejich potenciálních hostitelů na vybraných lokalitách v jižních Čechách
3. Analýza složení společenstev foliárních endofytických bakterií ve vzorcích pomocí amplikonového sekvenování
4. Základní popis složení bakteriálního mikrobiomu a případných rozdílů mezi experimentálními rostlinnými druhy

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rostlinný mikrobiom

Rostliny, stejně jako všechny vyšší organismy, jsou kolonizovány širokým spektrem mikroorganismů, jak uvnitř jejich tkání, tak i vně, neboli v endosféře a ektosféře. Rostlinného hostitele a jeho „fytobiom“ lze komplexně označit jako „holobionta“ a souhrnný genom všech přítomných jednotlivých „biontů“ jako „hologenom“ (Hassani et al., 2018) Hologenom je mnohonásobně větší než genom samostatné hostitelské rostliny a významně tak rozšiřuje její ekofyziologický potenciál (Rosenberg, & Zilber-Rosenberg, 2018).

Fytobiom tvoří zejména bakterie a houby, v menší míře *Archaea* (Schwartz, 2007). Kolonizace mikroby se netýká jen suchozemských rostlin, i vodní rostliny představují vhodný substrát pro kolonizaci. Mikroorganismy se do kontaktu s rostlinou dostávají skrz vzduch, vodu či živočišné vektory, nebo mohou být mikroorganismy přítomny v germinujících částech rostliny. Následně mikroorganismy kolonizují různé části rostliny a pletiva, které představují celou škálu rozmanitých mikroprostředí (ekologických nik) s rozdílnými fyzikálně-chemickými parametry (Zhang et al., 2011).

3.1.1 Rostlinná endosféra a definice endofytických mikroorganismů

Jedním z mikroprostředí vhodných k mikrobiální kolonizaci je i tzv. endosféra rostlin, která zahrnuje vnitřní rostlinná pletiva a osídlující fytobiom. Termín „endofyt“ byl poprvé použit v roce 1866 zakladatelem rostlinné patologie Heinrichem Antoinem de Barym. Definoval jej jako organismus, který roste uvnitř rostlinných tkání. Postupem času se definice endofytických mikroorganismů různě modifikovala a různí autoři je definují různými způsoby. Nejčastěji akceptovaná definice považuje endofyty za mikroorganismy, které mohou kolonizovat vnitřní prostředí rostlinných tkání v jakémkoliv vývojovém stádiu rostlin, aniž by vyvolávaly viditelné příznaky onemocnění. Nicméně Fesel and Zuccaro (Fesel, & Zuccaro, 2016) tuto problematiku pojali mnohem komplexněji a jejich vymezení endofytických mikrobů nespécifikuje jejich funkční vztah, a kromě komensálních symbiontů zahrnuje i latentní patogeny nebo saprotrofy. Dále mikrobi, jež v jednu chvíli přetrvávají uvnitř rostlinné tkáně, aniž by ji strukturně či funkčně poškozovaly, se mohou v jiné části svého životního cyklu stát patogenními či saprobními. Jedna ze současných studií odhalila, že typická, pro rostliny prospěšná skupina bakteriálních endofytů, konkrétně skupina pseudomonád, byla schopna se za určitých podmínek změnit z mutualistů na patogeny (Gera Hol et al., 2013).

Jeden z nejlépe popsaných endofytických vztahů, jež hraje významnou úlohu v terestrických ekosystémech, je velice těsná interakce mezi rhizobii a hostitelskými rostlinami z čeledi Fabaceae (Santoyo et al., 2016). Existuje ale velké množství méně těsných vztahů mezi endofyty a rostlinami, kterým zatím rozumíme jen velice málo (Hardoim et al., 2015).

3.1.1.1 Kolonizace endosféry

Kolonizace rostliny mikroby zahajuje tzv. cross-talk, kdy hostitel i mikroorganismus vysílá signální molekuly. Signální molekuly jsou obsaženy i v kořenových exudátech, a potencionální endofyty na jejich přítomnost odpovídají chemotaxí (Rosenblueth, & Martínez-Romero, 2006). Jednou skupinou metabolitů sekretovaných rostlinami, které náleží mezi chemoatraktanty, jsou flavonoidy (Arora, & Mishra, 2016). Bylo prokázáno, že v případě kolonizace kořenů rýže a pšenice endofytickými kmeny *Serratia* sp. EDA1 a *Azorhizobium caulinodans* ORS571 byla míra osídlení mnohem větší za přítomnosti flavonoidů (Balachandar et al., 2006). K dalším známým signálním molekulám patří lipo-chitooligosacharidy, neboli Nod-faktory, jež aktivují společnou symbiotickou dráhu (common symbiotic pathway) v arbuskulárních mykorhizách či asociacích *Rhizobium*-Fabaceae (Gough, & Cullimore, 2011). Studie též naznačují důležitou úlohu arabinogalaktanových proteinů, jež náleží do nadrodiny glykoproteinů nacházejících se v buněčných stěnách rostlin. Tyto proteiny mají očividně roli v kolonizaci kořenů, působící coby atraktanty pro mikroby, a též ve vývoji různých infekčních struktur (Nguema-Ona et al., 2013). Recentní studie (Rozpadek et al., 2018) odhalila význam fytohormonu strigolaktonu vylučovaného kořeny *Arabidopsis thaliana* jakožto signální molekuly pro iniciaci kolonizace endofytickou houbou rodu *Mucor*. Rovněž mnohé cukry, aminokyseliny, organické kyseliny, fenolické sloučeniny, a jiné sekundární metabolity jsou sekretovány rostlinnými kořeny, selektivně přitahující různé mikroorganismy (Chagas et al., 2017).

Pouze malá subpopulace mikroorganismů osidlujících rhizosféru nebo fylosféru je schopna proniknout a žít uvnitř rostlinných pletiv (Reinhold-Hurek, & Hurek, 2011). Nicméně naše povědomí o specifických místech, kudy endofyty pronikají dovnitř rostlinné tkáně, je velmi malé. Obecně se předpokládá, že drtivá většina endofytů pochází z půdy, konkrétně z rhizosféry, leč nezanedbatelné množství získává přístup do rostliny i skrze listy, květy, stonky či kotyledony (Berg, & Hallmann, 2006). Mikrobi penetrují kořeny pasivně prostřednictvím trhlin a ran lokalizovaných např. v místech vzniku postranních kořenů. Takové kořenové praskliny či poranění mohou být zapříčiněné aktivitou mikrobů, hlístic, případně členovců.

Dalším možným místem pro invazi rhizosférických mikrobů do endosféry mohou být tenkostěnné povrchové vrstvy v apikální části kořene, včetně zóny diferenciacní, absorpční a elongační, jakož i intracelulární prostory kořenové epidermis (Reinhold-Hurek et al., 2011). V případě nadzemních částí jsou asi nejčastějším místem proniknutí do endosféry stomata. Ke specifickým strukturám, jimiž si endofyty dopomáhají k přichycení k rostlinnému pletivu patří pili typu IV, lipopolysacharidy a exopolysacharidy (Hardoim et al., 2008). Mechanismy průniku dovnitř rostlinných částí jsou ale z velké části neznámé. Jakmile mikrobi překonají exodermální bariéru, mohou zůstat v místě vstupu nebo se pohybovat směrem k mezibuněčnému prostoru i do vzdálenějších částí rostliny. Časté je také osídlení a pohyb v cévních svazcích (Compant et al., 2005).

3.1.1.2 Imunitní odpověď rostlin na přítomnost mikroorganismů v endosféře

Během přechodu rostlin na souš (cca před 470 miliony let) nebo pravděpodobně ještě mnohem dříve, si rostliny vytvořily mutualistický vztah s mikroorganismy, na němž jsou závislé dodnes (není známo období v evoluci rostlin, kdy by tento vztah nebyl klíčový; Kenrick, & Strullu-Derrien, 2014). Má se za to, že v důsledku nízké dostupnosti živin v rané půdě se rostliny postupně přizpůsobovaly životu v symbióze, např. s houbami spadající do Glomeromycotina a Mucoromycotina, jejichž hyfy interagovaly s rostlinnými tkáněmi a následně poskytovaly hostiteli anorganické živiny a vodu, na druhou stranu získávaly uhlík syntetizovaný rostlinou (Field et al., 2015). Paralelně s utvořením oboustranně prospěšných vztahů se objevily i interakce mezi rostlinami a patogeny (Parniske, 2000). Jelikož jsou rostliny přisedlými organismy, byly během evoluce nuceny vyvinout mechanismy na obranu a přizpůsobení se těmto antagonistickým interakcím. Klíčovými body v úspěšné obraně rostlin proti nežádoucím mikrobiálním kolonizátorům je jejich rozpoznání hostitelem a rychlé a efektivní aktivování obranných mechanismů (Vandenkoornhuyse et al., 2015).

Rostliny, na rozdíl od živočichů, nedisponují specializovanými imunitními buňkami, které by selektivně produkovaly protilátky. Avšak na stranu druhou, není pro mikroby zcela snadné do rostliny proniknout. Za účelem ubránění se před poškozením si rostliny vyvinuly širokou škálu konstitutivních i indukovaných obranných mechanismů. Konstitutivní obrana zahrnuje různé strukturální bariéry, které často kryjí povrch rostlin, jako je např. voskovitá kutikula, a v neposlední řadě kůra u dřevin. Nejenže tyto části chrání rostlinu před invazí, ale též jí poskytují pevnost a tuhost (Hanley et al., 2007).

Indukované obranné mechanismy u rostlin je možné rozdělit do dvou skupin. První obranná linie imunitního systému rostliny je tvořena extracelulárními transmembránovými receptory PRRs (pattern recognition receptors), které jsou schopny rozpoznat přítomnost molekul mikrobiálního původu, tzv. PAMPs/MAMPs (pathogen/microbial-associated molecular patterns) a poté je navázat. Tyto molekulární vzorce jsou esenciální pro mikrobiální fitness a přežití, a z toho důvodu evolučně zakonzervované napříč různými druhy mikroobů (Boller, & Felix, 2009).

Ke známým MAMPs se řadí flagellin (flg), elongační faktor TU (EF-Tu), peptidoglykan (PGN), lipopolysacharidy (LPSs), bakteriální protein studeného šoku (RNP1motif), β -glukany, houbový chitin, bakteriální superoxid dismutázy (Sod) (Newman et al., 2013). V případě identifikace MAMPs rostlinnými receptory spustí rostlina imunitní odpověď, tzv. PTI (pattern-triggered immunity) (Dodds, & Rathjen, 2010). Tato reakce je doprovázena ukládáním kalózy do buněčných stěn, uzavřením stomat, syntézou antimikrobiálních látek a sekundárních metabolitů, zejména však produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) (Hammond-Kosack, & Jones, 1996).

Endofytické mikroorganismy vyvinuly mechanismy, jimiž potlačí PTI signalizaci či zabrání detekci hostitelem (Dodds et al., 2010). Kupříkladu houbové endofyty, jejichž chitinové oligomery vyskytující se v buněčné stěně jsou rozpoznány chitin-specifickými rostlinnými receptory (PR-3), produkují efektorové molekuly virulence. Konkrétně se jedná o chitin deacetylázy, které deacetylují chitosanové oligomery. Tímto způsobem se houbové endofyty vyhnou detekci rostlinnými receptory (Cord-Landwehr et al., 2016). Dále existují důkazy i o endofytických bakteriích produkujících MAMPs, jež buď nejsou rostlinnými PRRs rozpoznávány, anebo v odpovědi na penetraci spouští poměrně slabou a přechodnou obrannou reakci na rozdíl od napadení patogenem (Vandenkoornhuyse et al., 2015). V případě tvorby reaktivních kyslíkových částic rostlinnými buňkami se endofyty brání produkcí enzymů, jako jsou superoxid dismutázy (SOD), katalázy (CatA), peroxidázy (POD), alkyhydroperoxidové reduktázy (AhpC) a glutathion-S-transferázy (GST) (Zeidler et al., 2004).

Rostliny si v reakci na přítomnost patogena ve vnitřních pletivech také vytváří sekundární obrannou linii zahrnující rezistenční geny (R geny), jež kódují specifické proteiny tzv. NB-LRR (nucleotid binding-leucine rich repeat receptor). Tyto proteiny zprostředkovávají rozpoznání efektorových molekul kolonizátora. V reakci na identifikaci těchto látek, dříve nazývaných efektorů virulence, rostliny spouští velmi silnou efektorovou vyvolanou imunitu ETI

(disease resistance effector-triggered immunity). Tato reakce je často doprovázená hypersenzitivní reakcí (HR), jež je charakterizována úmyslnou sebevraždou rostlinných buněk v místě infekce (Thomma et al., 2011).

Pokud mikroorganismus tyto imunitní mechanismy překoná a je schopný efektivně kolonizovat endosféru bez symptomů poškození rostlinné tkáně nebo negativního vlivu na růst, lze ho považovat za funkční součást mikrobiomu endosféry.

3.1.1.3 Míra interakce mezi rostlinami a endofyty

Společenství endofytů můžeme rozdělit dle jejich životního stylu i dle různého mechanismu pronikání do vnitřních tkání rostliny na obligátní, fakultativní, nebo oportunisty. Endofyty klasifikované jako obligátní vyžadují pro své přežití a pro dokončení životního cyklu hostitele, na jehož metabolické aktivitě jsou závislí. Mezi nejlépe prozkoumané obligátní endofyty patří některé mykorhizní houby a příslušníci následujících rodů: *Balansia*, *Epichloë*, a *Neotyphodium* z čeledi *Clavicipitaceae* (*Ascomycota*) (Parniske, 2008). Tyto mikroorganismy jsou přenášeny semeny a uvnitř rostliny se šíří vertikálně nebo prostřednictvím vektoru, jinými slovy nepochází z rhizosféry. Naopak oportunní endofytické mikroorganismy pronikají do rostlinné endosféry skrz náhodná poranění, ovšem pouze sporadicky, a prosperují převážně na povrchu hostitelské rostliny. K oportunním endofytům se řadí např. bakterie rodu *Pseudomonas* a *Azospirillum* a houby rodu *Hypocrea* a *Trichoderma*. Jedná se o endofyty přenášené horizontálně prostřednictvím větru. Mezi těmito dvěma extrémy se nachází přechodná skupina zahrnující drtivou většinu endofytických mikroorganismů, tzv. „fakultativní“ endofyty. Tyto organismy mohou žít nezávisle, či v určité fázi svého životního cyklu penetrovat dovnitř hostitele. Zda-li využívají hostitele coby vektoru k jejich rozšiřování či jsou aktivně selektovány samotnou rostlinou, je stále předmětem vědeckého bádání (Hardoim et al., 2015).

3.1.1.4 Adaptace mikroorganismů na vnitřní prostředí rostliny

Mikrobi obývající rostlinnou endosféru se musí určitým způsobem adaptovat na toto prostředí. Nicméně, ve srovnání s prostředím na povrchu rostlin, které je vystaveno neustálým výkyvům fyzikálně-chemických parametrů, včetně vysokých dávek UV záření, je interiér hostitele pro endofyty tzv. „safe heaven“ a to primárně z důvodu stálého, byť v případě listů limitovaného, přísunu živin a chráněného prostředí. Nicméně v důsledku omezeného prostoru lze očekávat zvýšenou mezidruhou kompetici (Hardoim et al., 2015).

Endofyty se nejčastěji usídľují v intercelulárních prostorech rostlinných tkání, jelikož se zde nacházejí v relativně hojném množství jak anorganické, tak i organické živiny. Interceluláry se tvoří během ontogenetického vývoje pletiv, konkrétně juxtaepozicí (umístěním vedle sebe) tří až čtyř buněk a následným rozpuštěním středních lamel. Na tvorbě mezibuněčných prostorů se dále podílí tlak turgoru a cytokiny (Jarvis, 1998). Endofytické mikroorganismy se na tomto procesu mohou podílet, a to produkcí cytokinů či celulolytických enzymů (Onofre et al., 2014).

Zatímco intercelulární prostory v kořenech se nacházejí v jejich kortikální části, v listech a stoncích se nacházejí převážně v extrafascikulárních parenchymálních tkáních. Jejich morfologie se liší napříč odlišnými orgánovými strukturami. Kořenové interceluláry jsou obvykle schizogenní, vzniklé rozpuštěním střední lamely a oddělením buněk od sebe, kdežto v travinách se tvoří lýzí, čili rozpuštěním buněk, tzv. lyzigenní interceluláry. Rozdíly jsou patrné také ve složení. Některé interceluláry sestávají ze vzduchu, odloučovajících se ložisek (flaky deposits), ale drtivá většina obsahuje vodu nasycenou kyslíkem, s obsahem anorganických iontů, tj. K, Ca, S, P a Cl (Canny, & Huang, 1993).

Současný výzkum naznačuje, že transport živin uvnitř rostlinných tkání se odehrává apoplastickou cestou skrz mikrokapilární prostory v buněčných stěnách a interceluláry (Canny, 1995). Koncentrace živin dostupných v apoplastu koreluje s povahou floému, což vyvrací dřívější předpoklady o relativním nedostatku živin v apoplastu (Dong et al., 1994). Organické látky v apoplastu jsou zastoupeny uhlovodíky, převážně glukózou a sacharózou (Madore, & Webb, 1981), a necukernými látkami, např. glutaminem, aspartovou kyselinou nebo amonnými ionty (Canny, & McCully, 1988). Mimoto je regulace koncentrací živin částečně řízena přítomnými endofytickými mikroorganismy, jež tyto živiny zužitkovávají (Madore et al., 1981), či přemísťují (Tetlow, & Farrar, 1993). Kupříkladu apoplastická sacharóza ve zdravých listech představovala 0,4 % z celkového množství rozpustných uhlovodíků, na rozdíl od infikovaných tkání, kde zaujímala pouze 0,2 % (Tetlow et al., 1993). Koncentrace živin je tedy proměnlivá a otázkou zůstává, zda jsou endofyty schopné modifikovat směr jejich toku. Giaquinta (1976) naznačuje, že existuje přímá korelace mezi nízkými koncentracemi cukrů ve floému a pH (protonovým gradientem přes plazmatickou membránu), tj. v důsledku změny pH endofyty v apoplastu vznikne koncentrační gradient, jenž umožní tok uhlovodíků směrem k endofytům. Nicméně práce, zaměřená pouze na nemocné tkáně infikované rzi, v nichž se v důsledku zvýšení pH z 6,6 na 7,3 snížila celková koncentrace rozpustných uhlovodíků o 35 % až 40 %, naznačuje i dynamickou povahu interakcí mezi endofytem a hostitelem.

Nejvýznamnější příspěvek k porozumění genetickému potenciálu, ekofyziologii a evoluci mikroorganismů přinesla široká dostupnost různých metod sekvenování nové generace v poslední dekádě. Nedávná analýza několika genomů bakteriálních endofytů přispěla k nahlédnutí do molekulárních mechanismů, které umožňují kolonizaci endosféry a dále např. synergické interakce s hostitelem. Tímto způsobem lze rozluštit chování endofytických mikroorganismů či je rozlišit od úzce příbuzných neendofytických kmenů. Kupříkladu metabolické studie odhalily, že výskyt genů podílejících se na biosyntetických procesech byl hojnější a rozmanitější mezi endofyty, zatímco geny zapojené v katabolických drahách, zejména ty, které se účastní degradace buněčné stěny a invaze hostitele, se nacházely výhradně v genomech fytopatogenů (Karpinets et al., 2014). Dále studie zmiňuje rozdíl v sekrečních systémech, konkrétně pro genomy patogenů byly exkluzivní lokusy související s invazí, naopak u nepatogenních endofytů převažovaly genomové lokusy kódující enzymy fixace dusíku a ribulózu bisfosfátkarboxylázu/oxygenázu (RubisCO).

3.1.1.5 Diverzita endofytických mikroorganismů

3.1.1.5.1 Houbové endofyty

Houbové endofyty jsou skupinou askomycetózních hub. Ty druhy, jež se podařilo vyizolovat a charakterizovat, lze rozdělit do čtyř hlavních skupin odrážejících rozdíly v evoluční příbuznosti, taxonomii, rostlinných hostitelích a ekologických funkcích.

3.1.1.5.1.1 Třída I (Clavicipitaceae)

Endofyty z čeledi Clavicipitaceae byly objeveny na konci 19. století v travách rodu *Lolium* (Guerin, 1898). Zprvu se předpokládala jejich spojitost s toxickými syndromy, které v té době vykazoval skot pasoucí se na těchto travách. Tuto hypotézu vyvrátil až v roce 1988 Keith Clay, který je popsal jako obranné mutualisty hostitelských trav (Clay, 1988).

Tato skupina, asociující s trávami, rákosím a ostřicemi, zahrnuje druhy z kmene Ascomycota, konkrétně z řádu Hypocreales. Ke konkrétním příkladům patří rody např. *Balansia* spp., *Epichloë* spp. a *Claviceps* spp.) (Bacon, & White Jr, 2000). Produkují sekundární metabolit peramin, jež zvyšuje odolnost hostitele vůči herbivorům (Tanaka et al., 2005). Zajímavým příkladem je trávka *Achnatherum robustum*, druh běžný v západní části USA. Je kolonizován endofytickou houbou produkující amidy kyseliny lysergové. Pokud např. pasoucí

se koně zkonsumují i relativně malé množství této trávy, je pravděpodobné, že budou spát až po dobu tří dnů a postupně se zotaví. Po zkušenosti s těmito toxickými účinky se savci těmto travám v budoucnu vyhýbají (Faeth et al., 2006). Protože mezi hostitele hub z této čeledi patří i obilniny, jsou Clavicipitaceae zatím nejlépe prozkoumanou skupinou endofytických hub (STONE et al., 2004).

Endofytické houby, které nepatří do čeledi Clavicipitaceae (non-clavicipitaceae endophytes) byly tradičně považovány za jednu funkční skupinu. Je však zřejmé, že tyto vysoce rozmanité houby lze prozatím klasifikovat nejméně do tří funkčních skupin na základě rozdílů v ekofyziologii a vlivu na hostitele.

3.1.1.5.1.2 Třída II

Tato rozmanitá třída zahrnuje druhy z kmenů Ascomycota i Basidiomycota. Druhy této třídy kolonizují jak kořeny, tak stonky a listy. Typickým znakem této skupiny endofytů je dobře definovatelný, oboustranně výhodný mutualistický vztah s hostitelem. Kupříkladu endofyt *Curvularia protuberata* kolonizuje pletiva rostliny *Dichantheium lanuginosum*, rostoucí v oblastech s geotermální aktivitou (Rodriguez et al., 2009). Pokud nežijí v mutualistickém vztahu, ani rostlina ani houba nejsou schopny tolerovat teploty nad 40 °C, avšak symbiotický způsob života umožní oběma partnerům tolerovat teplotu až do 65 °C. Podobný scénář by pozorován u druhu *Fusarium culmorum* kolonizujícího pletiva trávy *Leymus mollis*: nesymbiotický způsob života tato rostlina nepřežije, avšak ve společném soužití jsou oba partneři schopni tolerovat vysoké hladiny salinity v rozmezí 300 - 500 mM Na-Cl (Rodriguez et al., 2009).

3.1.1.5.1.3 Třída III

Tato třída endofytů obývá primárně nadzemní části rostlin. Vyznačuje se vysokou rozmanitostí v rámci hostitelských tkání, rostlin a populací a zahrnuje druhy jak z Ascomycota tak z Basidiomycota (Higgins et al., 2007). Vzhledem k jejich pozoruhodné rozmanitosti v rámci tkání hostitelů, je obtížné rozeznat ekologické role endofytů této třídy a ve většině případů nebyly zatím prozkoumány.

3.1.1.5.1.4 Třída IV

V průběhu studia a izolace ektomykorhizních hub objevil Merlin hnědavě-černé pigmentované houby osidlující kořeny terestrických rostlin. Nazval je „mycelium radicus astrovirens“ (MRA) (Spatafora et al., 2016). Krátce poté, Peyronel zveřejnil více než 135 druhů semenných rostlin, u kterých se tmavě pigmentované houby v pletivech kořenů vyskytují (Peyronel, 1924). V současné době se tyto houby nazývají „dark septate endophytes“ (DSE) a tvoří čtvrtou skupinu houbových endofytů. Jsou charakterizovány přítomností temně melanizovaného septa a kolonizací výlučně kořenových částí hostitelských rostlin, kde tvoří inter – a intracelulární hyfy a mikrosklerotie. Druhy z této skupiny patří výlučně mezi Ascomycota a v současnosti známe více než 600 krytosemenných i nahosemenných hostitelských rostlin. Taxonomie, fyziologie i ekologická úloha této skupiny endofytů zatím není příliš prozkoumána (Jumpponen, & Trappe, 1998). Některé druhy ale významně snižují fytotoxicitu těžkých kovů: kupříkladu *Exophiala pisciphila* kolonizující kořeny *Zea mays*, rostoucí v půdě kontaminované kadmíem, měla příznivý vliv na růst hostitele za těchto podmínek snížením koncentrace kadmia v pletivech, regulací fytohormonů a udržením fyto-syntetické aktivity (Wang et al., 2016).

3.1.1.5.2 Endofytické bakterie

Endofytické bakterie byly poprvé popsány v Německu na začátku minulého století (Freeman, 1904). Na rozdíl od endofytických hub nejsou orgánově ani hostitelsky příliš specifické a díky malé velikosti a chybějícím metodám se jejich obrovská taxonomická diverzita a ekologický potenciál ukázal až s nástupem masivně paralelního sekvenování (Rosenblueth et al., 2006). Jakýkoli orgán hostitele může být kolonizován širokou škálou bakteriálních endofytů, z nichž mnohé představují běžné půdní či enviromentální rody, jako jsou *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, a *Azospirillum* (Lodewyckx et al., 2002).

Existuje mnoho faktorů, které určují strukturu a diverzitu bakteriálních společenstev v endosféře. Patří mezi ně genotyp hostitele, mikrobiální banka přítomná v semenech, fyzikální a chemické vlastnosti půdy i klimatické změny (Vorholt, 2012). Studie Copelanda a kol. (2015) monitorující populaci foliárních endofytů v průběhu vegetačního období odhalila, že diverzita mikroorganismů je nejvíce ovlivněna rhizosférickými mikroby na začátku sezóny a časem se mění na méně rozmanitou bakteriální populaci, specifitější pro listy. Analýzy

foliárního mikrobiomu odhalily širokou škálu bakterií (Bhore et al., 2010) spadající nejméně do 42 bakteriálních rodů, např. ze skupin *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli* či *Sphingobacteria* (Costa et al., 2012). Vzhledem významu jednoděložných rostlin v zemědělství je častý výzkum s cílem popsat bakteriální endofytická společenstva a jejich potenciál příznivě ovlivnit zdraví a výnos plodin. Bertani a kol. (2016) popsali 19 bakteriálních rodů, z nichž dva, *Micrococcus* and *Enterococcus spp.*, se vyskytovaly pouze ve foliárních částech rýže a pravděpodobně se řadí k takzvaným růst podporujícím bakteriím (*Oryza sativa*) (Bertani et al., 2016).

Bakterie podporující růst rostlin (PGPB) disponují podobnými mechanismy podpory růstu jako rhizosférické PGPB, protože ale kolonizují vnitřní rostlinná pletiva, působí na růst hostitele rychleji a efektivněji. Endofytické PGPB spadají do mnoha kmenů včetně *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* (Hardoim et al., 2015). Uplatňují se např. v procesu zvyšování rezistence vůči biotickým a abiotickým stresovým faktorům prostřednictvím sekrece antimikrobiálních látek, produkcí fytohormonů, či modulací obranných reakcí rostlin (Ali et al., 2012). Některé foliární endofyty, kupříkladu *Methylobacterium*, disponují geny nezbytnými pro biologickou fixaci dusíku (BNF), umožňující jim konverzi atmosférického dusíku (N_2) na formy rostlinou využitelné: amoniak a dusičnany (Madhaiyan et al., 2015).

3.1.1.6 Příspěvek endofytických mikroorganismů ke zvýšení fitness hostitele – specifické příklady

3.1.1.6.1 Indukovaná rezistence a produkce sekundárních metabolitů

Jedním z mechanismů biologické obrany proti patogenům je produkce sekundárních metabolitů endofyty, jejichž přítomnost pozitivně ovlivňuje odolnost rostlin vůči fytopatogenům: proces nazývaný indukovaná systémová rezistence (ISR). Též samotné rostliny indukují obdobnou rezistenci vůči patogenům, tzv. systémově získanou rezistenci (SAR) (Zamioudis, & Pieterse, 2012). První zmínka o bakteriálních endofytech, jakožto induktorech ISR, se datuje do roku 1991 (Wei et al., 1991). Konkrétně se jednalo o bakteriální kmen G8-4 (*Pseudomonas fluorescens*), později přejmenován na 89B-61, jež bezprostředně po inokulaci do okurkových semen indukoval ISR proti antraknóze. Nejen bakteriální endofyty jsou schopny indukce ISR. V témže roce byla publikována práce o houbových endofytech kolonizujících endosféru Douglasky, které byly schopné indukovat ISR v hostiteli (Carroll, 1991).

Foliární endofyty jsou známé jako regulátoři fyziologických odpovědí svých hostitelů na napadení herbivory. Většina studií se věnovala zejména neotropickým defoliátorům, mravencům *Atta colombica*, jež poškozují převážně listy rostlin. Například ve studii Van Baela a kol. (2012) testovali, zda přítomnost houbových endofytů ve foliárních částech rostlin ovlivnila dobu potřebnou k nakousání a zpracování listů. Vyšlo najevo, že mravenci potřebovali o 30-43 % delší dobu na řezání, nošení, čištění materiálu. Studie Estrady a kol. (2012) se věnovala vlivu alterace rostlinné chemie fungálními endofyty na poškození listů mravenci *Atta colombica*. Porovnávali chemické a fyzikální vlastnosti okurkových listů s vysokou a nízkou hustotou jednoho běžného endofytického druhu, *Colletotrichum tropicale*. Studie odhalila, že endofyty změnilu chemii listů a naznačuje, že uvolňované sloučeniny s relativně nízkou těkavostí hrají hlavní roli při výběru listů mravenci. Zejménahoubové endofyty jsou známy svou schopností produkovat sloučeniny, potlačující růst rostlinných patogenů a herbivorů. Tyto látky zahrnují alkaloidy, steroidy, terpenoidy, peptidy, polyketony, flavonoidy a též fenoly (Higginbotham et al., 2013). K houbovým alkaloidům patří např. loliny produkované foliárními endofyty trav z rodu *Epichloë* nebo *Neotyphodium*. Studie Wilkinsona a kol. (2000), testující aktivitu lolinů proti mšicím živícím se těmito trávami, následně potvrdila jejich vliv na snížení pravděpodobnosti napadení hostitelské rostliny herbivorem.

Aktivita houbových alkaloidů se neuplatňuje jen proti hmyzím herbivorům. Kupříkladu neurotoxické indol-diterpenoidní alkaloidy, tzv. lolitremy, produkované foliárními endofyty trav třídy *Clavicipitaceae*, jsou zodpovědné za intoxikaci skotu (Fletcher, & Harvey, 1981). Alkaloid swainsonin je produkován fungálními endofyty rodu *Alternaria* kolonizující toxické leguminózní rostliny rodu *Astragalus* a *Oxytropis*. Tato sloučenina způsobuje toxikózu pasoucích se zvířat, tzv. lokoismus (Nzabanita et al., 2018). Gamma-proteobakterie rodu *Enterobacter* vyizolovaný z kmene topolu (*Populus trichocarpaxdeltoides*) produkuje antibiotické látky, včetně 2-fenylethanolu a 5-hydroxybenzoátu (Taghavi et al., 2010).

Jedny z nejslibnějších endofytických mikroorganismů, co se týká produkce antimikrobiálních sloučenin jsou aktinomycety, konkrétně streptomycety. Mezi dosud objevené sloučeniny patří např. munumbiciny, kakadumyciny, či koronamyciny (Hardoim et al., 2015). Jedna z prvních endofytických streptomycet produkujících antibiotika byla izolována z léčivé rostliny *Kennedia nigricans*, jež je používána domorodými Australany k léčbě krvácejících ran. Tato rostlina konstantně poskytuje nažloutle oranžovou kulturu *Streptomyces* sp. (NRRL 30562), u které byla následně prokázána produkce jedinečné rodiny peptidových antibiotik, tzv. munumbicinů (U. F. Castillo et al., 2002). Zvláště zajímavé jsou

munumbiciny C a D, protože vyjma účinku proti gram-pozitivním bakteriím včetně *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus*, působí také proti původci malárie, *Plasmodium falciparum* (Christina et al., 2013). Mimo jiné, munumbicin D vykazuje silnější účinky než chlorochin, zlatý standard v rámci antimalarik (Obianime, & Aprioku, 2009). Účinek proti *Plasmodium falciparum* vykazují i další nově objevená antibiotika, jako kakadumyciny či roronamyciny. Studie Castilla a kol. (2003) objevila produkci kakadumycinů u endofytických streptomycet (NRRL 30566) kolonizujících kapradiny, konkrétně druh *Gravillea pteridifolia*. Tato antibiotika účinkují též proti gram – pozitivním bakteriím. Naopak účinek proti plísním, konkrétně třídy Pythiaceae, vykazují koronamyciny. Studie Ezra a kol. (2004) je získala z endofytické *Streptomyces* sp., jež kolonizovala *Monstera* sp v amazonské části Peru.

3.1.1.6.2 Zvýšení rezistence vůči abiotickým faktorům

Jako všechny organismy jsou i rostliny vystaveny velmi proměnlivým chemickým a fyzikálním faktorům prostředí, včetně výkyvů teplot, změnám v dostupnosti vody, vysoké salinitě, zvýšeným koncentracím těžkých kovů, UV záření a mnoha dalším. Tyto podmínky prostředí, souhrnně nazývané abiotické stresové faktory, představují hrozbu poškození životních funkcí rostlin, jejich orgánů a v krajním případě vedou i k jejich odumření (Chaves, & Oliveira, 2004).

Zatímco většina výše popsaných endofytů hraje úlohu v ochraně hostitele před biotickými stresovými faktory, některé endofytické mikroorganismy jsou schopny působení rozšířit i na ochranu proti různým abiotickým stresorům. Molekulární mechanismy, jimiž endofytické mikroorganismy napomáhají zvýšení tolerance hostitelských rostlin vůči stresu zahrnují indukci exprese tzv. „stress-responsive“ genů, tvorbu ROS, či syntézu antistresových metabolitů (Lata et al., 2018).

3.1.1.6.2.1 Fytohormony

Rostlinné hormony, nebo-li fytohormony jsou organické nízkomolekulární sloučeniny, jež hrají klíčovou úlohu v toleranci vůči abiotickým faktorům u rostlin (Wani et al., 2016). Jakožto chemičtí poslové jsou v rostlinách schopni regulovat různé buněčné procesy a modulovat fyziologické a molekulární odpovědi, což je kritický požadavek pro přežití rostlin.

Působí v místě vzniku či v jiných částech rostliny, do kterých jsou transportovány. Fytohormony řadíme do pěti skupin. Patří mezi ně auxiny (IAA), gibereliny (GA), cytokininy (CK), kyselina salicylová (SA), jež působí na rostlinu stimulačně, a kyselina abscisová (ABA) a etylen (ET), působící inhibičně (Hopkins, 1999).

Každá rostlina prochází vysoce řízeným vývojovým procesem programované buněčné smrti, tzv. senescencí. Senescence je iniciována různými vnitřními (např. fytohormony, fyziologický stav) a vnějšími (teplota, dostupnost vody, patogenezé) faktory. Během tohoto procesu dochází ke změně barvy listů, běžně žloutnutí, vyvolané degradací chlorofylu, a to v důsledku snížení obsahu fytohormonů v rostlině (Ahmad, & Tahir, 2016). Avšak senescenci je možné oddálit exogenní aplikací fytohormonů či zvýšením jejich endogenní hladiny prostřednictvím endofytických mikroorganismů. Bakteriální endofyty jsou schopny prodloužit životnost květů rostlin. Ve studii Aliho a kol. (2012) hodnotili efekty dvou bakteriálních endofytů, spadající do rodu *Pseudomonas*, na vadnutí květů karafiátu. Oba endofyty exprimovaly vysoké hladiny ACC deaminázy a IAA. V důsledku nadprodukce ACC deaminázy se snížila koncentrace ACC v pletivech květů, což zabránilo produkci stresového hormonu ethylenu a vadnutí řezaných květů bylo tak možné oddálit o další dva až tři dny.

Celosvětový průmysl řezaných květů v současné době používá nákladné a potencionálně environmentálně nebezpečné chemické inhibitory etylenu, např. thiosíran stříbrný, za účelem prodloužení skladovatelnosti (flower shelf-life) řezaných květů (Reid, & Wu, 1992). Použití endofytů s aktivitou ACC deaminázy má potenciál nahradit chemikálie, které se v současné době používají v odvětví řezaných květů (Ali et al., 2012).

Mnoho rostlinných patogenů, rhizosférických symbiontů a endofytických bakterií produkuje fytohormony, jako jsou gibereliny, cytokiny, kyselinu jasmínovou, abscisovou, etylen či kyselinu indol-3-octovou (IAA), často s markantními účinky na růst, diferenciaci tkání a reprodukci jejich hostitele. Dosud však existuje málo studií zabývajících se produkcí fytohormonů foliárními endofyty.

3.1.1.6.2.1.1 Produkce fytohormonů endohyfálními bakteriemi

Nadzemní části rostlin jsou trvale kolonizovány vláknitými houbami, primárně *Pezizomycotina*, *Ascomycota* (Rodriguez et al., 2009), pocházející ze třídy III fungálních endofytů.

Nedávno publikované studie poukázaly na to, že hyfy listových endofytických hub jsou často kolonizovány velmi rozmanitými bakteriemi, jež nazvaly endohyfálními. Tyto bakterie se vyskytují v živých hyfách fylogeneticky rozmanitých endofytů izolovaných z různých rostlinných tkání. Studie také poskytla první důkaz produkce IAA foliárním endofytem (*Pezizomycotina*, *Pestalotiopsis* sp.), jenž byl izolován z jehličnaté hostitelské rostliny *Platycladus orientalis* (*Cupressaceae*). Dále prokázali, že produkce IAA in vitro je významně zvýšena, pokud endofyt hostí endohyfální bakterii (zde *Luteibacter* sp., *Xanthamonadales*). Nicméně axenicky kultivovaná bakterie na standardním růstovém médiu IAA neprodukuje. Následné testování filtrátu kultury z komplexu endofyt-endohyfální bakterie na modelovém rajčeti potvrdilo významné zvýšené produkce IAA. Tyto výsledky naznačují složitost interakcí mezi mikroorganismy, jež jsou součástí rostlinných mikrobiomů (Hoffman et al., 2013).

3.1.1.6.2.2 Zvýšená rezistence vůči těžkým kovům

Kontaminace těžkými kovy může nepříznivě ovlivnit ekosystémové funkce, včetně biogeochemických procesů zajišťovaných mikroorganismy. Hromadění těžkých kovů v půdě může u rostlin vést k narušení metabolismu, snížené produkci biomasy a u plodin k významnému snížení výnosnosti (Cioica et al., 2019).

Různé studie popisují úlohu endofytických mikrobů při snižování fytotoxicity kovů prostřednictvím extracelulární precipitace, intracelulární akumulace, sekvestrace nebo pomocí biotransformace toxických iontů na méně toxické či netoxické formy (Ma et al., 2016).

Například studie zabývající se bioremediací a její účinností na odstraňování niklu z půdy prostřednictvím endofytických hub. Expozice nadměrnému množství niklu je pro rostliny toxická a vyvolává letální změny v metabolismu rostlin, což má za následek inhibici růstu, vadnutí, nekrózu a chlorózu (Amari et al., 2014). Po inokulaci čtyřmi různými endofytickými houbami byly experimentální rostliny sóji schopny snášet až 1 mM niklu v kontaminovaném médiu. Inokulace endofyty významně zvýšila rostlinnou biomasu, růstové atributy a také zvýšila translokaci niklu z kořene do výhonku ve srovnání s kontrolními, nenaočkovanými rostlinami. Kromě toho změnil kmen *P. formosus* LHL10 metabolický aparát sóji prostřednictvím snížení lipidové peroxidace a akumulace kyseliny linolenové, glutationu, peroxidázy, polyfenolu oxidázy, katalázy a superoxidodismutázy (Bilal et al., 2017).

3.1.1.6.2.3 Role endofytů v indukci syntézy sekundárních metabolitů rostlin

Široká škála vnějších stresových faktorů, neboli elicitorů, stimuluje v rostlinných buňkách obranné reakce. Elicitory dávají podnět k expresi genů, syntéze enzymů a tímto způsobem navozují zvýšení syntézy a akumulaci fytoalexinů či jiných sekundárních metabolitů podílejících se na ochraně rostliny (Kašparová et al., 2012). Kromě vnějších stimulů můžou syntézu sekundárních metabolitů stimulovat i endofyty. Endofytický elicitor může rychle indukovat expresi specifických rostlinných genů, což může vést k aktivaci řady specifických sekundárních metabolických drah a následné akumulaci bioaktivních sloučenin (Gao et al., 2010). Takové bioaktivní látky zahrnují antibiotika, protinádorové, antioxidační, imunosupresivní, antimykotické, antibakteriální, insekticidní, a antivirové látky (Khare et al., 2018).

Jednou z nejvíce studovaných bioaktivních látek je taxol. Jedná se o přírodní diterpenoid izolovaný z tisů (*Taxus brevifolia*) a patří mezi jednu z nejpoužívanějších složek protirakovinných léků. Brzy po objevení jeho jedinečné funkce bylo zahájeno rozsáhlé hledání alternativních zdrojů, jež by nahradily tehdejší průmyslovou výrobu taxolu pomocí polosyntézy, která spotřebovává velké množství tisů (Yuan et al., 2006). V roce 1993 Stierle a jeho kolegové našli nový přístup k výrobě taxolu (Stierle et al., 1993). Objevili endofytickou houbu, *Taxomyces andreanae*, kolonizující v kůru *Taxus brevifolia*, jež schopný taxol syntetizovat. Genom tohoto endofyta nevykazoval významnou sekvenční homologii s genomem tisů co se genů zodpovědných za biosyntézu taxolu týká, což naznačuje, že si endofyty mohl vyvinout taxolovou biosyntetickou dráhu nezávisle na svých hostitelích (Heinig et al., 2013).

Howitz and Sinclair (2008) naznačují, že takovéto homologní genové klastry přítomné v endofytech i v jejich hostitelích mohou být za určitých podmínek křížově aktivovány.

Indukcí exprese hostitelských genů prostřednictvím endofytů se zabývala kupříkladu práce Li a kol. (2012). Zaměřili se na léčivou bylinu *Artemisia annua* L. (*Asteraceae*), která se v tradiční čínské medicíně používá k léčbě horečky a malárie již od starověku. Tato bylina syntetizuje artemisinin, avšak syntézu indukuje endofytická aktinobakterie *Pseudonocardia* YIM 63111. Určení hladin transkripce klíčových genů podílejících se biosyntéze artemisininu ukázaly, že exprese cytochromu P450 monooxygenázy (CYP71AV1) a cytochromu P450 oxidoreduktázy (CPR) byla po inokulaci kmenem YIM 63111 up-regulována. Up-regulace

těchto genů byla spojena se zvýšenou akumulací artemisininu. *Pseudonocardia* sp. YIM 63111 se zdá být slibným prostředkem ke zvýšení produkce artemisininu v rostlinách (J. Li et al., 2012).

Každý endofyt se vyznačuje specifickou charakteristikou, up/down regulací určitých genů odpovědných za růst rostliny, výnosnost či modulaci biosyntézy sekundárních metabolitů. Nicméně, stojí za úvahu, jaký by byl synergický účinek dvou rozdílných endofytů na modulaci biosyntézy sekundárních metabolitů.

Studie Pandey a kol. (2016) hodnotila synergický účinek 2 různých endofytů (*Acinetobacter* sp. a *Marmoricola* sp.) hostitele *Papaver somniferum* L. na up-regulaci klíčových genů pro biosyntézu morfinu. *Papaver somniferum* je léčivá rostlina a též jediný zdrojem terapeuticky důležitých benzylochinolinových alkaloidů (BIA), jako jsou morfin, kodein, thebain, papaverin, noscapin a sanguinarin. Morfin patří do skupiny opioidů, jež jsou klíčovými léky ke zmírnění středně těžké akutní bolesti spojené s rakovinou, fyzickým traumatem, pooperačním stavem atd. (Hagel, & Facchini, 2013). Použití konsorcia 2 endofytů (*Acinetobacter* sp. a *Marmoricola* sp.) up-reguluje většinu genů biosyntézy morfinu. Konkrétně se zvýšil obsah morfinu a thebainu. Po inokulaci konsorciem se rovněž zvýšila fotosyntetická účinnost máku, čímž se zvýšila biomasa, hmotnost tobolek, výnosnost semen (Pandey et al., 2016).

3.1.1.6.2.4 Biologická fixace dusíku

Dusík je jedna z esenciálních komponent všech proteinů, enzymů, nukleových kyselin a také chlorofylu, zprostředkující fotosyntézu v rostlinách (Leghari et al., 2016). Jedná se o velmi běžný element v přírodě, nacházející se v zanedbatelném množství v litosféře, hydrosféře a ve vysokém množství v atmosféře (Greenwood, & Earnshaw, 1997). Nicméně většina tohoto dusíku je ve formě dinitrogenového plynu (N_2) a rostliny tuto inertní formu nejsou schopny vstřebat. Proces, v němž je dinitrogen redukován na formy pro rostlinu již vstřebatelné, nitrát a kation amonný, se nazývá fixace dusíku (Bottomley, & Myrold, 2007).

Prokaryotní mikroorganismy, tj. diazotrofové, jsou schopné přerušit trojnou vazbu molekulového dusíku za použití vysoce specializovaného enzymového komplexu, nitrogenázy, a následně ho konvertují do amonného kationtu (Bottomley et al., 2007).

3.1.1.6.2.4.1 Mikroorganismy fixující molekulový dusík

Schopnost fixovat dusík, jinými slovy přítomnost nitrogenázového enzymu, je omezena pouze na určité bakterie a archaea (Galloway et al., 2008). Diazotrofové jsou v prostředí široce rozšíření. Vyskytují se jednak samostatně v půdním a vodním ekosystému, v rhizosféře, fylosféře či uvnitř rostlinné tkáně, a jednak v symbiotické asociaci s leguminózními či aktinorhizními rostlinami, a také s lišejníky (Young, 1992).

Nejlépe prostudovaný mutualistický vztah mezi N-fixujícími bakteriemi a rostlinami zahrnuje leguminózní rostliny a rhizobakterie, konkrétně *Rhizobiaceae* (Galloway et al., 2008).

Přítomnost diazotrofů v nelugiminózních rostlinách byla poprvé detekována Brazílskými vědci v rhizosféře, rhizoplánu, foliárních částech cukrové třtiny (*Saccharum officinarum*) (Döbereiner, & Alvahydo, 1959). Zpočátku se předpokládalo, že nitrogenázová aktivita se uplatňuje jen v rhizosféře, avšak poté zahrnuli i foliární části rostliny, v nichž jsou bakterie schopny mnohonásobně vyšší fixace dusíku, a to i při vysokých koncentracích sacharózy a nízkých hladinách pH (Boddey et al., 1991).

Mezi druhy foliárních endofytických bakterií, které prokazatelně fixují atmosférický dusík, patří např. *Gluconacetobacter diazotrophicus* ve výše uvedené symbióze s cukrovou třtinou (Dong et al., 1994) nebo jako součást mikrobiomu jehličí (Carrell, & Frank, 2014). Dalším příkladem je *Paenibacillus* (kmen P22), jež byl nalezen v topolech (Scherling et al., 2009). Ou Liho a kol. (2017) detekovali s pomocí pyrosekvenování diverzitu diazotrofních endofytů v rozličných pletivech orchideje *Dendrobium catenatum*. V nadzemních částech dominoval kmen *Proteobacteria*, konkrétně druhy *Methylobacterium* a *Pantoea* (O. Li et al., 2017).

3.1.2 Rostliny s parazitickou životní strategií - experimentální skupina využitá v této práci

Ne zdaleka pro všechny rostliny platí obecná definice, jakožto autotrofních organismů získávajících esenciální látky pro stavbu a růst svého těla z okolního prostředí přímo v anorganické formě bez pomoci jiných organismů. Mnohé z nich „zneužívají“ svého souseda vyvinutím speciálních penetračních výběžků, tzv. haustorií, jimiž se napojí na cévní svazky hostitele, či parazitují na mykorrhizních houbách, popřípadě jejich pomocí na jiných zelených rostlinách (Štech et al., 2010).

Dle typu připojení k hostiteli lze parazitické rostliny rozlišit na kořenové a stonkové. Dále lze parazitické rostliny rozdělit dle (ne)přítomnosti chlorofylu a schopnosti vlastní fotosyntézy. Holoparazité, zaujímající jen pětinu parazitických druhů, jsou nezelené rostliny naprosto závislé na svých hostitelích. Postrádají vlastní chlorofyl a z toho důvodu nejsou schopni fotosyntetizovat. Naopak hemiparazité (poloparazité, přibližně 80 % parazitických druhů) si uchovaly funkční fotosyntetický aparát, s jehož pomocí získávají organické živiny, a současně získávají minerální živiny a některé organické molekuly krádeží z xylémové mízy hostitelů. Kupříkladu některé u nás nerostoucí druhy rodu kokotice (*Cuscuta*) disponují malým množstvím funkčních chloroplastů a část uhlíku získávají autotrofně, avšak většinu asimilátů získávají krádeží z xylému hostitele (Štech et al., 2010).

Haustoria, jimiž se parazitické rostliny napojují na cévní svazky hostitele a následně z nich odčerpávají živiny, nahrazují parazitům kořenový systém. Jednotlivá haustoria zaujímají podobu ztloustlých kořenů, stonků popřípadě stonkových přísavek. Vnitřek haustorií tvoří vodivá pletiva, jejichž tenká vlákna směřují k cévním svazkům hostitele. Následně se vyvine xylémový můstek, který umožní přenos živin z hostitele do parazita (Těšitel, 2011).

Na základě vývoje lze haustoria rozdělit na primární a sekundární. Primární haustoria jsou tvořena parazitickou rostlinou ihned při jejím klíčení a typicky se jimi vyznačují holoparazité, ale i obligátní hemiparazité, např. jmelí bílé (*Viscum album*). V pozdějším stádiu vývoje vznikají haustoria sekundární, již na existujícím kořenovém systému parazitické rostliny. Vyznačují se jimi především hemiparazitičtí zástupci z čeledi zárazovitých (*Orobanchaceae*), např. rod černýš (*Melampyrum*), kokrhel (*Rhinanthus*), světlík (*Euphrasia*) (Těšitel, 2011).

Na rozdíl od holoparazitických rostlin, jejichž haustoria musí být napojena na floém hostitele, haustoria hemiparazitů jsou napojena na xylém hostitele (Těšitel, 2011). Tyto cévní svazky transportují po rostlině vodu a v ní rozpuštěné minerální látky (dusík, draslík, fosfor aj.; Klimešová, 2008). Přestože asimiláty ve formě sacharidů proudí typicky floémem hostitele, i xylém může obsahovat velké množství organických kyselin a aminokyselin. Tímto způsobem mohou hemiparazitické rostliny získávat i uhlík v organické formě (Těšitel, 2011).

Proces získávání zdrojů kořenovými hemiparazity, jakož i efektivita bastrakce či anatomie haustorií, se mezi jednotlivými druhy liší, a souvisí zejména se závislostí na jejich hostiteli a jejich životní historii. Jednoleté hemiparazity, jako jsou *Striga* spp. či *Rhinanthus* spp., jsou schopny vysoce efektivní abstrakce solutů z xylému hostitele, čemuž zajisté

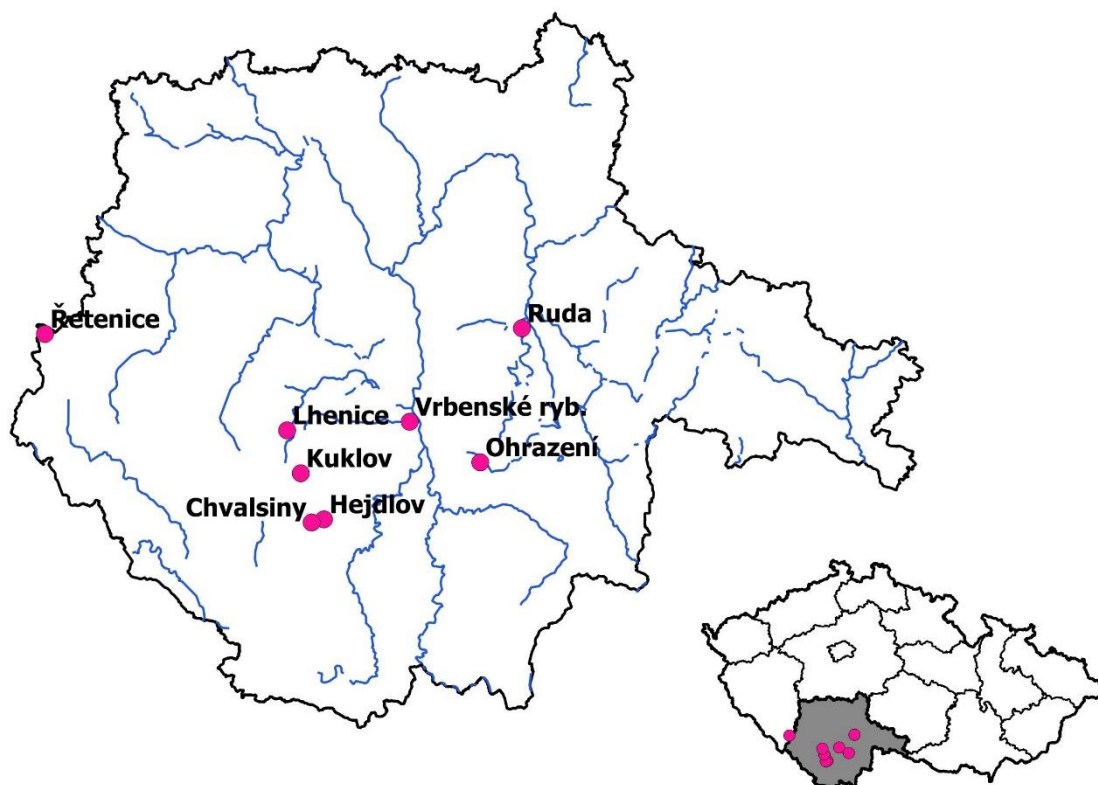
napomáhá i luminální kontinuita cév mezi hostitelem a parazitem (Cameron et al., 2006; Dörr, 1997). Proces pasivního transportu solutů je poháněný gradientem vodního potenciálu, přičemž hemiparazit udržuje gradient na nižších úrovních než jeho potenciální hostitel, a to z důvodu zvýšené rychlosti transpirace, abnormálního chování stomat, které se nezavírají ani za tmy či při nedostatku vody (Press, 1989), i hromadění osmoticky aktivních sloučenin, např. cukerných alkoholů, zejména mannitolu (Irving, & Cameron, 2009). Naproti tomu u trvalých rostlin, jako *Bartsia alpina* či *Oxalys Phyllanthi*, probíhá přenos solutů přes buněčné stěny nebo konjunktivní parenchym (Hibberd, & Jeschke, 2001; Tennakoon et al., 1997). Přesný mechanismus transportu není znám, avšak je zjevné, že zmíněný transport nevyžaduje rozdíl ve vodním potenciálu, a proto se předpokládá, že je založen na aktivním transmembránovém transportu (Tennakoon et al., 1997). Jak hemiparazit, tak i jeho hostitel na sebe vyvíjejí selekční tlak, jímž se snaží získat na svou stranu výhodu a druhou stranu tak omezit (Dawkins, & Krebs, 1979). Kupříkladu hemiparazité, jež bojují o dostatek slunečního záření se svým hostitelem, upřednostňují oblasti s omezenými zdroji živin a vody, čímž je hostitel nucen vybudovat rozsáhlý kořenový systém a je tak omezen v tvorbě nadzemních částí. Tímto se významně zabráni zastínění hemiparazita. Nicméně tento závod ve zbrojení není zahrán do krajního extrému, neboť hemiparazité by ne přežili uvadnutí hostitele (Klimešová, 2008).

Vztah mezi parazitem a hostitelem je pozoruhodný zejména velmi úzkou vazbou. Paraziti, jako je tomu např. u našeho ochmetu (*Loranthus europaeus*), mnohdy napadají pouze druhy určité čeledi, někdy jen jediný rod či druh. Výjimku tvoří např. hemiparazit našich stromů – jmelí bílé (*Viscum album*), které je schopné parazitovat na zástupcích několika čeledí (Korčáková, & Starčevská, 2011).

4 METODIKA

4.1 Charakteristika lokalit

Materiál byl sbírán během tří týdnů na přelomu května a června roku 2018. Seznam lokalit (Obr. 1) a rostlinných druhů zahrnutých v práci je uveden v Tabulce 1.



Obr. 1 Poloha lokalit hemiparazitických druhů a jejich potenciálních hostitelů využitých ke sběru vzorků

Soupis lokalit

Hejdlův

CHKO Blanský les, zhruba 2,5 km západně od Kletí; 740 m. n. m.; sběr *Rhinanthus mayor*, *Plantago lanceolate*, *Veronica arvensis*, *Ranunculus acris* na louce; N 48.8631175, E 14.2471058

Chvalšiny

Osada Chvalšiny na okraji CHKO Blanský les a Šumavského podhůří; sběr *Rhinanthus mayor*, *Plantago lanceolate*, *Veronica arvensis*, *Ranunculus acris* na louce; 673 m. n. m.; N 48.8582331, E 14.2192536

Kuklov

Osada v okrese Český Krumlov asi 3 km severně od obce Brloh; v CHKO Blanský les; sběr *Hieracium murorum*, *Vaccinium myrtillus*, *Melampyrum pretense* na rozhraní lesa a louky; 720 m. n. m.; N 48.9315667, E 14.2471058

Lhenice

Šumavské podhůří, okres Prachatice; 559 m. n. m.; sběr *Cuscuta europaea*, *Rubus fruticosus* agg.; okraj silnice; N 48.9954100, E 14.1614881

Ohrazení

Okres České Budějovice, zhruba 3 km od Ledenic; sběr *Vaccinium myrtillus*, *Betonica officinalis*, *Melampyrum pretense*, *Pedicularis sylvatica*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus acris* na louce a sousedícím lese; 510 m. n. m.; N 48°57', E 14°36'

Ruda

Hranice rezervace Ruda okrese České Budějovice; na okraji Třeboňské a Českobudějovické pánve; sběr *Pedicularis sylvatica*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus acris* na louce u okraje lesa; 450 m. n. m.; N 49.1505328, E 14.6930564

Řetenice

Okres Prachatice; 873 m. n. m.; sběr *Melampyrum pretense*, *Rhinanthus mayor*, *Veronica arvensis*, *Ranunculus acris* na louce lemované stormy; N 49.133990, E 13.608334

Vrbenské rybníky

Přírodní rezervace vodních, mokřadních a lučních ekosystémů na severozápadním okraji Českých Budějovic; 380 m. n. m.; sběr *Cuscuta europaea*, *Holcus lanatus*, *Ranunculus acris* na vlhké louce; N 49.0099464, E 14.4393778

4.2 Sběr materiálu

Z každé z uvedených lokalit byl odebrán listový materiál (dle druhu 2-6 listů) ze šesti různých jedinců daného druhu rostliny. Protože je v terénu prakticky nemožné určit přesně které druhy (jedinci) jsou parazitickou rostlinou napadeny, v případě neparazitických rostlin byli sbíráni potencionální hostitelé rostoucí v těsné blízkosti parazita. Výjimku tvořil holoparazitický druh *Cuscuta* – v tomto případě byl díky povaze interakce hostitel zjevný. Sběr vzorků se vždy vztahoval pouze na zdravé, asymptomatické listy (hodnoceno vizuálně), abychom se vyhnuli zahrnutí rostlinných patogenů do analýzy – jejich proliferace může totiž významně ovlivnit složení listového mikrobiomu. Sesbírané vzorky byly vloženy do papírových pytlíků do chladu a zpracovány v laboratoři během 24 hodin.

4.2.1 Parazitické rostliny zahrnuté do vzorkování

Cuscutaceae

Cuscuta europaea L.

Jednoletá, nezelená, holoparazitická bylina s tenkou ovíjívou lodyhou až 150 cm dlouhou, četně větvenou, lysou, žlutavou až načervenalou, s přísavkami pro přichycení k lodyhám hostitelských rostlin (Mikulka et al., 1999). Napadá kopřivy, konopí, chmel, brambory či bob. Od srpna do října kvete v příkopech, podél cest a vodních ploch, v pobřežních křovinách, ve vlhkých lemech lesů i na rumišťích. Roztroušený výskyt v ČR, mnohdy v teplejších oblastech, v nižších horských polohách výskyt ojedinělý.

Orobanchaceae

Čeleď *Orobanchaceae* se řadí do řádu Lamiales, kam spadají jak nezelení, tak zelení hemiparazité, jež se přiživují na kořenech hostitelských rostlin. V České republice zastupuje tuto čeleď několik rodů, například *Rhinanthus*, *Euphrasia*, *Odontites*, *Melampyrum*, *Pedicularis*.

Pedicularis sylvatica L.

Bylina s hlavní lodyhou do 20 cm vysokou, květoucí od května do června. Hemikryptofyt,

přezimující ve formě růžice listů složené v „zimní pupen“ (HEGI, 1975). Monokarpická rostlina se striktně dvouletým životním cyklem. Konkurenčně slabý druh s vyššími nároky na světlo (Dostál, 1989). Výskyt nejčastěji na vlhkých, mnohdy zrašeliněných loukách a vřesovištích, od nížin po horské polohy. Upřednostňuje kyselé, živinami chudé půdy (Chytrý et al., 2010). Hemiparazit s velkým počtem hostitelských druhů (Weber, 1976), potencionální parazitace i na jedincích svého vlastního druhu (Maybrook, 1917).

Melampyrum pratense L.

Striktně jednoletá zelená bylina až 50 cm vysoká s přímou lodyhou, bohatě větvenou. Kvete od června do září. Výskyt na suchých i zamokřených stanovištích, pasekách, okrajích lesních cest a luk v nižších i horských polohách. Preference kyselých stanovišť. (Smith, 1963). Hemiparazit parazitující širokou škálu dřevin a keřů, vyskytujících se na stanovišti například s rody *Quercus*, *Betula*, *Corylus*, *Pinus*, *Vaccinium* (Smith, 1963).

Rhinanthus mayor L.

Jednoletá bylina až 80 cm vysoká, s přímou, nafialovělou, lysou, výjimečně chlupatou lodyhou. Růst na pastvinách, loukách, příkopech na okrajích cest. Výskyt v České republice relativně hojný. Kvete od konce dubna do října. Hostitelsky neselektivní hemiparazit, vytvářející protohaustoria na široké škále hostitelů (Jiang et al., 2010). Potravní generalista napadající nejčastěji zástupce z čeledi *Fabaceae* a *Poaceae*.

Tab. 1 Seznam rostlinných druhů zahrnutých ve vzorkování s jejich geografickou polohou a životní strategií.

Čeleď	Rostlinný druh	Lokalita							Lifestyle	
		Řetenice	Kuklov	Ohrazení	Vrbenské Rybníky	Ruda	Lhenice	Hejdlov		Chvalšiny
Asceraceae	<i>Hieracium murorum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	Potenciální Hostitel
Cuscutaceae	<i>Cuscuta europaea</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	Holoparazit
Ericaceae	<i>Vaccinium myrtillus</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	Potenciální hostitel
Lamiaceae	<i>Betonica officinalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	Potenciální hostitel
Orobanchaceae	<i>Melampyrum pretense</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	Hemiparazit
	<i>Pedicularis sylvatica</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	Hemiparazit
	<i>Rhinanthus mayor</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	Hemiparazit
Poaceae	<i>Holcus lanatus</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	Potenciální hostitel
Plantaginaceae	<i>Plantago lanceolata</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	Potenciální hostitel
	<i>Veronica arvensis</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	Potenciální hostitel
Ranunculaceae	<i>Ranunculus acris</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	Potenciální hostitel
Rosaceae	<i>Rubus fruticosus agg.</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	Potenciální hostitel

4.2.2 Potencialní hostitelské rostliny zahrnuté do vzorkování

V terénu je prakticky nemožné určit přesně které druhy jsou parazitickou rostlinou napadeny, v případě neparazitických rostlin byli sbíráni potencionální hostitelé rostoucí v těsné blízkosti parazita (viz Tab. 1). Jedná se o druhy *Betonica officinalis* (Lamiaceae), *Hieracium murorum* (Asceraceae), *Holcus lanatus* (Poaceae), *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae), *Ranunculus acris* (Ranunculaceae), *Rubus fruticosus* (Rosaceae), *Vaccinium myrtillus* (Ericaceae), *Veronica arvensis* (Plantaginaceae).

4.3 Zpracování materiálu a povrchová sterilizace listů

Po sběru materiálu bylo nutné listy povrchově sterilizovat, aby se předešlo zahrnutí neendofytických mikroorganismů do následné analýzy. Na povrchovou sterilizaci listů byla použita metoda zmíněná ve studii Koga a kol. (1993) s drobnými úpravami. Po odebrání vzorků byly foliární části rostlin důkladně omyty pod tekoucí vodovodní a následně destilovanou vodou, za účelem odstranění přilnutých prachových částic a epifytických mikrobů včetně houbových spor. Takto očištěné vzorky byly ponořeny do Petriho misek s rotoky v následujícím pořadí: absolutní etanol (10 sec), 5% chlornan sodný (2 minuty), 70% etanol (2 minuty). Posléze byly vzorky třikrát omyty autoklávovanou destilovanou vodou a ponechány na ubrousku oschnout.

Povrchově sterilizovaný vzorek byl přemístěn do sterilní třecí misky, která byla předem vychlazená tekutým dusíkem. Následně byl rostlinný materiál rozmělněn v tekutém dusíku tloučkem. Homogenizované pletivo bylo převedeno do 1,5 ml mikrozkušavky a vzorek zamražen v -20°C pro další zpracování.

4.4 Izolace DNA a stanovení celkové koncentrace

Pro izolaci DNA bylo z každého vzorku odebráno 100 mg homogenizovaného vzorku. Celková DNA včetně genomové DNA přítomných endofytů byla extrahována s použitím kitu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), za použití originálních roztoků. Tento kit je určen pro izolaci a purifikaci DNA různorodých rostlinných druhů a to nejen z čerstvého či mraženého materiálu ale i ze sušeného. Izolace byla provedena dle protokolu od výrobce.

Měření koncentrace a čistoty vyizolované DNA bylo uskutečněno na fluorometru řady Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc.).

4.5 PCR

4.5.1 PNA blokátory

Mikroorganismy jsou nepostradatelnou součástí všech ekosystémových procesů v terestrických i vodních ekosystémech (Locey, & Lennon, 2016). Rozkvět metod molekulární biologie a obzvláště vývoj technologií masivního paralelního sekvenování v poslední dekádě umožnil studium mikrobiální diverzity v rozmanitých prostředích do nebyvalé hloubky. Efektivní metody sekvenování nové generace v současné době umožňuje popsat rozdíly ve složení mikrobiálních populací mezi různými hostiteli, což vede k většímu porozumění jejich úlohy v ekologii a vývoji hostitelských organismů (Fitzpatrick et al., 2018).

Mikrobi asociující s hostitelem jsou často charakterizovány pomocí sekvenování amplikonů, jež jsou získány amplifikací hypervariabilních oblastí genů pro ribozomální podjednotky, u bakterií 16S nebo u hub interní transkribované spacery (ITS) (Goodrich et al., 2014). Nicméně amplifikace těchto specifických oblastí může snížit efektivitu sekvenování v důsledku kontaminace hostitelskou DNA. Tato kontaminace je způsobená sekvenční podobností společného předka sdíleného mezi eukaryotickými organelami a bakteriemi (Sagan, 1967).

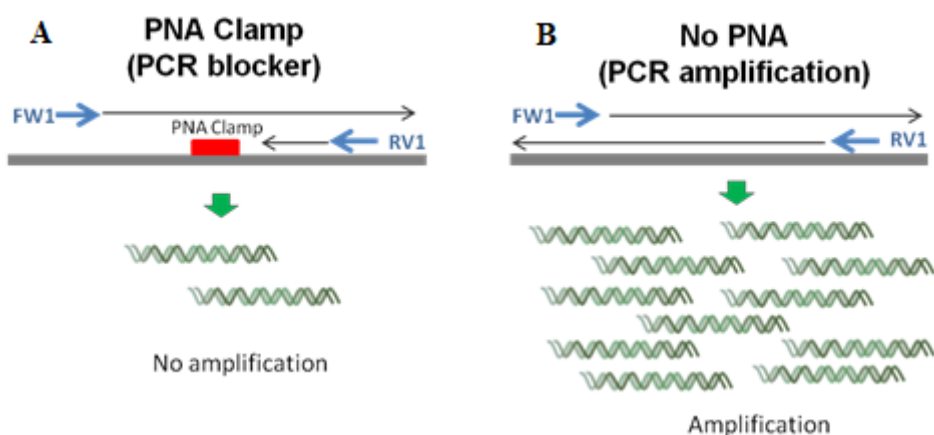
Rostlinné chloroplasty a mitochondrie jsou evolučně odvozeny z volně žijících sinic a bakterií ze skupiny Rickettsiales (Margulis, 1981). Sekvenování rostlinného mikrobiomu tedy představuje výzvu, v důsledku přítomnosti velkého množství organel, jež si uchovávají vysoký stupeň podobnosti se svými volně žijícími předky. Kupříkladu, sekvenování oblasti V4 genu 16S rRNA z rostlinné tkáně, plastidové a mitochondriální sekvence pocházející z hostitelského genomu představují až 95% všech readů z daného vzorku (Lundberg et al., 2013). Takto vysoká kontaminace významně omezuje počet vzorků, které lze sekvenovat najednou s dostatečnou hloubkou čtení pro zachycení přítomné bakteriální diverzity.

V této práci jsem využila následující způsob jak se vypořádat s problémem kontaminace hostitelskou DNA: použití oligonukleotidů peptidové nukleové kyseliny (PNA) během PCR výrazně sníží amplifikaci hostitelské organelové DNA (Lundberg et al., 2013). PNA oligonukleotidy jsou uměle syntetizované polymery pyrimidinových a purinových bází spojené peptidovou vazbou (Nielsen, 1999), které se komplementárně vážou methylenkarbonylovými vazbami k vláknům nukleových kyselin. PNA neobsahuje žádné nabitě fosfátové skupiny, tudíž je její kostra neutrální. Neutralita kostry má za následek silnější vazbu vláken v duplexu

DNA/PNA a také specificitu vazby DNA/PNA. Dále je PNA rezistentní vůči DNázám a protézám, čímž se prodlužuje její životnost *in vivo* i *in vitro* a současně však není rozpoznána polymerázami a nemůže být použit jako primer (Ørum et al., 1993).

Vzhledem k jejich neidentifikovatelnosti DNA polymerázou, dále sekvenční specificitě a vazebné afinitě k cílové DNA, mohou PNA próby sloužit jako PCR blokátory. Tato metoda se nazývá „PNA clamping“ či PCR blokování, a představuje efektivní způsob prevence zkreslení a chyb v následujícím procesu (viz obr. 2) (Lundberg et al., 2013).

Obr. 2 A: Zablokování amplifikace specifického úseku DNA pomocí PCR blokátorů; B: PCR bez použití PNA



Mezi populární PNA blokátory patří mPNA a pPNA, jež slouží k zabránění amplifikace hostitelské mitochondriální a plastidové 16S rDNA. Sekvence pPNA, tak i mPNA jsou komplementární k úsekům organelární DNA vysoce konzervovaným mezi vyššími rostlinami a osvědčily se v projektech zabývajících se rostlinným mikrobiomem (Lundberg et al., 2013).

Kupříkladu ve studii Fitzpatricka a kol. (2018) testovali účinnost univerzálních PNA svorek navržených Lundbergem a kol. (Lundberg et al., 2013) pro projekt studující kořenový mikrobiom. Zkoumali, jak se míra plastidové kontaminace liší mezi hostitelskými druhy rostlin a zda jsou spojeny s chybným párováním bází mezi univerzálními pPNA a cílovými organelárními sekvencemi. Dále vyhodnotili, zda lze plastidovou kontaminaci snížit pomocí jednoduché modifikace, a zda taková modifikace vede ke změně odhadů diverzity mezi bakteriálními komunitami. Jejich studie je první, která testuje účinnost použití PNA blokátorů

napříč hostitelskou diverzitou a hodnotí užitečnost vývoje vlastních sekvencí PNA pro studium mikroorganismů navázaných na různé hostitelskými druhy. PNA blokátory vyhodnotili jako cenné nástroje ve studiích, jež extrahují a následně sekvenují mikrobiální DNA přímo v hostitelské tkáni (Fitzpatrick et al., 2018).

4.5.2 Amplifikace 16S rRNA

Z vyizolované rostlinné DNA byl metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) naamplifikován úsek DNA odpovídající části genu pro 16S rRNA, obsahující oblasti, které jsou specifické pro každý bakteriální taxon.

Pro PCR reakci byly použity univerzální primery 515F-806R (viz tab. 2). Složení PCR reakcí s přidáním PNA blokátorů je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 2 Sekvence použitých univerzálních primerů 515F-806R pro 16S oblast rDNA

Název primeru	Sekvence (5'→3')	Velikost (bp)
517F	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA	26
806R	—ATAATGTACGGGKGAGATGC—	20

Tabulka 3 PCR MasterMix

Komponenta	Finální koncentrace	μL na reakci
PCR mix	2x	7,5
F primer	0,2 μM	0,3
R primer	0,2 μM	0,3
PNA blokátor	0,5 μM	0,3
DNA templát		20 ng
Voda		up to 20 μL
Total		20

Z důvodu z cca 200 vzorků naamplifikován v duplikátech, které byly pro následnou sekvenaci spojeny do jednoho vzorku.

Do pozitivní kontroly byla k MasterMixu přidána genomová DNA *E.coli* a do negativní kontroly nebyla přidána žádná DNA. Poté byly vzorky amplifikovány za stanovených PCR podmínek (viz Tab. 4).

Tabulka 4 Přehled trvání a teploty jednotlivých PCR cyklů

Fáze		Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace		94 °C	3 min	
Amplifikace	Denaturace	94 °C	60 sek	30 (v závislosti na přístroji)
	PNA clamping	70 °C	10 sek	
	Připojení primerů	50 °C	60 sek	
	Extenze	72 °C	90 sek	
Finální extenze		72 °C	10 min	
Uchování		4 °C		

PCR produkty ze stejných duplikátů byly přepipetovány do jedné zkumavky a homogenizovány. Následně byla přítomnost a velikost amplikonů vizualizována pomocí gelové elektroforézy (1% agarózový gel v 1x TAE pufru při 90 V, 500 mA, 40 minut). Předpokládaná velikost produktu pro primerový pár 515F – 806R se pohybuje v rozmezí ~390 bp. Vzorky s nízkou biomasou mohou poskytovat slabé nebo žádné viditelné bandy. Pokud měl amplikon na gelu nízký výtěžek, PCR se provedla znovu s různým ředěním templátu, dokud jsme neobdrželi PCR produkt o požadované velikosti.

4.6 Příprava sekvenačních knihoven, sekvenování a bioinformatické zpracování sekvenačních dat

PCR produkty byly zaslány na pracoviště Research Resources Center Genomics Core, University of Illinois at Chicago. Zde proběhla příprava knihoven i vlastní pair-end sekvenování amplikonů na platformě Illumina miSeq. Hrubá sekvenační data byla bioinformaticky zpracována Dr. Bártou dle postupu publikovaného v Bárta et al., 2017, výstupem kteréhož byla přehledná tabulka se seznamem toxonomicky určených bakteriálních „druhů“, nebo-li, OTUs (viz níže), detekovaných v každém vzorku (Příloha 1, xls soubor). Tu jsem použila jako výchozí výsledek k vyhodnocení a grafickému zpracování.

U vyšších eukaryot je nejnižší základní kategorií hierarchické klasifikace druh. Ten lze definovat jako soubor populací s jedinečným vývojovým původem a historií, tvořený navzájem si podobnými jedinci, kteří se mezi sebou mohou plodně křížit a jsou reprodukčně izolováni od jiných podobných skupin (Bobay, & Ochman, 2017). U bakterií a archaeí, reprodukcí se binárním dělením a nevyžadujících sexuální kompatibilitu, je tato definice neuplatnitelná. Propojení tradiční klasifikace bakterií, založené na vzhledu buněk, pohyblivosti a fyziologii, s genomickými informacemi je problematické. Mikrobiální genom je navíc neustále vystaven fluidní invazi segmentů cizí DNA, především v důsledku horizontálního přenosu genů. Zavedením konceptu „Operační taxonomická jednotka“ (OTU) byla vyvinuta strategie pro klasifikaci těchto organismů do skupin na základě pozorovaných znaků, a vytvořena hierarchická klasifikace odrážející co možná nejvěrnější evoluční vztahy mezi organismy.

Tabulka distribuce OTU napříč vzorky byla použita pro analýzu NMDS a indexy diverzity (pomocí volně dostupného softwaru RStudio, RStudio Inc.). Vennovy diagramy byly zpracovány ve volně dostupných online programech InteractiVenn (Heberle et al., 2015) a Venny 2.0.1 (Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na základě bioinformatické analýzy jsem pomocí sekvenčních dat detekovala přítomnost více než 3000 různých OTU v datasetu (Příloha 1). Diverzita v jednotlivých vzorcích je vyjádřena pomocí indexů diverzity v Příloze č. 2. Statistický test neukázal významné rozdíly v diverzitě bakteriálního mikrobiomu mezi parazitickými a neparazitickými druhy rostlin ($t(44, 142) = 0.29824, p = .765964$). Diverzita mikrobiomu ve vzorcích z lučních společenstev v této studii byla obecně srovnatelná s vybranými, již publikovanými, studiemi o foliárních endofytických bakteriích (Wemheuer et al., 2019), nicméně hlubší srovnání by vyžadovalo podrobnější metaanalýzu, která není předmětem této práce.

Vizualizace rozložení vzorků na jednotlivých lokalitách pomocí NMDS analýzy ukázala velkou variabilitu mezi jednotlivými opakováními u stejného druhu rostliny (např. lokalita Vrbenské rybníky, obr. 3A) a rovněž nenaznačila, že se foliární mikrobiomy liší mezi parazitickými a neparazitickými rostlinami. Pokud se objevilo odlišné „clustrování“ vzorků jednoho druhu od ostatních, nejednalo se o parazitický druh. Příkladem je *Ranunculus acris* na lokalitě Hejdlov

(obr. 3H), nebo odlišný clustering všech tří druhů, včetně hemiparazitického *Pedicularis*, sbíraných na lokalitě Ruda (obr. 3B).

Analýza dat pomocí Vennových diagramů pro jednotlivé lokality (obr. 4) ukazuje míru sdílení bakteriálních OTU mezi různými hostiteli. Na všech studovaných lokalitách sdílejí parazitické rostliny většinu foliárního endo-mikrobiomu, specifických je pouze malé procento OTU (většinou 5-10 %), což je srovnatelné s ne-parazitickými druhy. Výjimku tvoří *Pedicularis* na lokalitě Ruda (obr. 4B) a *Melampyrum* na lokalitě Řetenice (obr. 4C), jejichž bakteriální mikrobiom byl unikátní v porovnání s potenciálními hostiteli z téměř 30 %. Na jiných lokalitách těchto druhů zahrnutých ve studii, Ohrazení (*Pedicularis*, *Melampyrum*) a Kuklov (*Melampyrum*), představovaly ale unikátní OTU znovu pouhých cca. 10 % (obr. 4D, F).

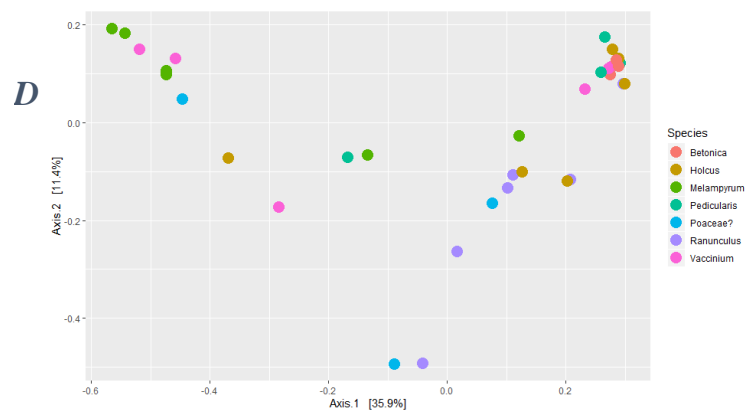
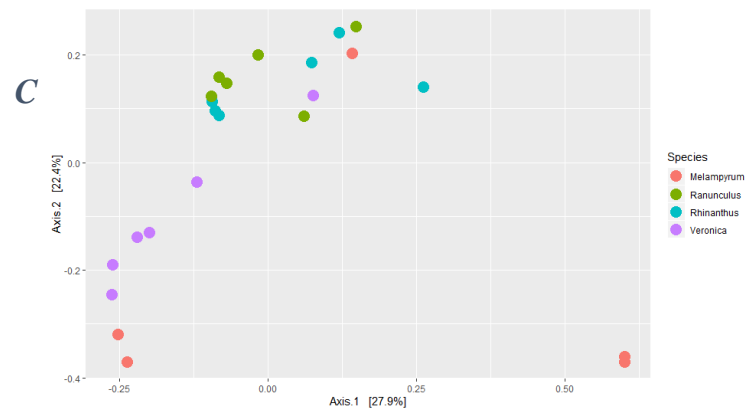
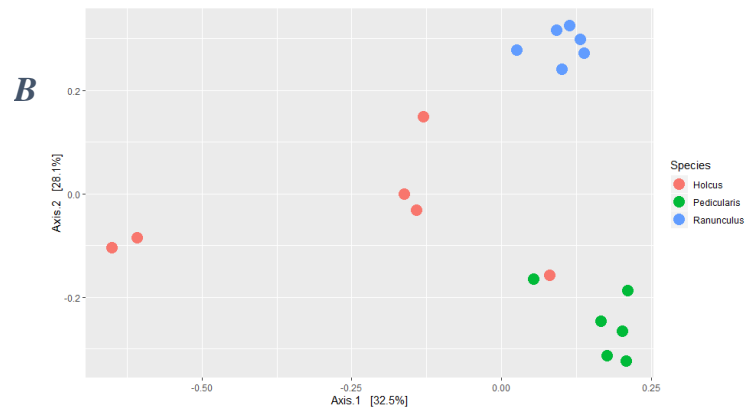
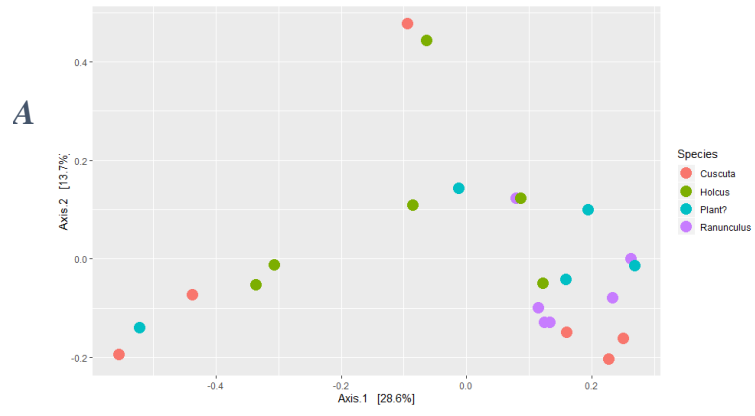
Velká odlišnost není patrná ani mezi bakteriálními endofyty osídlujícími holoparazitický druh *Cuscuta europaea* a jeho hostiteli (jediný případ interakce v této práci, kdy je hostitelská rostlina potvrzena), ačkoliv v tomto případě je rozdíl v životní strategii nejmarkantnější.

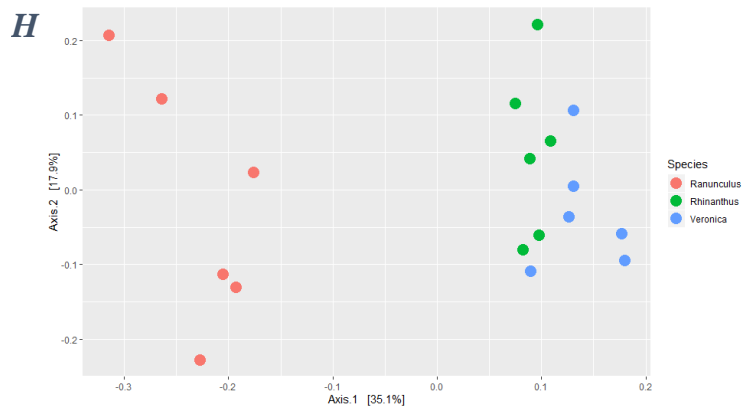
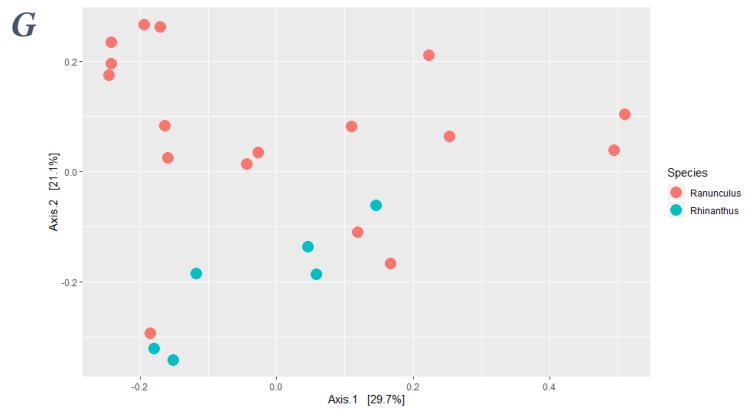
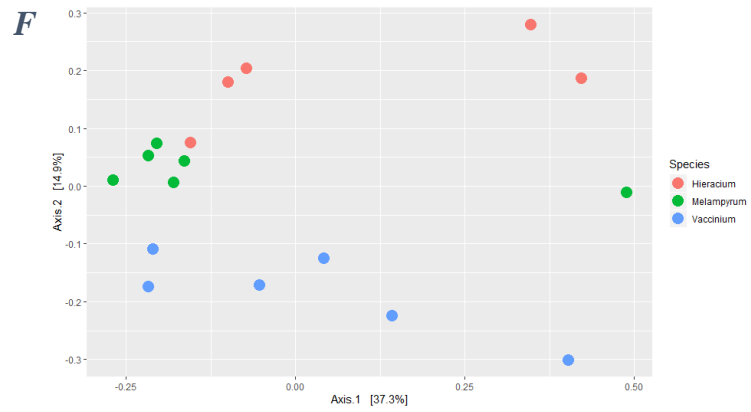
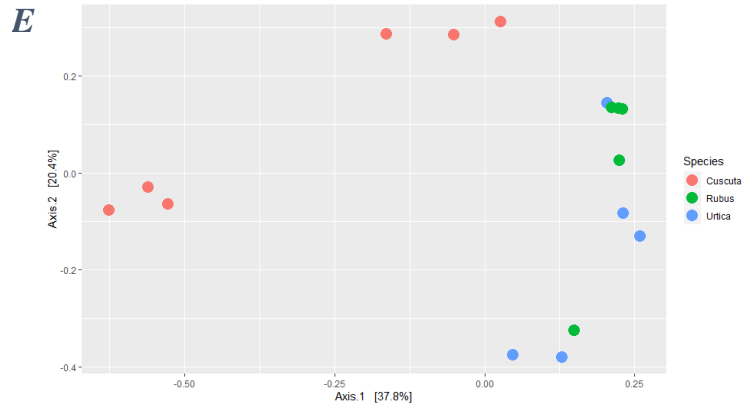
Předchozí práce ukázaly, že kromě minerálních živin a některých organických látek může hostitelská rostlina poskytnout hemiparazitické rostlině i sekundární metabolity účinné proti herbivorům produkované endofytem osídlujícím pouze hostitele. V tomto případě se jedná o interakci mezi *Lolium pratense* (hostitel) - *Neotyphodium uncinatum* (endofyt) - *Rhinanthus serotinus* (hemiparazit) (Lehtonen et al., 2005). Jak bylo popsáno výše, ke kontaktu mezi oběma rostlinami dochází pomocí napojení hemiparazita na cévní svazky (konkrátně xylem) hostitele. Xylémový systém propojuje podzemní a nadzemní části rostlin a dle publikované literatury je hojně osídlen endofytickými mikroorganismy (Frank et al., 2017). Je tedy možné, že kromě sekundárních metabolitů jsou xylémem do hemiparazitické rostliny přenášeny i buňky bakteriálních endofytů původně kolonizující hostitelskou rostlinu. Mikrobiom hemiparazita by tak byl mozaikou složenou z mikrobiomů parazitovaných rostlin, jak naznačují i výsledky této práce. Nicméně pro potvrzení této hypotézy by bylo v budoucnu potřeba provést manipulativní experiment s jasně vymezenými trofickými vztahy.

Pro bakterie je díky velikosti a způsobu života cesta xylémovým systémem pravděpodobnější než pro houby, bylo by ale zajímavé se v případném dalším výzkumu podrobněji zaměřit i na tuto skupinu endofytů. Sdílení endofytických mikroorganismů touto cestou opačným směrem, tj. hemiparazit-hostitel, je nepravděpodobné, jelikož by musely překonat velký rozdíl ve vodním potenciálu (viz výše).

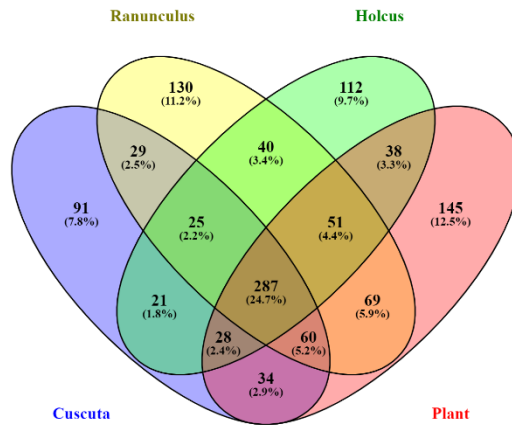
Podrobnější analýza bakteriálních OTU ve vzorcích V Tabulce 5 je uvedeno 15 bakteriálních rodů s největší relativní abundancí v datasetu. Dominují OTU ze skupiny Betaproteobacteria, (rod *Methylobacterium*) a Actinobacteria (rod *Sphingomonas*).

Obrázek 3 NMDS analýza sekvenčních dat zobrazující rozložení vzorků na jednotlivých lokalitách: A: Vrbenské rybníky, B: Ruda, C: Řetenice, D: Ohrazení, E: Lhenice, F: Kuklov, G: Chvalšiny, H: Hejdlov

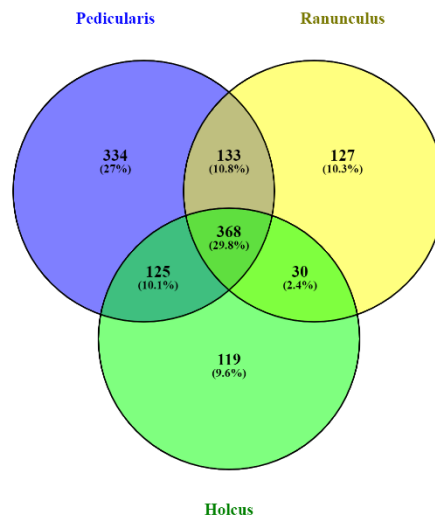




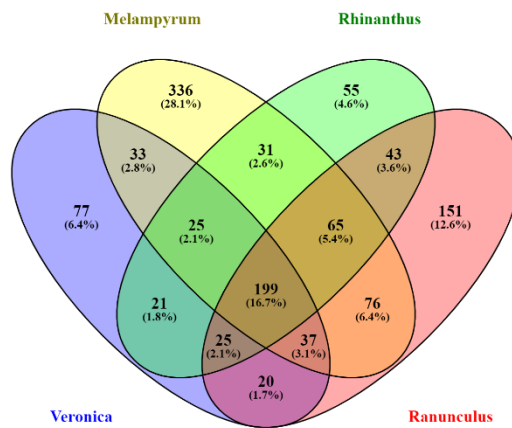
A



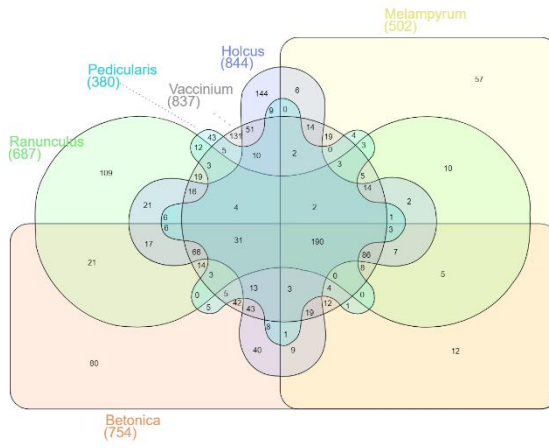
B



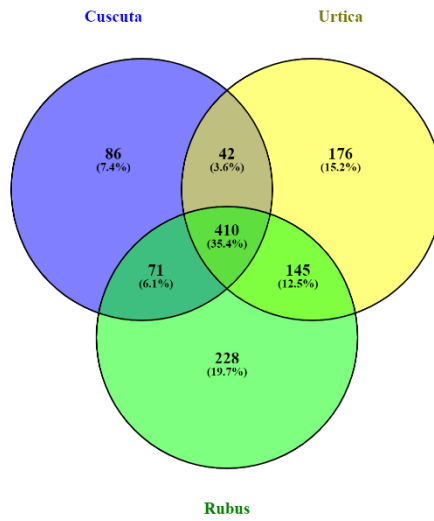
C



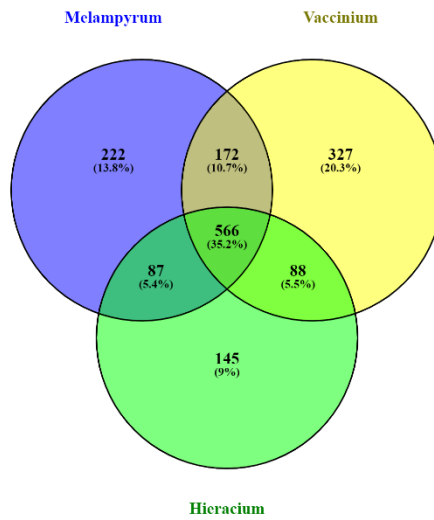
D



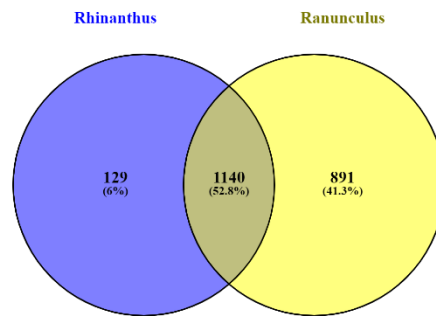
E



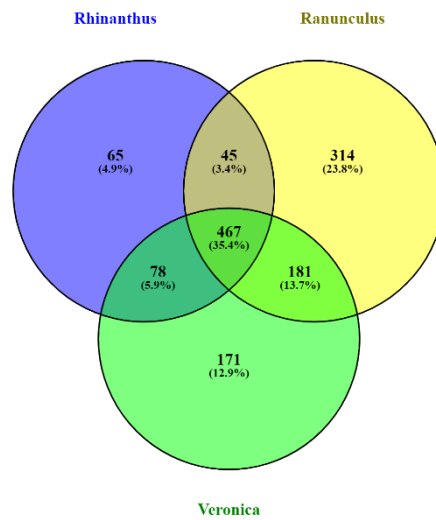
F



G



H



Obr. 4 Vennovy diagramy pro jednotlivé lokality ukazující míru sdílení bakteriálních OTU mezi různými hostitelskými druhy na lokalitách: A: Vrbenské rybníky, B: Ruda, C: Řetenice, D: Ohrazení, E: Lhenice, F: Kuklov, G: Chvalšiny, H: Hejdlov

V Tabulce 5 je uvedeno 20 bakteriálních rodů s největší relativní abundancí v datasetu. Dominují OTU ze skupiny Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Gammaproteobacteria a Bacteroidia. Tyto taxony tvoří přes polovinu všech sekvencí v datasetu (Příloha 1). Byly detekovány v drtivé většině vzorků a lze je tak považovat za generalisty v rámci skupiny endofytických bakterií ve studovaných lučních ekosystémech. Sfingomonády, kmeny rodu *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Variovorax* jsou v široce rozšířeny v celé škále prostředí, od půdy a vodu, přes rostlinná pletiva až po klinické vzorky. Kmeny rodu *Massilia*, *Allorhizobium* nebo *Commensalibacter* jsou naopak charakteristické svou vazbou na rostlinná pletiva. Všechny uvedené rody mají ale společnou schopnost přežít za nízkých koncentrací živin a metabolizovat širokou škálu zdrojů uhlíku, od methanolu až po složité rostlinné polymery a sekundární metabolity (Rosenberg et al., 2013).

Zajímavý je také výskyt bakterie rodu *Bdellovibrio*, také napříč většinou vzorků. Tyto predatorní bakterie významně přispívají k mortalitě gram-negativních bakterií v rozličných ekosystémech a lze předpokládat, že budou díky své vysoké selektivitě při vybírání kořisti přispívat i k strukturování bakteriálních společenstev ve foliární endosféře (Sokkett, 2009).

Tabulka 5 Seznam bakteriálních taxonů s nejvyšší relativní abundancí v datasetu.

Rod	Čeleď	Třída
<i>Sphingomonas</i>	Shingomonadaceae	Alphaproteobacteria
<i>Methylobacterium</i>	Beijerinckiaceae	Alphaproteobacteria
<i>Aureimonas</i>	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria
<i>Variovorax</i>	Burkholderiaceae	Gammaproteobacteria
<i>Unclassified</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
<i>Unclassified</i>	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria
<i>Hymenobacter</i>	Hymenobacteraceae	Bacteroidia
<i>Commensalibacter</i>	Acetobacteraceae	Alphaproteobacteria
<i>Pedobacter</i>	Sphingobacteriaceae	Bacteroidia
<i>Xanthomonas</i>	Xanthomonadaceae	Gammaproteobacteria
<i>Allorhizobium</i>	Rhizobiaceae	Alphaproteobacteria
<i>Massilia</i>	Burkholderiaceae	Gammaproteobacteria
<i>Pseudomonas</i>	Pseudomonadaceae	Gammaproteobacteria
<i>Geodermatophilus</i>	Geodermatophilaceae	Actinobacteria
<i>Unclassified</i>	Sporichthyaceae	Actinobacteria
<i>Kineococcus</i>	Kineosporiaceae	Actinobacteria
<i>Spirosoma</i>	Spirosomaceae	Bacteroidia
<i>Chryseobacterium</i>	Weeksellaceae	Bacteroidia
<i>1174-901-12</i>	Beijerinckiaceae	Alphaproteobacteria
<i>Actinomycetospora</i>	Pseudonocardiaceae	Actinobacteria

6 ZÁVĚR

Byla potvrzena účinnost použití PNA blokátorů během přípravy vzorků rostlinných tkání na amplikonové sekvenování mikrobiomu – kontaminaci organellovou DNA hostitele se podařilo snížit na minimum a zajistit tak dostatečnou hloubku sekvenování pro analýzy bakteriálního společenstva ve foliární endosféře. Výsledky nepodporují hypotézu, že diverzita bakteriálního endo-mikrobiomu hemiparazitických rostlin je nižší než u neparazitických rostlin rostoucích na stejné lokalitě, navíc je větší část bakteriálních taxonů sdílená mezi studovanými rostlinnými druhy na dané lokalitě. Bakterie s nejvyšší relativní abundancí jsou generalisté se schopnostmi metabolizovat široké spektrum látek a jen malé procento bakteriálního endo-mikrobiomu se zdá být specifické pro konkrétního hostitele.

7 REFERENCE

- Ahmad, S. S., & Tahir, I. (2016). How and why of flower senescence: understanding from models to ornamentals. *Indian Journal of Plant Physiology*, *21*(4), 446–456.
- Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2012). Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05409.x>
- Amari, T., Ghnaya, T., Debez, A., Taamali, M., Youssef, N. Ben, Lucchini, G., ... Abdelly, C. (2014). Comparative Ni tolerance and accumulation potentials between *Mesembryanthemum crystallinum* (halophyte) and *Brassica juncea*: metal accumulation, nutrient status and photosynthetic activity. *Journal of Plant Physiology*, *171*(17), 1634–1644.
- Arora, N. K., & Mishra, J. (2016). Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, *107*, 405–407. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>
- Azevedo, J. L., Maccheroni, W., Pereira, J. O., & De Araújo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, *3*(1). <https://doi.org/10.2225/vol3-issue1-fulltext-4>
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2006). Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In *Plant-Associated Bacteria* (pp. 155–194). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_5
- Bacon, C. W., & White Jr, J. F. (2000). Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In *Microbial endophytes* (pp. 251–276). CRC Press.
- Balachandar, D., Sandhiya, G. S., Sugitha, T. C. K., & Kumar, K. (2006). Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(7), 707–712. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9094-0>
- Bárta, J., Tahovská, K., Šantrůčková, H., & Oulehle, F. (2017). Microbial communities with distinct denitrification potential in spruce and beech soils differing in nitrate leaching. *Scientific Reports*, *7*(9738). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08554-1>
- Bary, A. (1866). *Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten* (2nd ed.). Leipzig: W. Engelmann.
- Berg, G., & Hallmann, J. (2006). Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In *Microbial root endophytes* (pp. 53–69). Retrieved from https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-33526-9_4
- Bertani, I., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Subramoni, S., & Venturi, V. (2016). Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. *Environmental Microbiology Reports*. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12403>
- Bhore, S. J., Nithya, R., & Loh, C. Y. (2010). Screening of endophytic bacteria isolated from

- leaves of Sambung Nyawa [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation*. <https://doi.org/10.6026/97320630005191>
- Bilal, S., Khan, A. L., Shahzad, R., Asaf, S., Kang, S.-M., & Lee, I.-J. (2017). Endophytic *Paecilomyces formosus* LHL10 augments *Glycine max* L. adaptation to Ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, 870.
- Bobay, L.-M., & Ochman, H. (2017). Biological Species Are Universal across Life's Domains. *Genome Biology and Evolution*, 9(3), 491–501. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx026>
- Boddey, R. M., Urquiaga, S., Reis, V., & Döbereiner, J. (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. In *Nitrogen fixation* (pp. 105–111). Springer.
- Boller, T., & Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bottomley, P. J., & Myrold, D. D. (2007). Biological N inputs. In *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 365–387). Elsevier.
- Cameron, D. D., Coats, A. M., & Seel, W. E. (2006). Differential resistance among host and non-host species underlies the variable success of the hemi-parasitic plant *Rhinanthus minor*. *Annals of Botany*, 98(6), 1289–1299. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl218>
- Canny, M. J. (1995). Apoplastic water and solute movement: new rules for an old space. *Annual Review of Plant Biology*, 46(1), 215–236.
- Canny, M. J., & Huang, C. X. (1993). What is in the intercellular spaces of roots? Evidence from the cryo-analytical-scanning electron microscope. *Physiologia Plantarum*, 87(4), 561–568.
- Canny, M. J., & McCully, M. E. (1988). The xylem sap of maize roots: its collection, composition and formation. *Functional Plant Biology*, 15(4), 557–566.
- Carrell, A. A., & Frank, A. C. (2014). *Pinus flexilis* and *Picea engelmannii* share a simple and consistent needle endophyte microbiota with a potential role in nitrogen fixation. *Frontiers in Microbiology*, 5, 333.
- Carroll, G. C. (1991). Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems. *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions*, 253–271.
- Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., ... Yaver, D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*.
- Castillo, U., Harper, J. K., Strobel, G. A., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., ... Teplow, D. (2003). Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00426-9)
- Chagas, M. B. de O., Prazeres dos Santos, I., Nascimento da Silva, L. C., Correia, M. T. dos

- S., Magali de Araújo, J., Cavalcanti, M. da S., & Lima, V. L. de M. (2017). Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic Fungi Associated with *Hancornia Speciosa* Gomes Bark. *The Open Microbiology Journal*, *11*(1), 179–188. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010179>
- Chaves, M. M., & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh269>
- Christina, A., Christopher, V., & Bhore, S. (2013). Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. *Pharmacognosy Reviews*. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.112833>
- Chytrý, M., Kučera, T., Kočí, M., Grulich, V., & Lustyk, P. (2010). *Katalog biotopů České republiky*.
- Cioica, N., Tudora, C., Iuga, D., Deak, G., Matei, M., Nagy, E. M., & Gyorgy, Z. (2019). A review on phytoremediation as an ecological method for in situ clean up of heavy metals contaminated soils. *E3S Web of Conferences*, *112*. EDP Sciences.
- Clay, K. (1988). Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, *69*(1), 10–16.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Copeland, J. K., Yuan, L., Layeghifard, M., Wang, P. W., & Guttman, D. S. (2015). Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0331-FI>
- Cord-Landwehr, S., Melcher, R. L. J., Kolkenbrock, S., & Moerschbacher, B. M. (2016). A chitin deacetylase from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. efficiently inactivates the elicitor activity of chitin oligomers in rice cells. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep38018>
- Costa, L. E. de O., de Queiroz, M. V., Chaer Borges, A., de Moraes, C. A., & de Araújo, E. F. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400041>
- Dawkins, R., & Krebs, J. R. (1979). Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *205*(1161), 489–511.
- Döbereiner, J., & Alvahydo, R. (1959). Sobre a influenciada canade-acucar na ocorrência de “Beijerinckia” no solo II. Influência das diversas partes do vegetal. *Rev Bras Biol*, *19*, 401–412.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dong, Z., Canny, M. J., McCully, M. E., Roboredo, M. R., Cabadilla, C. F., Ortega, E., &

- Rodes, R. (1994). A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). *Plant Physiology*, *105*(4), 1139–1147.
- Dörr, I. (1997). How *Striga* parasitizes its host: A TEM and SEM study. *Annals of Botany*, *79*(5), 463–472. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0385>
- Dostál, J. (1989). *Nová květena ČSSR* (Vol. 2). Academia.
- Ezra, D., Castillo, U. F., Strobel, G. A., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., ... Yaver, D. (2004). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26645-0>
- Faeth, S. H., Gardner, D. R., Hayes, C. J., Jani, A., Wittlinger, S. K., & Jones, T. A. (2006). Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. *Journal of Chemical Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9003-x>
- Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology*, *32*, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.008>
- Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D., ... Pressel, S. (2015). First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytologist*, *205*(2), 743–756. <https://doi.org/10.1111/nph.13024>
- Fitzpatrick, C. R., Lu-Irving, P., Copeland, J., Guttman, D. S., Wang, P. W., Baltrus, D. A., ... Johnson, M. T. J. (2018). Chloroplast sequence variation and the efficacy of peptide nucleic acids for blocking host amplification in plant microbiome studies. *Microbiome*. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0534-0>
- Fletcher, L. R., & Harvey, I. C. (1981). An association of a lolium endophyte with ryegrass staggers. *New Zealand Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1080/00480169.1981.34839>
- Frank, A., Saldierna Guzmán, J., & Shay, J. (2017). Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>
- Freeman, E. M. (1904). I.—The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the darnel. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, *196*(214–224), 1–27.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., ... Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Gao, F., Dai, C., & Liu, X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, *4*(13), 1346–1351.
- Gera Hol, W. H., Martijn Bezemer, T., & Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 81. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00081>

- Giaquinta, R. (1976). Evidence for Phloem Loading from the Apoplast. *Plant Physiology*.
<https://doi.org/10.1104/pp.57.6.872>
- Goodrich, J. K., Di Rienzi, S. C., Poole, A. C., Koren, O., Walters, W. A., Caporaso, J. G., ...
 Ley, R. E. (2014). Conducting a microbiome study. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.037>
- Gough, C., & Cullimore, J. (2011). Lipo-chitoooligosaccharide signaling in endosymbiotic
 plant-microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(8), 867–878.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-01-11-0019>
- Greenwood, N. N., & Earnshaw, A. (1997). Chemistry of the Elements. *Piccin Nuova
 Libreria-SpA Padova, Italy*.
- Guerin, P. (1898). Sur la présence d'un champignon dans l'ivraie. *J Bot*, 12, 230–238.
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: A century of
 discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pct020>
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense
 responses. *Plant Cell*, 8(10), 1773–1791. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1773>
- Hanley, M. E., Lamont, B. B., Fairbanks, M. M., & Rafferty, C. M. (2007). Plant structural
 traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution
 and Systematics*, 8(4), 157–178. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2007.01.001>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A.,
 ... Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary
 Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and
 Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00050-14>
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial
 endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10),
 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
- Hassani, M. A., Durán, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant
 holobiont. *Microbiome*, 6(58). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- Hatcher, M. J., Dick, J. T. A., & Dunn, A. M. (2012). Diverse effects of parasites in
 ecosystems: Linking interdependent processes. *Frontiers in Ecology and the
 Environment*, 10(4), 186–194. <https://doi.org/10.1890/110016>
- Heberle, H., Meirelles, V. G., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015).
 InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC
 Bioinformatics*, 16(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>
- HEGI, G. (1975). *Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band VI/1*. Paul Parey Verlag, Berlin.
- Heinig, U., Scholz, S., & Jennewein, S. (2013). Getting to the bottom of Taxol biosynthesis
 by fungi. *Fungal Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0228-7>
- Hibberd, J. M., & Jeschke, W. D. (2001). Solute flux into parasitic plants. *Journal of
 Experimental Botany*, 52(363), 2043–2049. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.2043>

- Higginbotham, S. J., Arnold, A. E., Ibañez, A., Spadafora, C., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2013). Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073192>
- Higgins, K. L., Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Sarvate, S. D., & Lutzoni, F. (2007). Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.012>
- Hoffman, M. T., Gunatilaka, M. K., Wijeratne, K., Gunatilaka, L., & Arnold, A. E. (2013). Endohyphal Bacterium Enhances Production of Indole-3-Acetic Acid by a Foliar Fungal Endophyte. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073132>
- Hopkins, W. G. (1999). *Introduction to plant physiology*. John Wiley and Sons.
- Howitz, K. T., & Sinclair, D. A. (2008). Xenohormesis: Sensing the Chemical Cues of Other Species. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.019>
- Irving, L. J., & Cameron, D. D. (2009). You are What You Eat. Interactions Between Root Parasitic Plants and Their Hosts. In *Advances in Botanical Research* (pp. 87–138). [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00803-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00803-3)
- Jarvis, M. C. (1998). Intercellular separation forces generated by intracellular pressure. *Plant, Cell & Environment*, *21*(12), 1307–1310.
- Jiang, F., Jeschke, W. D., Hartung, W., & Cameron, D. D. (2010). Interactions between *Rhinanthus minor* and its hosts: a review of water, mineral nutrient and hormone flows and exchanges in the hemiparasitic association. *Folia Geobotanica*, *45*(4), 369–385.
- Jumpponen, A., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: A review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, *140*(2), 295–310. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x>
- Karpinets, T. V., Park, B. H., Syed, M. H., Klotz, M. G., & Uberbacher, E. C. (2014). Metabolic environments and genomic features associated with pathogenic and mutualistic interactions between bacteria and plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-13-0368-R>
- Kašparová, M., Siatka, T., & Klimešová, V. (2012). Vliv syntetického benzylsulfanylpýridinového derivátu na produkci suspenzní kultury *Trifolium pratense*. *L. Chemické Listy*, *106*, 660–664.
- Kenrick, P., & Strullu-Derrien, C. (2014). The origin and early evolution of roots. *Plant Physiology*, *166*(2), 570–580. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244517>
- Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and Prospects. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
- Klimešová, J. (2008). Jaké to je, když vám někdo pije vodu. *Životní Strategie Poloparazitů. Vesmír*, *87*, 110.
- KOGA, H., KIMIGAFUKURO, T., TSUKIBOSHI, T., & UEMATSU, T. (1993). Incidence

- of Endophytic Fungi in Perennial Ryegrass in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 59(2), 180–184. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.59.180>
- Korčáková, H., & Starčevská, L. (2011). *Česká zemědělská univerzita v Praze Ústřední komise Biologické olympiády Studijní text kategorie C a D*. Retrieved from <https://biologickaolympiada.czu.cz/cs/r-11831-predchozi-rocniky/r-12011-ustredni-kola/r-12339-45-rocnik>
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., & White, J. F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>
- Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., ... Lashari, A. A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Advances in Environmental Biology*.
- Lehtonen, P., Helander, M., Wink, M., Sporer, F., & Saikkonen, K. (2005). Transfer of endophyte-origin defensive alkaloids from a grass to a hemiparasitic plant. *Ecology Letters*, 8(12), 1256–1263. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00834.x>
- Li, J., Zhao, G. Z., Varma, A., Qin, S., Xiong, Z., Huang, H. Y., ... Li, W. J. (2012). An Endophytic Pseudonocardia Species Induces the Production of Artemisinin in Artemisia annua. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051410>
- Li, O., Xiao, R., Sun, L., Guan, C., Kong, D., & Hu, X. (2017). Bacterial and diazotrophic diversities of endophytes in Dendrobium catenatum determined through barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184717>
- Locey, K. J., & Lennon, J. T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & Van der Lelie, D. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), 583–606. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044377>
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2634>
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>
- Madhaiyan, M., Alex, T. H. H., Ngoh, S. Te, Prithiviraj, B., & Ji, L. (2015). Leaf-residing Methylobacterium species fix nitrogen and promote biomass and seed production in Jatropha curcas. *Biotechnology for Biofuels*. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0404-y>
- Madore, M., & Webb, J. A. (1981). Leaf free space analysis and vein loading in Cucurbita pepo. *Canadian Journal of Botany*, 59(12), 2550–2557.
- Margulis, L. (1981). *Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth*.
- Maybrook, A. C. (1917). On the haustoria of Pedicularis vulgaris, Tournef. *Annals of Botany*,

31(123/124), 499–511.

- Mei, C., & Flinn, B. (2009). The Use of Beneficial Microbial Endophytes for Plant Biomass and Stress Tolerance Improvement. *Recent Patents on Biotechnology*, 4(1), 81–95. <https://doi.org/10.2174/187220810790069523>
- Mikulka, J., Chodová, D., Kohout, V., Martinková, Z., Soukup, J., & Uhlík, J. (1999). Plevelné rostliny polí, luk a zahrad. *Farmář-Zemědělské Listy. Praha*.
- Miliute, I., Buzaitė, O., Baniulis, D., & Stanys, V. (2015). Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: A review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(4), 465–478. <https://doi.org/10.13080/z-a.2015.102.060>
- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4(139), 139. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00139>
- Nguema-Ona, E., Vicré-Gibouin, M., Cannesan, M. A., & Driouich, A. (2013). Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends in Plant Science*, 18(8), 440–449. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.006>
- Nielsen, P. E. (1999). Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. *Accounts of Chemical Research*. <https://doi.org/10.1021/ar980010t>
- Nzabanita, C., Liu, H., Min, S., Ting-yan, M., & Li, Y. Z. (2018). Locoweed Endophytes: A Review. *J Plant Physiol Pathol* 6, 5, 2.
- Obianime, A. W., & Aprioku, J. S. (2009). Comparative study of artesunate, acts and their combinants on the spermatic parameters of the male guinea-pig. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*. <https://doi.org/10.4314/njps.v24i1.46372>
- Onofre, S. B., Bonfante, T., Quinteiro dos Santos, Z. M., Coradin de Moura, M., & Cardoso, A. F. (2014). Cellulase Production by Endophytic Strains of *Trichoderma reesei* from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Advances in Microbiology*, 4(5), 275–283.
- ørum, H., Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., Buchardt, O., & Stanley, C. (1993). Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/21.23.5332>
- Pandey, S. S., Singh, S., Babu, C. S. V., Shanker, K., Srivastava, N. K., & Kalra, A. (2016). Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzyloquinoline alkaloids. *Planta*. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2467-9>
- Parniske, M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 320–328. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00088-1)
- Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1987>
- Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., de Hollander, M., & Raaijmakers, J. M. (2018). The wild side of plant microbiomes. *Microbiome*, 6(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0519-z>

- Peyronel, B. (1924). *Prime ricerche sulle micorize endotrofiche e sulla micoflora radicolare normale delle fanerogame*. Tipografia del Senato.
- Press, M. C. (1989). Autotrophy and heterotrophy in root hemiparasites. *Trends in Ecology and Evolution*, 4(9), 258–263. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90195-X](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90195-X)
- Qian, C. D., Fu, Y. H., Jiang, F. S., Xu, Z. H., Cheng, D. Q., Ding, B., ... Ding, Z. S. (2014). *Lasiodiplodia* sp. ME4-2, an endophytic fungus from the floral parts of *Viscum coloratum*, produces indole-3-carboxylic acid and other aromatic metabolites. *BMC Microbiology*, 14(297). <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0297-0>
- Reid, M. S., & Wu, M.-J. (1992). Ethylene and flower senescence. *Plant Growth Regulation*, 11(1), 37–43.
- Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: Bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>
- Rodriguez Estrada, A. E., Jonkers, W., Corby Kistler, H., & May, G. (2012). Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: An endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetics and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.05.001>
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: Diversity and functional roles: Tansley review. *New Phytologist*, 182(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Thompson, F., Lory, S., & Stackebrandt, E. (2013). The prokaryotes. In Eugene Rosenberg (Ed.), *Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0>
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8), 827–837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>
- Rozpadek, P., Domka, A. M., Nosek, M., Wazny, R., Jedrzejczyk, R. J., Wiciarz, M., & Turnau, K. (2018). The role of strigolactone in the cross-talk between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Mucor* sp. *Frontiers in Microbiology*, 9(441). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00441>
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Scherling, C., Ulrich, K., Ewald, D., & Weckwerth, W. (2009). A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *paenibacillus* sp. isolate and in vitro-grown poplar plants revealed by metabolomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1032>

- Schwartz, A. (2007, January 24). T. F. Preece, and C. H. Dickinson (,Editors) Ecology of Leaf Surface MicroOrganisms (Proceed. Internat. Sympos. University of Newcastle upon Tyne, Sept. 1970). XVII und 640 S., 216 Abb., 87 Tab. London-New York 1971: Academic Press \$ 9.-. *Journal of Basic Microbiology - J BASIC MICROB*, Vol. 13, p. 188. <https://doi.org/10.1002/jobm.19730130225>
- Smith, A. J. E. (1963). Variation in *Melampyrum pratense* L. *Watsonia*, 5, 336–367.
- Sockett, R. E. (2009). Predatory Lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annual Review of Microbiology*, 63, 523–539. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073346>
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., ... Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Štech, M., Jersáková, J., Klimešová, J., Malinová, T., & Těšitel, J. (2010). Rostliny jako paraziti. 5, 204–207. Retrieved from <http://ziva.avcr.cz/2010-5/rostliny-jako-paraziti.html>
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214–216.
- STONE, J. K., POLISHOOK, J. D., & WHITE, J. F. (2004). ENDOPHYTIC FUNGI. In G. Mueller, Bills GF, & Foster MS (Eds.), *Biodiversity of Fungi* (pp. 241–270). <https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50015-5>
- Tadych, M., & White, J. (2019). Endophytic Microbes. In Thomas M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (4th ed., pp. 123–136). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13036-5>
- Taghavi, S., van der Lelie, D., Hoffman, A., Zhang, Y. B., Walla, M. D., Vangronsveld, J., ... Monchy, S. (2010). Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000943>
- Tanaka, A., Tapper, B. A., Popay, A., Parker, E. J., & Scott, B. (2005). A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04747.x>
- Tennakoon, K. U., Pate, J. S., & Fineran, B. A. (1997). Growth and partitioning of C and fixed N in the shrub legume *Acacia littorea* in the presence or absence of the root hemiparasite *Oxalis phyllanthi*. *Journal of Experimental Botany*, 48(5), 1047–1060. <https://doi.org/10.1093/jxb/48.5.1047>
- Těšitel, J. (2011). Jak se parazituje v říši rostlin – funkční anatomie haustorií. *Živa*, 59, 105–107. Retrieved from <http://ziva.avcr.cz/2011-3/jak-se-parazituje-v-risi-rostliny-funkcni-anatomie-haustorii.html>
- Tetlow, I. J., & Farrar, J. F. (1993). Apoplastic sugar concentration and pH in barley leaves infected with brown rust. *Journal of Experimental Botany*, 44(5), 929–936.
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., & Joosten, M. H. A. J. (2011). Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, 23(1), 4–15.

<https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>

- Uroz, S., Courty, P. E., & Oger, P. (2019). Plant Symbionts Are Engineers of the Plant-Associated Microbiome. *Trends in Plant Science*, 24(10), 905–916. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.06.008>
- Van Bael, S. A., Seid, M. A., & Wcislo, W. T. (2012). Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecological Entomology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2012.01364.x>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Wang, J., Li, T., Liu, G., Smith, J. M., & Zhao, Z. (2016). Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: physiological, cytological and genic aspects. *Scientific Reports*, 6, 22028.
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>
- Weber, H. C. (1976). Über Wirtspflanzen und Parasitismus einiger mitteleuropäischer Rhinanthoideae (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 125(2), 97–107.
- Wei, G., Kloepper, J. W., & Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81(11), 1508–1512.
- Wemheuer, F., Wemheuer, B., Daniel, R., & Vidal, S. (2019). Deciphering bacterial and fungal endophyte communities in leaves of two maple trees with green islands. *Scientific Reports*, 9(14183). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50540-2>
- Wilkinson, H. H., Siegel, M. R., Blankenship, J. D., Mallory, A. C., Bush, L. P., & Schardl, C. L. (2000). Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.10.1027>
- Young, J. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biological Nitrogen Fixation*.
- Yuan, J. I., Jian-Nan, B. I., Bing, Y. A. N., & Xu-Dong, Z. (2006). Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(1), 1–6.
- Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 139–150.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., ... Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide

synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15811–15816. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404536101>

Zhang, Y., Zalapa, J., Jakubowski, A. R., Price, D. L., Acharya, A., Wei, Y., ... Casler, M. D. (2011). Natural hybrids and gene flow between upland and lowland switchgrass. *Crop Science*, *51*(6), 2626–2641. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.02.0104>

Zhou, S. L., Yan, S. Z., Liu, Q. S., & Chen, S. L. (2015). Diversity of Endophytic Fungi Associated with the Foliar Tissue of a Hemi-Parasitic Plant *Macrosolen cochinchinensis*. *Current Microbiology*, *70*(1), 58–66. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0680-y>