

Streszczenie

Współcześnie uważa się, że organizmy żywe nie stanowią niezależnych jednostek. Zarówno zwierzęta, jak i rośliny są „kolonizowane” przez taksonomicznie różnorodne mikroorganizmy, żyjące zarówno na powierzchni organów, jak i wewnątrz tkanek. W odniesieniu do organizmów roślinnych, mikroorganizmy te posiadają zdolność oddziaływania na procesy fizjologiczne m.in. pobieranie mikro- i makroelementów czy też odpowiedź na działanie biotycznych/abiotycznych czynników stresowych. W nawiązaniu do teorii holobiontu, stan fizjologiczny organizmu roślinnego jest wypadkową wzajemnego oddziaływania rośliny z jej mikrobiomem. U większości dotychczas zbadanych roślin stwierdzono kolonizację przez powszechnie występujące bakterie i grzyby endofityczne. Obecnie mikroorganizmy te stanowią przedmiot intensywnych badań, z uwagi na ich znaczenie dla m.in. gospodarki mineralnej roślin, odporności na patogeny czy też tolerancji zanieczyszczeń środowiskowych.

W odróżnieniu od poprzednich badań prowadzonych w Polsce na terenach zanieczyszczonych metalami toksycznymi, dotyczących roli grzybów mykoryzowych w tolerancji metali ciężkich przez organizmy roślinne, celem niniejszej dysertacji jest zbadanie znaczenia grzybów endofitycznych dla przetrwania roślin w obecności metali ciężkich. Endofity grzybowe są zróżnicowane taksonomicznie, obejmują zarówno obligatoryjne jak i fakultatywne symbionty i w przeciwieństwie do grzybów mykoryzowych zdolne są do kolonizacji nie tylko korzeni roślin, ale również ich części nadziemnych. W przedstawionej dysertacji, grzyby endofityczne zostały wyizolowane z *Arabidopsis arenosa*, pochodzącej z hałdy pogórnicy „ZGH Bolesław”. Roślina ta należy do rodziny Brassicaceae. Uważa się, że rośliny należące do tej rodziny utraciły zdolność do interakcji z grzybami mykoryzowymi. Wyniki przedstawione w niniejszej dysertacji ukazują nie tylko bioróżnorodność mykobioty *A. arenosa*, lecz dotyczą również istotnych aspektów interakcji roślina-grzyby endofityczne, tj. procesu kolonizacji tkanek gospodarza przez endofita oraz roli hormonów roślinnych – strigolaktonów, jako czynników kluczowych dla determinacji oddziaływań mutualistycznych (Rys.1).

W wyniku izolacji grzybów endofitycznych z tkanek *A. arenosa*, rosnących na hałdzie pogórnicy, uzyskano 11 szczepów grzybów zdolnych do wzrostu w kulturach aksenicznych. Do

dalszych badań wybrano jeden szczep, zidentyfikowany jako blisko spokrewniony z *Mucor plumbeus*. Uzyskanie szczepu znakowanego markerem GFP w wyniku transformacji protoplastów oraz wykorzystanie metody qPCR pozwoliło nie tylko na wykrycie obecności endofita, ale również na śledzenie dynamiki kolonizacji tkanek roślinnych. Rolę strigolaktonów w kształtowaniu pozytywnego charakteru interakcji roślina-endofit zbadano dzięki wykorzystaniu syntetycznego analogu strigolaktonów - GR24 oraz blisko spokrewnionej do *A. arenosa* rośliny modelowej – *Arabidopsis thaliana*. Zastosowany model roślinny umożliwił wykorzystanie do badań komercyjnie dostępnych mutantów, z upośledzonym szlakiem biosyntezy strigolaktonów oraz defektywnych w ścieżce sygnalizacyjnej tych fitohormonów,

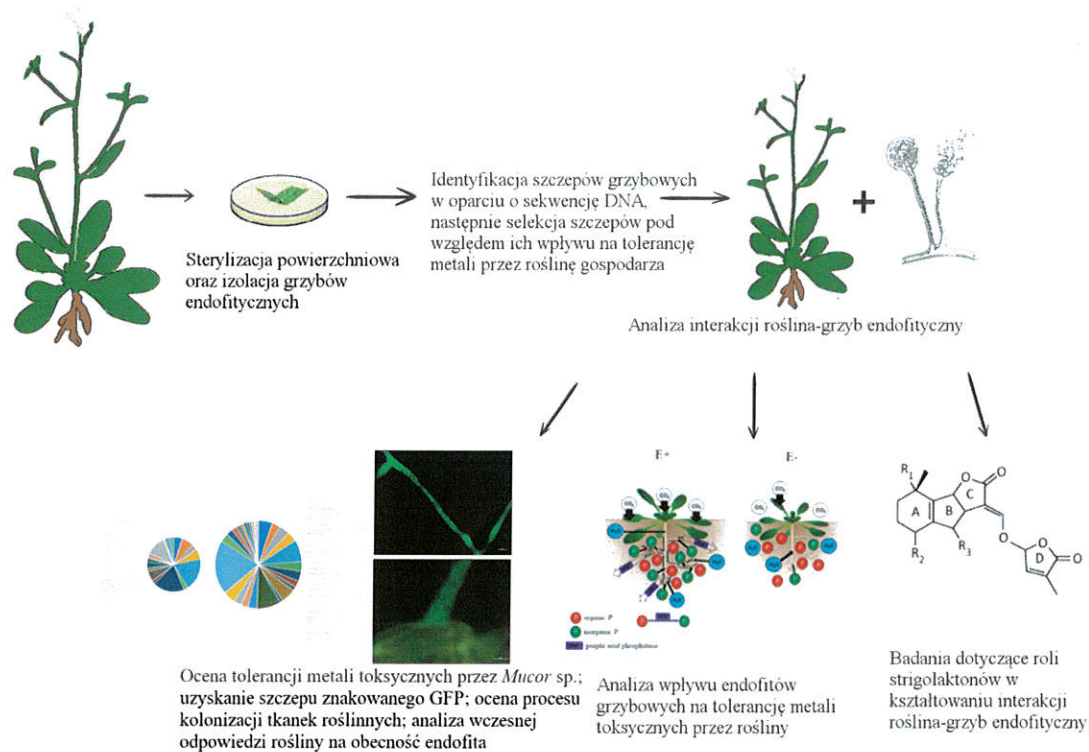
Złożony proces kształtowania symbiozy pomiędzy rośliną a grzybem pociąga za sobą zmiany w metabolizmie obu partnerów interakcji. Wyniki badań wskazują, że hormony roślinne mogą pełnić kluczową rolę w tym procesie, gdzie utrzymanie równowagi pomiędzy reakcją obronną i wzrostową stanowi o rozwoju mutualizmu lub pasożytnictwa. Strigolaktyny okazały się być niezbędne dla ukształtowania mutualistycznego charakteru interakcji *Mucor* sp. - *A. thaliana*. W przeciwieństwie do roślin dzikiego typu, mutanty niezdolne do biosyntezy tych fitohormonów odpowiadały zahamowaniem wzrostu w odpowiedzi na inokulację *Mucor* sp. Co więcej, negatywna odpowiedź wzrostowa roślin była skorelowana ze wzmożoną akumulacją kwasu salicylowego, a w konsekwencji z indukcją ekspresji genów związanych z reakcją obronną rośliny, np. genów kodujących defensyny. Wykazano ponadto, że endofityczny szczep *Mucor* sp. jest zdolny do regulacji poziomu strigolaktonów *in planta*, zarówno przez bezpośrednią zdolność do ich hydrolizy jak również pośrednio, poprzez regulację ekspresji roślinnych genów, kodujących białka ze szlaku biosyntezy strigolaktonów. Stwierdzono również oddziaływanie samych strigolaktonów na wzrost i metabolizm endofita. Suplementacja za pomocą GR24 skutkowała zahamowaniem wzrostu radialnego *Mucor* sp. oraz wzmożeniem intensywności oddychania. Wykazano ponadto, podwyższenie produkcji H₂O₂ oraz zmiany w zakresie aktywności enzymów antyoksydacyjnych u *Mucor* sp., poddanego działaniu GR24 w różnych stężeniach.

W ostatnich latach, badania wykazały istotne znaczenie grzybów endofitycznych w łagodzeniu symptomów stresu u roślin-gospodarzy, eksponowanych na działanie metali toksycznych, wynikające z regulacji procesów metabolicznych rośliny tj. pobór mikro-, makroelementów i wody, transport metali czy utrzymanie homeostazy redox. Odpowiedź rośliny na metale toksyczne jest wypadkową działania wielu czynników, wśród których ważną rolę odgrywa fitohormon – etylen. Sama biosynteza jak i odpowiedź na etylen może być regulowana w organizmie roślinnym przez mikroorganizmy symbiotyczne. Analiza transkryptomu za pomocą mikromacierzy wykazała, że u *A. arenosa* inokulowanej *Mucor* sp. dochodzi do indukcji biosyntezy etylenu oraz ścieżek/efektorów związanych z

przekazywaniem sygnału etylenowego. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że obserwowane zmiany w roślinnej homeostazie metali, obejmujące reorganizację dystrybucji metali oraz poziomów ekspresji genów kodujących transportery metali, indukowane obecnością endofita, mogą być wynikiem zmian w homeostazie etylenowej. Wykazano ponadto, że *Mucor* sp. oddziałuje na pobór makroelementów przez rośliny wskutek regulacji roślinnej odpowiedzi na głodzenie fosforem (ang. phosphorus starvation response-PSR), jak również reguluje pobór wody przez roślinę. Badany endofit wpływał dodatnio na wzrost elongacyjny włóśników korzeniowych, co również ma znaczenie w odniesieniu do gospodarki wodno-mineralnej roślin. Obserwowany fenotyp włóśnikowy może być efektem zmian zachodzących w homeostazie etylenowej.

Zrozumienie zjawiska interakcji pomiędzy rośliną a endofitem oraz jego znaczenia dla tolerancji metali toksycznych przez rośliny, wymaga kompleksowego poznania zmian metabolicznych zachodzących w organizmach symbiotycznych, stopnia tolerancji endofita na toksyczność metali jak również samego procesu kolonizacji tkanek roślinnych. Wykazano, że interakcja roślin z *Mucor* sp. skutkuje stymulacją ich wzrostu bez względu na obecność metali toksycznych w podłożu. Natomiast, sam szczep *Mucor* sp. jest zdolny do wzrostu na podłożach zawierających Pb, Zn i Cd w stężeniach kilkuset (Cd) bądź nawet kilku tysięcy (Zn i Pb) μM . Ponadto, badany endofit wpływał dodatnio na pobór azotu przez *A. arenosa*, rosnącą na podłożu hałdowym, co prawdopodobnie było jedną z przyczyn złagodzenia reakcji stresowej roślin, obserwowanego w postaci obniżonej aktywności katalazy. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem szczepu znakowanego GFP oraz metody *qPCR* wykazały obecność endofita zarówno w korzeniach jak i w nadziemnych częściach rośliny. Obecność *Mucor* sp. zanotowano również wewnątrz tkanki naczyniowej, co wskazuje na potencjalną drogę kolonizacji części nadziemnych roślin. Analiza dynamiki kolonizacji wykazała przejściowy spadek obfitości endofita zarówno w pędach jak i w korzeniach. Wynik ten skorelowano z indukcją ekspresji genów, związanych z reakcją obronną rośliny, którą wykazano na początku interakcji, kiedy ścieżki obrony i odpowiedzi wzrostowej nie są jeszcze zbalansowane.

Wyniki przedstawione w tej dysertacji podkreślają znaczącą rolę endofitów grzybowych w tolerancji metali toksycznych przez rośliny, jak również wskazują na konieczność poznania mechanizmów związanych z kształtowaniem interakcji roślina-endofit.



Rys.1. Schemat badań, dotyczących interakcji roślina-grzyb endofityczny w kontekście wegetacji roślin w siedliskach o podwyższonej zawartości metali toksycznych. Rośliny *A. arenosa* wykorzystano do izolacji grzybów endofitycznych. Proces kolonizacji tkanek roślinnych zbadano z wykorzystaniem szczepu znakowanego GFP oraz metody *qPCR*. Przeprowadzono analizę wpływu endofita na fizjologię roślin, narażonych na stres metali toksycznych. Zbadano rolę strigolaktonów (SLs) w kształtowaniu interakcji roślina-endofit. GFP – białko zielonej fluorescencji, E+/E- - rośliny inokulowane *Mucor* sp./nieinokulowane rośliny kontrolne.

[Signature]