Załącznik nr 2A

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

dr Piotr Rozpądek

Autoreferat

Kraków, 2018

1. Imię i Nazwisko

Piotr Rozpądek

2. Tytuł

Jak symbioza zmienia roślinę? Mechanizmy dostosowania roślin do symbiozy z grzybami endofitycznymi

3. Posiadanie dyplomy, stopnie naukowe

2011 stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, Międzynarodowe Studium Doktoranckie Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauki w Krakowie Tytuł rozprawy: „Analiza wybranych elementów układu antyoksydacyjnego *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba* poddanej fumigacji ozonem". Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. Zbigniew Miszalski

2007 tytuł zawodowy magistra biologii, specjalizacja biologia komórki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie. Tytuł pracy magisterskiej: „Okołodobowe zmiany ekspresji glikokoniugatów i białka mPER1 w komórkach Panetha myszy karmionych w dzień". Promotor pracy magisterskiej: Dr Andrzej Fiertak

4. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 2017 Kierownik Grupy Badawczej Interakcji Roślin z Mikroorganizmami, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

2012 - 2017 Asystent w Zakładzie Interakcji Roślin z Mikroorganizmami, Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

2013 - 2017 Adiunkt w Zakładzie Biologii Stresu, Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

2011 - 2013 Asystent w Zakładzie Biologii Stresu, Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

2007 - 2011 Biolog w Zakładzie Biologii Stresu, Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

Jak symbioza zmienia roślinę? Mechanizmy dostosowania roślin do symbiozy z grzybami endofitycznymi

(1) **Rozpądek P***, Wężowicz K, Nosek M, Ważny R, Tokarz K, Lembicz M, Miszalski Z, Turnau K (2015), The fungal endophyte *Epichloë typhina* improves photosynthesis efficiency of its host orchard grass (*Dactylis glomerata*). Planta 242/4: 1025-1035, doi:10.1007/s00425-015-2337-x

IF 2015: 3,239, IF 5-cio letni: 3,7 liczba cytowań wg. web of science: 17, wg. Scopus: 19, punkty MNiSW: 40

(2) **Rozpądek P*,** Domka A, Ważny R, Nosek M, Jędrzejczyk R, Tokarz K, Turnau K (2017) How does the endophytic fungus *Mucor* sp. improve *Arabidopsis arenosa* vegetation in the degraded environment of a mine dump? Environmental and Experimental Botany 147: 31-42, doi:org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.009

IF 2018: 3,666, IF 5-cio letni: 4,234 liczba cytowań wg. web of science: 3, wg. Scopus: 5, punkty MNiSW: 40

(3) **Rozpądek P***, Domka AM, Nosek M, Ważny R, Jędrzejczyk RJ, 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, doi: 10.3389/fmicb.2018.00441

IF 2018: 4,019, IF 5-cio letni: 4,526 liczba cytowań wg. web of science: 2, wg. Scopus: 3, punkty MNiSW: 35

(4) **Rozpądek P***, Nosek M, Domka A, Ważny R, Jędrzejczyk RJ, Tokarz K, Pilarska M, Niewiadomska E, Turnau K (2019) Acclimation of the photosynthetic apparatus and alterations in sugar metabolism in response to inoculation with endophytic fungi. Plant, Cell and Environment DOI: 10.1111/pce.13485

IF 2018: 5,415 , IF 5-cio letni: 6,151, liczba cytowań wg. web of science: 0, wg. Scopus: 0, punkty MNiSW: 45

(5) Domka A*, **Rozpądek P**, Ważny R, Turnau K (2019) *Mucor* sp.-an endophyte of Brassicaceae capable of surviving in toxic metal-rich sites. Journal of Basic Microbiology 59: 24-37, doi:10.1002/jobm.201800406

IF 2018: 1,58, IF 5-cio letni: 1,737, liczba cytowań wg. web of science: 0, wg. Scopus: 0, punkty MNiSW: 20

*- autor korespondencyjny

Sumaryczny IF: 17,919

Suma punktów MNiSW: 180

6. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Tematyką interakcji roślin z mikroorganizmami zajmuję się od 2012 roku kiedy w wyniku konkursu zostałem zatrudniony na etacie asystenta naukowego w zakładzie Interakcji Roślin z Mikroorganizmami INOŚ UJ w ramach projektu MAESTRO „Endofity roślin jako nowe narzędzie fitoremediacji" (NCN DEW-2011/02/A/NZ9/00137) pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Turnau. W swojej pracy badawczej skupiam się na następujących zagadnieniach:

a) Udział czynników abiotycznych w determinacji bioróżnorodności mikroorganizmów symbiotycznych roślin, ze szczególnym naciskiem na endofity roślin;
b) Rola bioróżnorodności mikrobioty roślin terenów trudnych w witalności i oporności;
c) Bezpośrednie i pośrednie oddziaływanie symbiontów grzybowych na roślinę zwiększające przystosowanie gospodarza do środowiska wegetacji. Bezpośrednie oddziaływanie polega na indukcji zmian w metabolizmie gospodarza zwiększających przystosowanie do środowiska, pośrednie natomiast na uczestnictwie w procesach glebotwórczych i detoksykacji podłoża;
d) Rola czynników abiotycznych (przede wszystkim zanieczyszczenia środowiska) w determinacji mutualistycznych interakcji pomiędzy roślinami i endofitami grzybowymi;
e) Możliwość wykorzystania wyselekcjonowanych mikroorganizmów o wysokiej oporności na zanieczyszczenia w fitoremediacji/fitoekstrakcji oraz w rolnictwie.

Badania dotyczące ww. zagadnień są kontynuowane w ramach projektów: ERA-NET "Agronickel" (FACCE SURPLUS/I/ AGRONICKEL/02/2016, NCBiR) oraz **„Rola grzybów endofitycznych w odporności *Arabidopsis arenosa* na wysoką zawartości metali toksycznych"** (Projekt NCN OPUS: 2017/27/B/NZ8/01199) realizowanych przez grupę badawczą Interakcji Roślin z Mikroorganizmami INOŚ UJ oraz grupy o tej samej nazwie z MCB UJ, której jestem kierownikiem od 2017 r.

Prace stanowiące osiągnięcie habilitacyjne: „Jak symbioza zmienia roślinę? Mechanizmy dostosowania roślin do symbiozy z grzybami endofitycznymi" dotyczą trzech aspektów symbiozy roślin i grzybów endofitycznych:

a) Udziału endofitów grzybowych w dostosowaniu roślin do bytowania w środowiskach o wysokiej zawartości metali potencjalnie toksycznych w podłożu;
b) Mechanizmów determinujących mutualistyczny charakter interakcji roślina-grzyb endofityczny;
c) Mechanizmów indukcji produkcji biomasy roślin symbiotycznych przez mikroorganizmy, ze szczególnym naciskiem na oddziaływanie endosymbionta na asymilację węgla i fotosyntezę.

Wstęp

Rośliny wykształciły liczne przystosowania do zasiedlania środowisk naturalnie i antropogenicznie zanieczyszczonych metalami. Najlepiej dostosowanymi do życia w tych warunkach są metalofity i hiperakumulatory metali, szczególnie licznie reprezentowane w rodzinie *Brassicaceae*. Rośliny te posiadają niezwykłą zdolność tolerowania wysokich, potencjalnie toksycznych stężeń metali w podłożu. Mechanizmy umożliwiające bytowanie roślinom w zanieczyszczonym środowisku były przedmiotem licznych opracowań (Verbruggen i in., 2009; Ali i in., 2013; DalCorso i in., 2013; van der Ent i in., 2013). W ostatnich latach badania zagadnień opisujących rolę mikrobioty roślin w oporności na metale znalazły się w centrum zainteresowania biologów roślin i specjalistów w zakresie mikrobiologii środowiskowej (Zahoor i in., 2017; Zhou i in., 2018).

Wśród mikroorganizmów grzybowych najlepiej opisanych w kontekście przystosowania roślin do skażenia metalami są grzyby mykoryzowe, które były przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań (Rozpadek i in., 2014; Ruytinx i in., 2016; Rozpądek i in., 2017; Wężowicz i in., 2017). Grzyby mykoryzowe, odgrywają istotną rolę w przystosowaniu roślin do środowiska życia i bezsprzecznie stanowią atrakcyjną alternatywę dla tradycyjnego nawożenia fosforanami. Badania ostatnich lat wykazały, że istnieje jeszcze jedna grupa symbiotycznych mikroorganizmów, które powszechnie wchodzą w interakcje z roślinami: endofity grzybowe (Shi i in., 2017, Deng i in.2013). Endofity posiadają cechy, które zadecydowały o wykorzystaniu tej grupy organizmów w prowadzonych przeze mnie badaniach. Jedną z nich jest zdolność nawiązywania interakcji z uznanymi za niemykoryzowe roślinami z rodziny *Brassicaceae* co znacząco ułatwia badanie mechanizmów symbiozy pomiędzy roślinami a grzybami endofitycznymi (Hiruma i in., 2018). Dodatkowo, grzyby te są łatwiejsze w hodowli w porównaniu z grzybami mykoryzowymi. Ma to niebagatelne znaczenie w procesie produkcji szczepionek stosowanych w rolnictwie i remediacji.

Endofity są zróżnicowaną taksonomicznie grupą grzybów bytujących fakultatywnie lub obligatoryjnie w roślinach, najczęściej nie ujawniając swojej obecności (Rodriguez i in., 2009).

Niektórzy przedstawiciele tej grupy mogą pozytywnie oddziaływać na gospodarza przyspieszając jego wzrost i/lub przystosowanie do środowiska dzięki zwiększeniu poboru wody i nutrientów z podłoża. Mogą również aktywować produkcję związków o charakterze obronnym oraz regulatory wzrostu przez rośliny (ewentualnie grzyby endofityczne produkują je samodzielnie) (Schulz, 2006; Johnson i in., 2013). Dostępność opracowań dotyczących oddziaływania endofita na mechanizmy prowadzące do zwiększania odporności roślin na metale jest ograniczona. Dotyczy to zarówno mechanizmów modulacji odpowiedzi rośliny na stres, jak również konkretnych aspektów jej odporności/oporności, na które bezpośrednio oddziałuje endofit. Dotychczas, stosunkowo obszernie opisano udział mikroorganizmów grzybowych w poborze przez roślinę metali ze środowiska. Rośliny symbiotyczne, w zależności od gatunku mogą wydajniej akumulować metale lub ograniczać ich pobór (Janoušková i in., 2005; Bhargava i in., 2012; Gupta i Joia, 2016). Pokazano również charakterystyczne dla roślin symbiotycznych zmiany w dystrybucji metali w obrębie rośliny (translokacja z korzeni do pędów) oraz aktywację roślinnych mechanizmów neutralizacji toksyczności metali (Deng i in., 2013; Khan i in., 2017; Zahoor i in., 2017). Niewiele wiadomo na temat mechanizmów umożliwiających symbiotycznej roślinie optymalizację dystrybucji metali w obrębie swoich tkanek/komórek.

Oddziaływanie mikroorganizmów na gospodarkę NPK oraz pobór wody ze środowiska było przedmiotem licznych opracowań, w których ponad wszelką wątpliwość wykazano jego pozytywny charakter (Van Der Heijden i in., 2008; Hiruma i in., 2016; Chhabra i Dowling, 2017). Ma to szczególne znacznie w ekosystemach zdegradowanych i/lub metalonośnych, które zazwyczaj charakteryzują się niską zasobnością/dostępnością nutrientów i wody (Kidd i in., 2018). W tym przypadku, dostępna wiedza na temat aktywowanych grzybem mechanizmów zwiększających wydajność poboru wody i nutrientów z podłoża jest znikoma. Innym, niezwykle ciekawym aspektem interakcji roślin z mikroorganizmami jest **oddziaływanie mikrobów na metabolizm pierwotny gospodarza, a w szczególności na fotosyntezę**. Istnieją doniesienia dotyczące pozytywnego oddziaływania symbiontów roślin na ten istotny aspekt metabolizmu roślin (Spiering i in., 2006; Wężowicz i in., 2017). Wydaje się, że **badanie zagadnień związanych ze zwiększeniem wydajności fotosyntezy u symbiotycznych roślin może mieć szczególne znaczenie w przybliżeniu nas do zrozumienia mechanizmów przyspieszenia produkcji biomasy roślin przez mikroorganizmy i istoty symbiozy roślina - endosymbiont.** Zwiększenie zapotrzebowania na węglowodany, wynikające z przyspieszanego wzrostu rośliny i konieczności zaopatrzenia endofita w zredukowany węgiel prowadzi do zwiększenia wydajności fotosyntezy i asymilacji węgla. **Również w tym przypadku, mechanizm aktywujący ww. zmiany jest nieznany**.

7. Omówienie wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

Pierwszą pracą cyklu jest opublikowany w Journal of Basic Microbiology w 2018 r. artykuł: **"*Mucor* sp.-an endophyte of Brassicaceae capable of surviving in toxic metal-rich sites"**. Głównym celem pracy było wyselekcjonowanie mikroorganizmu, który posłużył do dalszych badań nad mechanizmami symbiozy roślina-grzyb oraz opracowanie instrumentarium niezbędnego do weryfikacji i opisu kolonizacji rośliny przez endosymbionta. Dodatkowo, w publikacji opisaliśmy mykobiotę endofityczną *Arabidopsis arenosa* pochodzącej z hałdy ZG „Bolesław" w pobliżu Olkusza w województwie małopolskim (50°16′58″N 19°32′9″E). Z roślin wyizolowaliśmy jedenaście endosymbiotów grzybowych, z których wybrano szczep *Mucor* (KU234656, UNIJAG.PL.E50) do dalszych badań. Szczep ten wykazywał 100% podobieństwo sekwencji ITS i NUC-LSU do *Mucor plumbeus* i *M. racemosus*. Identyfikacja na podstawie cech morfologicznych dała podobne rezultaty. *Mucor* sp. jest przedstawicielem z podgromady Mucoromycotina. Przedstawiciele tej grupy według najnowszych danych tworzyły mutualistyczne związki z wymarłymi wątrobowcami, glewikami i widłakami (Field i in., 2015, 2016). Zbadaliśmy oporność grzyba na toksyczność metali oraz potwierdziliśmy pozytywne oddziaływanie *Mucor* sp. na wzrost *A. arenosa* w warunkach zwiększonej zawartości metali w podłożu oraz innych hiperakumulatorów metali i metalofitów, z rodziny Brassicaceae, a także rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*. Dzięki opracowaniu metody ilościowej oceny grzybni w roślinie, z wykorzystaniem techniki *q*PCR oraz wygenerowanego szczepu *Mucor* sp. znakowanego (ekspresjonującego) zielone białko fluorescencji (*ang. GFP- green fluorescent protein*), opisaliśmy mechanizm kolonizacji rośliny przez grzyba. Wyniki te, w zestawieniu z analizą globalnej ekspresji genów (Agilent single color microaray, US) udowodniły istnienie związku pomiędzy dynamiką kolonizacji rośliny, a zmianami w ekspresji mechanizmów obronnych gospodarza.

Dalsza charakterystyka interakcji roślina-grzyb oraz rola wybranego endofita (*Mucor* sp.) w adaptacji *A. arenosa* do wegetacji na hałdzie pogórniczej opisana została w artykule zatytułowanym: **„How does the endophytic fungus *Mucor* sp. improve *Arabidopsis arenosa* vegetation in the degraded environment of a mine dump?"** Badania, które przeprowadziłem potwierdziły pozytywne oddziaływanie grzyba na wzrost rośliny w podłożu z hałdy (stężenia Pb, Zn, Cd i Fe przekraczające dopuszczalne normy). Rośliny inokulowane *Mucor* sp. (E+) były większe w porównaniu z roślinami nieinokulowanymi (E-), a stężenia hormonów związanych z reakcją na stres: kwasu abscysynowego (ABA), kwasu jasmonowego (JA) i kwasu salicylowego (SA) były u roślin E+ znacząco niższe. Cechy te świadczyły o **ochronnej roli endofita**. Jednym z aspektów fizjologii rośliny warunkującym zwiększone dostosowanie było oddziaływanie

endosymbionta na pobór i dystrybucję metali z podłoża. **Wykazałem, że rośliny E+ akumulują mniej Zn i Fe w swoich tkankach i wydajniej transportują te metale, jak również Cd do części nadziemnych**. Analiza transkryptomu *A. arenosa* (E+) (Agilent single color microaray, US), potwierdzona *q*PCR pozwoliła wytypować gen *pcr2 (plant cadium resistance 2)*, jako potencjalnie odpowiedzialny za zwiększoną translokację metali z korzeni do pędów. **Badania, które przeprowadziłem sugerują, że w trakcie interakcji roślina-grzyb endofityczny gospodarz optymalizuje dystrybucję metali w swoich tkankach poprzez aktywację ekspresji określonych transporterów metali**. Dodatkowo wyselekcjonowałem szereg innych genów związanych z metabolizmem i dystrybucją metali w obrębie rośliny, potencjalnie związanych z grzybo-zależnym dostosowaniem do środowiska. Przypuszczalnie ich ekspresja indukowana była przez aktywowaną przez mikroorganizm produkcję etylenu (ET) lub interferencją w sygnalizację aktywowaną ET. Wyniki te stały się podstawą obecnie realizowanego przeze mnie w charakterze kierownika projektu badawczego: **„Rola grzybów endofitycznych w odporności *Arabidopsis arenosa* na wysoką zawartości metali toksycznych"** (NCN OPUS 2017/27/B/NZ8/01199). Część badań nad zmianami w poborze i dystrybucji metali w obrębie tkanek i przedziałów komórkowych w roślinie była prowadzona podczas miesięcznego stażu, w Core Facility of Cell Imaging and Ultrastructure Research Uniwersytetu Wiedeńskiego, finansowanego przez stypendium OEAD, którego byłem beneficjentem. Dalsza współpraca planowana jest w okresie 2018 - 2020.

Innym aspektem zwiększonego dostosowania *A. arenosa* do wysokiego stężenia metali w podłożu było oddziaływanie endofita na gospodarkę fosforową gospodarza. Rośliny inokulowane badanym szczepem grzyba (E+) pobierały fosfor z podłoża wydajniej niż E . Udział grzybów symbiotycznych w zwiększeniu poboru fosforu był opisywany już wcześniej przez innych autorów (Hiruma i in.2016). Nowym aspektem opisanego przeze mnie zjawiska był domniemany mechanizm zwiększonego poboru fosforu. Z przeprowadzonych badań wynika, że *Mucor* sp. w warunkach niskiej zawartości P w podłożu, zwiększał natężenie PSR (*ang. phosphate starvation response*) u gospodarza, co pozwalało roślinie lepiej przystosować się do warunków uprawy. Co ciekawe, analiza transkryptomu wykazała, że jednym z genów, których ekspresja jest aktywowana pod wpływem *Mucor* sp. jest PAP12 (*ang. purple phosphatase 12*) kodująca **kwaśną fosfatazę, wydzielaną z korzenia i uwalniającą P ze źródeł organicznych.** Do tej pory opisywano, że grzyby endofityczne zwiększają pobór P z podłoża poprzez bezpośredni transfer z grzybni do komórek korzenia (Hiruma i in.2016). Innym ważnym aspektem zwiększonego poboru P przez E+ *A. arenosa* było zwiększenie powierzchni chłonnej korzenia dzięki wydłużeniu włośników korzeniowych. Mogło to mieć również związek z PSR, ale co ciekawe, w przeciwieństwie do opisywanego wcześniej oddziaływania endofitów na proces wydłużania komórek włośnikowych (Harman i in., 2004; Contreras-Cornejo i in., 2009), **przeprowadzone**

badania każą zakwestionować udział auksyny produkowanej przez grzyba w tym procesie. Pomimo tego, że *Mucor* sp. posiadał zdolność produkcji IAA (kwas indolilooctowy) w kulturze, badania z wykorzystaniem mutantów insercyjnych (Alonso i in.2003), z upośledzonym transportem lub sygnalizacją auksynową (*tir1*, *eir1*, *aux5-1*, *axr1-7*) oraz linii transgenicznych ekspresjonujących GFP pod syntetycznym promotorem auksynowym DR5 wykazały, że mechanizm wydłużania włośników *Arabidopsis* nie jest aktywowany IAA produkowanym przez endofita. Wydaje się również, że rola fitohormonów produkowanych przez grzyby endofityczne może nie być bezpośrednim czynnikiem zwiększającym produktywność roślin. Problemy te stały się przedmiotem obecnie złożonego wniosku o finansowanie projektu badawczego: **„Mechanizmy oddziaływania roślin z grzybami endofitycznymi. Oddziaływanie na gospodarkę fosforową rośliny" (NCN OPUS 2018/29/B/NZ9/01679).** Przeprowadzone badania stały się również podstawą do podjęcia pracy nad innymi zagadnieniami dotyczącymi roli endofitów grzybowych w zwiększeniu produkcji biomasy roślin, a w szczególności nad oddziaływaniem mikroorganizmów na metabolizm pierwotny i fotosyntezę. Pierwsza praca z tego cyklu **"The endophyte *Epichloë typhina* improves photosynthesis efficiency of its host orchard grass (*Dactylis glomerata*)"**, była opublikowana wcześniej, w 2015 roku i stanowiła podstawę do badań nad ww. zagadnieniem.

Epichloë typhina jest grzybem endofitycznym z grupy Clavicipitaceae (C), powszechnie występującym w symbiozie z roślinami z rodziny Poaceae. Z obszernej bibliografii dotyczącej interakcji traw z C endofitami wiadomo, że grzyby te produkują i/lub stymulują roślinę gospodarza do produkcji repelentów (głównie alkaloidów), zwiększając tym samym odporność rośliny przeciwko roślinożercom. Ma to wymierne, negatywne skutki w produkcji rolnej, przede wszystkim w produkcji nabiału; zwierzęta wypasane na pastwiskach zarażonych szczepami grzybów produkującym toksyczne alkaloidy zapadają na choroby neurologiczne, a nabiał nie spełnia kryteriów jakości dopuszczających do obrotu handlowego (Christensen i in., 2002, 2008; Morse i in., 2002; Czarnoleski i in., 2012; Bastias i in., 2017). Dodatkowo, udowodniono, że wyselekcjonowane szczepy, zarówno *Epichloë* jak i formy niedoskonałej tego grzyba, zaliczanych do rodzaju *Neotyphodium* mogą skutecznie przyspieszać wzrost rośliny. W związku z tym, podejmowane są próby wykorzystania wyselekcjonowanych szczepów endofitów z rodzaju *Epichloë/Neotyphodium* jako biologicznych środków ochrony roślin i biostymulatorów wzrostu (Johnson i in.2013). Mechanizm warunkowanego grzybem przyspieszonego wzrostu traw **nie jest znany**. W artykule **"The fungal endophyte *Epichloë typhina* improves photosynthesis efficiency of its host orchard grass (*Dactylis glomerata*)"**, opisano oddziaływanie *Epichloë typhina* na funkcjonowanie i skład białkowo-barwnikowy aparatu fotosyntetycznego. Celem przeprowadzonych badań była weryfikacja następującej hipotezy: symbioza roślina-grzyb wymusza zwiększenie wydajności fotosyntezy rośliny. Jest to niezbędne dla optymalnego

zaopatrzenia rośliny i endofita w zredukowane związki węgla w warunkach ich zwiększonego zapotrzebowania. Zmianom funkcjonalnym towarzyszą modyfikacje na poziomie struktury aparatu fotosyntetycznego manifestujące się optymalizacją liczby, jak również relacji ilościowych pomiędzy barwnikami i białkami fotosystemów oraz kompleksów zbierających światło. Przeprowadziłem kompleksową analizę wydajności przepływu elektronów przez PSII (fotosystem II, *ang. photosystem II*) z wykorzystaniem metody fluorymetrycznej (*ang. PAM-Pulse Amplitude Modulation*) i analizę wydajności asymilacji węgla i transpiracji z zastosowaniem wymiany gazowej w podczerwieni (LiCor, NL). Zawartość białek i barwników aparatu fotosyntetycznego została zmierzona odpowiednio przy pomocy techniki Western blot i metodą spektrofotometryczną. Uzyskane wyniki potwierdziły publikowane wcześniej dane dotyczące przyspieszenia wzrostu roślin przez endofit, jak również pozytywnego oddziaływania symbionta na wydajność fotosyntezy (Marks i Clay, 1996). Przeprowadzone przeze mnie badania pozwoliły stwierdzić, że zarówno światło zależna produkcja ATP i NADPH w fazie jasnej fotosyntezy, jak również wydajność asymilacji węgla w cyklu Calvina były większe u roślin symbiotycznych. Analiza zawartości białek strukturalnych związanych z PSII (D1 oraz LHCb3), PSI (PsaC i LHCa2) oraz dużej podjednostki Rubisco (*LSU ang. Large Subunit*) potwierdziła, że zwiększeniu wydajności fotosyntezy towarzyszy zwiększona synteza białek odpowiedzialnych za przepływ elektronów w fotosystemach i asymilację węgla. Dodatkowo, u roślin symbiotycznych zawartość chlorofilu *b*, uczestniczącego m. in. w asocjacji białek PS, przede wszystkim PSII była zwiększona. Sugeruje to, że **jednym z mechanizmów aktywowanych obecnością symbionta grzybowego, umożliwiających dostosowanie do zwiększonego zapotrzebowania na energię jest aktywacja syntezy białek i barwników związanych z percepcją i przetwarzaniem energii słonecznej**, co umożliwia zwiększenie wydajności produkcji związków wysokoenergetycznych. Ciekawe w tym kontekście są mechanizmy indukcji opisanych adaptacji; rola w tym procesie zwiększonego poboru nutrientów i wody z podłoża i możliwość relokacji/optymalizacji dystrybucji zasobów u symbiotycznych roślin, dzięki domniemanemu przejęciu funkcji obronnych przez endofita (produkcja przeciw żywieniowych alkaloidów). Do dalszych badań nad mechanizmami prowadzącymi do przyspieszenia wzrostu roślin przez grzyby endofityczne, a konkretnie nad oddziaływaniem grzybów symbiotycznych na fotosyntezę i metabolizm podstawowy roślin postanowiłem posłużyć się modelem *Arabidopsis arenosa/Arabidopsis thaliana-Mucor* sp. Przeprowadzone doświadczenia zostały zaprojektowane tak, aby 1) zweryfikować rolę zwiększonej aprowizacji, co było sugerowane przez Kaschuk i in.(2009) jako czynnik bezpośrednio oddziaływujący na metabolizm pierwotny rośliny, 2) zminimalizować oddziaływanie czynników biotycznych i abiotycznych na funkcjonowanie roślin. W pracy pod tytułem: **" Acclimation of the photosynthetic apparatus and alterations in sugar metabolism in response to inoculation with endophytic fungi"** wykorzystałem organizmy: roślinę i grzyb

należące do odległych filogenetycznie jednostek taksonomicznych w porównaniu do modelu *Dactylis glomerata-Epichloë typhina*. Pozwoliło to wyselekcjonować i skupić się na mechanizmach uniwersalnych dla interakcji roślina-grzyb endofityczny. Wśród zmian w metabolizmie *D. glomerata* warunkowanych obecnością endosymbionta, których nie udało się potwierdzić w nowym modelu była zwiększona aktywność dehydrogenazy NADPH (NADPH-MDH *ang. NADPH-malate dehydrogenase*), zmieniona kinetyka aktywacji procesu wygaszania niefotochemicznego (*NPQ ang. Non-Photochemical Quenching*) oraz zmiany w stosunku chlorofilu *a* do *b* u symbiotycznych roślin. Aktywność NADPH-MDH warunkuje stan redoks i pH stromy tylakoidów dzięki aktywnemu eksportowi jonów H^+ przez błonę tylakoidów za pomocą kwasu jabłkowego, w mechanizmie opisywanym jako *ang.* „*malate valve*" (Scheibe i in., 1990; Scheibe, 2004). Opisane zjawisko jest o tyle ciekawe, że przypuszczalnie eksport kwasów organicznych z wnętrza tylakoidów i zmiany w stężeniu jonów H^+ mogą być jednym z sygnałów uczestniczących w reorganizacji aparatu fotosyntetycznego pod wpływem symbiotycznego grzyba. Potwierdzenie tych przypuszczeń wymaga jednak dalszych badań.

W doświadczeniach dotyczących oddziaływania *Mucor* sp. na fotosyntezę roślin z rodzaju *Arabidopsis* potwierdziłem pozytywny wpływ endosymbionta na wzrost i wydajność fotosyntezy. Przeprowadzone badania pozwoliły wykluczyć, że efekt wzrostowy i zwiększona asymilacja węgla wynikają ze zwiększonego poboru wody i nutrientów przez inokulowaną roślinę. Rośliny prowadzone były w uprawie o optymalnym zaopatrzeniu w wodę i N,P,K w warunkach kontrolowanych (zminimalizowana ekspozycja na niekorzystne bodźce biotyczne i abiotyczne, kontrola inokulacji dzięki zastosowaniu kultur *in vitro* i grzyba znakowanego GFP). Na podstawie globalnej analizy ekspresji genów wykazałem, że ekspresja ponad 50 genów związanych z różnymi aspektami fotosyntezy (m. in. przepływ elektronów przez fotosystemy, percepcja światła, asymilacja węgla) jest aktywowana u inokulowanych endofitem *A. thaliana*. Dane uzyskane metodą mikromacierzy (Agilent single color microaray, US), zweryfikowano za pomocą Western blot u *A. arenosa* i *A. thaliana* na różnych etapach rozwoju osobniczego, dowodząc trwałości oddziaływania mikroorganizmu na aparat fotosyntetyczny gospodarza. Przeprowadzone badania są pierwszą, tak kompleksową analizą zmian w kompozycji białek fotosystemów pod wpływem mikroorganizmu symbiotycznego i mogą posłużyć do dalszych badań dotyczących roli pojedynczych białek i plastyczności całego aparatu w procesie przetwarzania energii świetlnej w chemiczną.

Na podstawie przeprowadzonych badań podjąłem próbę wyjaśnienia mechanizmów zmian adaptacyjnych w kompozycji białkowej PSII i PSI prowadzących do zwiększenia wydajności fotosyntezy. Na podstawie analizy transkryptomu stwierdziłem, że u rośliny inokulowanej badanym szczepem *Mucor* doszło do aktywacji ekspresji licznych genów związanych z

niedoborem sacharozy i odpowiedzią na głodzenie (*ang. Gene Onthology term: response to sucrose starvation)*, metabolizmem cukrów, a przede wszystkim ich katabolizmem *(ang. Gene Onthology term: carbohydrate metabolic proces*), a także licznych transporterów cukrów odpowiedzialnych za dystrybucję produktów fotosyntezy w obrębie rośliny. Obecność symbionta grzybowego wpłynęła również na rozmiar ziaren skrobi, znacząco je zmniejszając. Przedstawione wyniki obrazują zmiany, jakie zachodzą w relacji pomiędzy popytem, a podażą (*ang. sink-source relationship*) substancji odżywczych w roślinie symbiotycznej i sugerują, że zmiany w wydajności aparatu fotosyntetycznego mogą wynikać ze zwiększonego zapotrzebowania na fotoasymilaty u E+ *Arabidopsis*. Przeprowadzone badania pozwoliły sformułować następującą hipotezę: zwiększenie popytu (*ang. sink*) na węglowodany u roślin symbiotycznych jest sygnałem prowadzącym do reorganizacji aparatu fotosyntetycznego, której celem jest zwiększenie asymilacji węgla w fotosyntezie. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa układ kinaz białkowych SnRK1 (*ang. **S**NF **P**rotein **K**inase 1*) i TOR (*ang. **T**olerant to **R**apamycin*). Kinazy te zostały wyczerpująco opisane przez Baena-González i Hanson, (2017). Weryfikacja tej hipotezy jest przedmiotem aktualnie prowadzonych badań.

Przypuszcza się, że przodkami mutualistycznych endofitów są patogeny grzybowe. Odpowiedź rośliny na kolonizację przez endofity grzybowe, w wielu aspektach przypomina odpowiedź na organizm pasożytniczy. Ponadto, endofit może zmienić tryb życia na pasożytniczy w warunkach stresu środowiskowego lub innych okoliczności oddziałujących na homeostazę metaboliczną symbiozy. Zależności te znakomicie opisuje teoria „ciągłości endofit-pasożyt" (*ang. endophyte-parasite continuum*) (Schulz i Boyle, 2005). U *Arabidopsis* pod wpływem *Mucor* sp. zaobserwowano również cechy charakterystyczne dla interakcji roślin z pasożytami. Jedną z nich była reorganizacja przepływu węglowodanów ze źródła (*ang. source*) do miejsca wykorzystania (*ang. sink*).

Tematem kolejnej pracy cyklu zatytułowanej: **"The role of strigolactone in the cross-talk between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Mucor* sp."** była rola hormonu roślinnego strigolaktonu (SL) w determinacji mutualizmu u grzybów endofitycznych. Według hipotezy, którą zaproponowałem SL jest czynnikiem uczestniczącym w indukcji trybu mutualistycznego u grzybów potencjalnie endofitycznych. Dodatkowo, zweryfikowaliśmy istnienie funkcjonalnego związku pomiędzy SL, a mechanizmami obronnymi związanymi z kwasem salicylowym (SA) i kwasem jasmonowym (JA). Według (Lahrmann i in., 2015), fitohormony JA i SA pełnią ważną rolę w kształtowaniu się interakcji roślina-endofit. Badania przeprowadziłem w kulturach *in vitro* z wykorzystaniem mutantów insercyjnych *A. thaliana* o silnie zredukowanej syntezie SL *max1* (*ang. more axillary growth 1*) i *max4* (*ang. more axillary growth 4*) oraz *max2* (*ang. more axillary growth 2*) upośledzonego w transdukcji sygnału

zależnego od SL. Mutanty *max1* i *max4*, w przeciwieństwie do *max2* nie były zdolne do wykształcenia fenotypu wzrostowego po inokulacji grzybem. Ich wzrost był znacząco ograniczony przez mikroorganizm. Traktowanie grzyba syntetycznym analogiem SL GR24 (StrigoLab, I) w kulturze, powodowało znaczące hamowanie wzrostu kolonii. Przedstawione wyniki sugerowały, że SL jako czynnik oddziałujący hamująco na ekspansję grzybni jest niezbędny w procesie interakcji mutualistycznej pomiędzy *A. thaliana* a *Mucor* sp. Zaproponowano, że inhibicja wzrostu grzyba przez SL może mieć związek z oddziaływaniem na metabolizm reaktywnych form tlenu (RFT). Dodatkowo, badania z wykorzystaniem fluorescencyjnego analogu SL GR24 - GR24 BODIPY (StrigoLab, I) wykazały, że *Mucor* sp. posiada zdolność dekomponowania SL w kulturze, a co najważniejsze, degraduje hormon *in planta*, z czego wynika, że podczas interakcji roślina-endofit, roślina oddziałuje na mikroorganizm za pośrednictwem SL, natomiast grzyb posiada zdolność regulacji zawartości SL w roślinie przez grzyba. Może to być próba przeciwdziałania hamującemu wpływowi SL na wzrost mikroorganizmu lub być związane z mechanizmem percepcji SL przez grzyba. U roślin inicjacja sygnału zależnego od SL warunkowana jest hydrolizą hormonu przez D14: nietypowy receptor α/β hydrolizujący. Hydroliza SL determinuje jego biologiczną funkcję (Watters i in.2017). Nie można wykluczyć, że percepcja SL u grzybów endofitycznych odbywa się według podobnego mechanizmu. Potwierdzenie tego przypuszczenia wymaga jednak dalszych badań. Przeprowadzone badania ujawniły dodatkową drogę regulacji metabolizmu SL rośliny gospodarza przez *Mucor* sp. Ekspresja genów związanych z biosyntezą tego hormonu (*cyp711A*, *ccd8*, *D27*) była wyraźnie obniżona u inokulowanych siewek. Zaobserwowane zjawisko ma szczególne znaczenie w kontekście ekspansji roślin pasożytniczych z rodzajów *Orobanche*, *Striga* i *Phelipanche*. SL jest czynnikiem inicjującym kiełkowanie tych roślin i nie można wykluczyć, że utrata bioróżnorodności mikroorganizmów gleb przyczyniła się do zwiększonej dostępności SL. Związek pomiędzy SL, a SA i JA był badany poprzez pomiar stężenia tych dwóch hormonów w mutantach *max1,4* i *max2* i porównanie stężenia JA i SA po inokulacji oraz badanie ekspresji genów efektorowych. Na podstawie uzyskanych wyników dowiedziono, że SL nie wpływa na JA. Istnieje natomiast duże prawdopodobieństwo, związku pomiędzy SL i SA. Relacja ta jest niejednoznaczna i wymaga dalszych badań, ale wydaje się, że SL był niezbędny do aktywacji produkcji SA podczas interakcji *A. thaliana* z *Mucor* sp. Analiza ekspresji genów związanych z obronną przeciw drobnoustrojom tj. *pr2*, *pr5*, *pr3*, *pdf1.2* wykazała wyraźny wzrost ekspresji wymienionych genów u *max1* i *max4* po inokulacji *Mucor* sp. Oznacza to, że SL uczestniczy w hamowaniu reakcji obronnej w interakcji mutualistycznej; hamowanie reakcji obronnej w stabilizacji interakcji *A. thaliana* z *Piriformospora indica* jako jeden z etapów kształtowania się mutualizmu był opisywany przez innych autorów (Stein i in., 2008; Nongbri i in., 2012). Przeprowadzone badania sugerują, że SL może uczestniczyć w tym mechanizmie, ale

nie przez oddziaływanie na pulę JA. Nie można wykluczyć, że reakcja obronna obserwowana u mutantów niesyntetyzujących SL wynika z oddziaływania SL (a właściwie jego braku) na mikroorganizm. Wyniki opublikowane w omawianym artykule nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytania dotyczące udziału SL w mechanizmach obronnych roślin angażowanych w symbiozie z grzybami endofitycznymi, pozwalają natomiast stwierdzić, że czynnik ten jest niezbędny w komunikacji roślina-endofit i determinacji symbiozy.

Opublikowane badania ukazują w sposób jednoznaczny rolę grzybów endofitycznych w wegetacji oraz były pierwszym krokiem do opisania ich roli w adaptacji roślin do bytowania w siedliskach zanieczyszczonych metalami.

Wyniki opisanych powyżej badań zostały opublikowane w postaci dziesięciu doniesień konferencyjnych (plakatów i referatów) oraz dysertacji doktorskiej Pani mgr Agnieszki Domki zatytułowanej „The characterization of the plant-endophytic fungi interaction. New insights from the *Arabidopsis-Mucor* sp. model" przygotowanej w Instytucie Nauk o Środowisku pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Turnau oraz przy moim udziale jako promotora pomocniczego.

8. Omówienie pozostałych prac naukowo-badawczych

Studia magisterskie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ ukończyłem w 2007 roku. Pracę magisterską wykonałem w Zakładzie Cytologii i Histologii Instytutu Zoologii pod kierunkiem dr Andrzeja Fiertaka. Badania te dotyczyły regulacji okołodobowej rytmiki ekspresji glikokoniugatów i białka mPER1 w komórkach Panetha myszy. W pracy opisałem rolę sygnałów metabolicznych uczestniczących w regulacji okołodobowej rytmiki funkcji wydzielniczej komórek nabłonka jelita cienkiego. Na podstawie uzyskanych wyników udowadnialiśmy istnienie automatyzmu funkcji komórek oraz obecności niezależnego od centralnego zegara biologicznego, oscylatora wewnątrz komórek Panetha generującego endogenne rytmy kierujące ich pracą. Do badania produkcji glikokoniugatów i ekspresji białka mPER1 w komórkach Panetha jelita cienkiego myszy wykorzystywałem techniki histochemiczne, immunohistochemiczne i mikroskopię konfokalną. Wyniki badań prezentowane były na konferencji: Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism (2007) w postaci plakatu.

W 2007 roku rozpocząłem pracę w Zakładzie Biologii Stresu, Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie. Zajmowałem się następującymi zagadnieniami:

a) Regulacja równowagi redoks w komórkach roślinnych;
b) Fotosynteza tkanek bezzieleniowych;

c) Mechanizmy indukcji zmian w metabolizmie fotosyntetycznym (C3-CAM i *vice versa*) inicjowane czynnikami biotycznymi i abiotycznymi.

Stopień doktora otrzymałem w 2011 r. Badania, które stały się podstawą mojej pracy doktorskiej były finansowane w ramach projektów: „Opracowanie metody ozonowania warzyw z rodziny Brassicaceae w celu podwyższenia ich odporności globalnej, zawartości naturalnych antyoksydantów oraz stabilizacji jakości plonu w trakcie przechowywania" (NCBiR R1204502) oraz grantu promotorskiego: **„Wpływ ozonowania siewek *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba* na system antyoksydacyjny"** (NCN NN 310 453 438). Celem projektu była weryfikacja możliwości wykorzystania fumigacji ozonem siewek kapustnych do zwiększenia ich odporności na stres środowiskowy. Doświadczenia, które wykonywałem skupiały się na indukcji długotrwałej tolerancji krzyżowej u roślin. Manifestacją tego zjawiska był przyspieszony wzrost i obserwowane po kilkunastu tygodniach zwiększenie zawartości i aktywności wybranych elementów układu antyoksydacyjnego u roślin traktowanych ozonem w stadium siewki. Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w postaci dwóch artykułów: **"Ozone fumigation increases the abundance of nutrients in Brassica vegetables: broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Chinese cabbage (*Brassica pekinensis*)"** w European Food Research and Technology oraz **"Ozone fumigation results in accelerated growth and persistent changes in the antioxidant system of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *alba*"** w Journal of Plant Physiology oraz zgłoszenia patentowego: **10213494001 "Plant treatment method and means thereof"**. Najważniejszym osiągnięciem naukowym wynikającym z opublikowanych prac było wykazanie istnienia związku pomiędzy potencjałem antyoksydacyjnym (rozumianym jako aktywność wybranych elementów tego systemu) a stresem, którego roślina doświadcza na przestrzeni życia osobniczego. Z przeprowadzonych badań wynika, że krótkotrwałe skutki zmian w równowadze redoks mają permanentny charakter. Wiąże się to możliwością hartowania roślin łagodnym stresem w stadium młodocianym w celu zwiększenia odporności na stresy środowiskowe. W trakcie prowadzonych badań opanowałem podstawowe instrumentarium niezbędne do prowadzenia badań z zakresu proteomiki i chemii organicznej (elektroforeza, eletroforeza 2D, chromatografia cieczowa), biologii molekularnej (PCR, *q*PCR, klonownie molekularne, wyciszanie genów metodą RNAi), jak również metodologię prowadzenia badań w naukach rolniczych. W 2010 Moja praca nad zagadnieniami związanymi **„Regulacją równowagi redoksowej w tkankach asymilacyjnych liści"** została wyróżniona przez Komisję Nagród Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych PAN z rekomendacji Komitetu Fizjologii, Genetyki i Hodowli Roślin PAN.

W tym samym czasie byłem zaangażowany w badania nad fotosyntezą tkanek bezzieleniowych w ramach projektu nt. „Czemu wiązki przewodzące są bardziej odporne na stres

biotyczny od komórek mezofilu?" (NCN 2011/01/B/N29/02540). W ramach prowadzonych badań odbyłem trzy krótkoterminowe staże: dwa w Instytucie Julius Kuhn w Darmstadt, Niemcy, gdzie badałem wydajność przepływu elektronów w fotosystemie II (PSII) i fotosystemie I (PSI) w tkance okołowiązkowej i mezofilu liściowym *Mesembryanthemum crystallinum* o różnym typie fotosyntezy: C3 i CAM. W badaniach wykorzystywałem metodę fluorescencyjną (modulowana fluorescencja chlorofilu *a*) i transmisję IR. Ultrastrukturę chloroplastów w przedstawionym powyżej modelu badałem na Uniwersytecie Karola Franciszka w Graz (A). Wyniki prac zostały opublikowane w trzech publikacjach w czasopismach Annals of Botany i Journal of Plant Physiology.

W 2012 roku zostałem zatrudniony jako asystent w Zakładzie Interakcji Roślin z Mikroorganizmami INOŚ UJ jako główny wykonawca w projekcie „Endofity roślin jako nowe narzędzie fitoremediacji" (NCN DEW-2011/02/A/NZ9/00137).

Zajmowałem się następującymi zagadnieniami:

a) Rolą grzybów mykoryzowych w przystosowaniu roślin do bytowania w środowisku o wysokiej zawartości metali;
b) Wykorzystaniem mykoryzy do zwiększenia produkcji biomasy i zawartości substancji odżywczych roślin;
c) Opisem bioróżnorodności endofitów grzybowych roślin terenów antropogenicznie i naturalnie zanieczyszczonych metalami;
d) Rolą endofitów grzybowych w oporności roślin na metale;
e) Znaczeniem bioróżnorodności symbiotycznych grzybów w dostosowaniu roślin do środowiska wegetacji;
f) Mechanizmami interakcji roślina-grzyb symbiotyczny oraz grzybo-zależne mechanizmy przyspieszenia wzrostu roślin.

Wyniki badań zostały udokumentowane w postaci artykułów w czasopismach naukowych z zakresu mykologii, fizjologii, biochemii i biologii molekularnej roślin oraz nauk środowiskowych tj.: Chemosphere, Environmental Science and Pollution Research, Plant Physiology and Biochemistry, Frontiers in Environmental Science, Mycorrhiza i Symbiosis. Dodatkowo współuczestniczyłem w powstaniu dwóch książek: **„Molecular Mycorrhizal Symbiosis"** Wiley Blackwell publishing oraz **„The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem"**, 4th edn. CRC Press, jako współautor rozdziałów. Wspomniane artykuły były podstawą cyklu prac opublikowanych w ramach dysertacji doktorskiej Pani mgr Katarzyny Wężowicz zatytułowanej: **„Effects of Endophytes and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plants from Industrial Wastes"**, której byłem promotorem pomocniczym oraz sześciu doniesień

konferencyjnych. Najważniejszymi osiągnięciami było opisanie przystosowania roślin symbiotycznych do zwiększonej zawartości metali ciężkich w środowisku wegetacji (zarówno w glebie jak i w wodzie). Pokazałem również udział czynników środowiskowych takich jak nawodnienie w determinacji symbiozy roślina-arbuskularne grzyby mykoryzowe, a także opisałem współdziałanie środowiska w wykształceniu grzybo-zależnego fenotypu rośliny. Ponadto, scharakteryzowałem oddziaływanie symbiozy na metabolizm wtórny (na produkcję metabolitów wtórnych) rośliny, a także zmiany w kompozycji hydroksycynamonianów i laktonów seskwiterpenowych produkowanych przez roślinę pod wpływem grzyba mykoryzowego, co ma szczególne znaczenie w związku w rolą pełnioną przez te związki.

W prowadzonych badaniach podjęto również pierwsze próby opisania oddziaływania metali ciężkich na bioróżnorodność grzybów endofitycznych. W artykule: **"The diversity of endophytic fungi in *Verbascum lychnitis* from industrial areas"** opisano bioróżnorodność endofitów grzybowych zasiedlających *Verbascum lychnitis* pochodzących ze stanowisk o różnym stopniu skażenia metalami. Co ciekawe, nie potwierdzono istnienia oczekiwanej negatywnej korelacji pomiędzy zawartością metali ciężkich w glebie, a bioróżnorodnością grzybów endofitycznych. Badania oddziaływania czynników środowiskowych na mykobiotę roślin są kontynuowane w trwających projektach.

Równolegle zaangażowany byłem w prace dotyczące opracowania metody biotyzacji roślin przy pomocy wyselekcjonowanych mikroorganizmów jako wykonawca w projekcie: „Opracowanie technologii biotyzacji do komercyjnej, ekologicznej produkcji owoców jagodowych" TANGO1 /269101/NCBR/2015. Wynikiem prowadzonych badań było opracowanie dwóch wynalazków: **„Technologia biotyzacji maliny właściwej"** i **„Technologia biotyzacji borówki amerykańskiej"**. Formalizacja projektu wynalazczego została rozpoczęta w 2018 r. przygotowaniem dwóch zgłoszeń patentowych.

Możliwość wykorzystania mikroorganizmów w produkcji rolnej badałem również z wykorzystaniem modelu *Alium cepa* L.-*Rhizophagus irregularis*. Szczepionka zawierająca różne szczepy tego gatunku testowana była w celu zbadania możliwości wykorzystania mykoryzy w zwiększeniu plonowania różnych odmian cebuli uprawianych w Polsce. Przeprowadzone badania wykazały uniwersalność (kompatybilność z różnymi odmianami) wykorzystanej szczepionki grzybowej. Inokulowane rośliny charakteryzowały się przyspieszonym wzrostem i zwiększoną zawartością substancji odżywczych, wśród nich witaminy B1. Należy podkreślić, że nie wszystkie odmiany cebuli zareagowały wykształceniem fenotypu wzrostowego po inokulacji, co stało się podstawą do podjęcia badań nad czynnikami determinującymi fenotyp wzrostowy u roślin.

Większość badań nad mechanizmami symbiozy roślina-grzyb prowadzona jest z wykorzystaniem modeli roślina-mikroorganizm. W badaniach opisanych w artykułach: **"Does co-inoculation of *Lactuca serriola* with endophytic and arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth in a polluted environment?"** oraz **"Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste"** opisano różnice w odpowiedzi rośliny na inokulację pojedynczym grzybem: mykoryzowym lub endofitem, a także kombinacją tych symbiontów. Wykazano zasadnicze różnice w odpowiedzi rośliny, skłaniające do stwierdzenia, że roślina osiąga pełnię swoich możliwości dostosowawczych jedynie po zasiedleniu różnorodnymi mikroorganizmami. Badania te potwierdziły rolę mykobioty w przystosowaniu roślin do środowiska, jak również pozwoliły opisać zróżnicowanie w charakterze interakcji roślina -endosymbiont w zależności od warunków środowiska; pozytywne oddziaływanie niektórych gatunków grzybów było widoczne tylko w warunkach zwiększonej zawartości metali ciężkich w podłożu, co potwierdza rolę symbiontów w zasiedlaniu przez rośliny terenów trudnych.

Od 2016 r. uczestniczę, w projekcie ERA-NET "AGRONICKEL" (Project FACCE SURPLUS/I/AGRONICKEL/02/2016, NCBiR). Jednym z jego celów jest opracowanie technologii wykorzystania mikroorganizmów w agro-wydobyciu Ni. Dzięki przeprowadzonym badaniom scharakteryzowano mykobiotę hiperakumulatorów Ni: *Noccaea goesingense*, *N. caerulescens* oraz *Allysum serpyllifollium* z wybranych terenów niklonośnych, obejmujących Hiszpanię, Albanię, Grecję i Austrię. Udowodniono również, że endofity grzybowe zwiększają zdolność akumulacji i translokacji Ni z korzeni do pędu, co ma niebagatelne znaczenie w procesie agro-wydobycia tego metalu. Innym aspektem prowadzonych badań było określenie czynników determinujących zwiększoną grzybo-zależną zdolność do akumulacji Ni. Do badań wykorzystano model trzech gatunków/ekotypów roślin z rodzaju *Noccaea* charakteryzujących się zróżnicowaną odpowiedzią (zdolnością do akumulacji Ni) na inokulację i *Phomopsis columnaris*, grzyb endofityczny wyizolowany z *N. caerulescens*. Dzięki porównaniu globalnej ekspresji genów (*NGS ang. new generation sequencing*) pomiędzy inokulowanymi roślinami wytypowano geny odpowiedzialne za obserwowany fenotyp. Badania nad weryfikacją roli białek kodowanych przez wytypowane geny jest w toku. Do tej pory, wyniki prac opublikowano w jednym artykule w czasopiśmie naukowym (Frontiers in Environmental Science) i w postaci trzech doniesień konferencyjnych (plakaty i referat). Badania do projektu wykonywane są we współpracy m. in. z: Instytut Nauk Agrobiologicznych w Galicji, Spanish, National Research Council, Santiago de Compostela Hiszpania oraz Uniwersytet Lorraine, INRA, Laboratorium Gleby i Środowiska, Nancy, Francja

Uczestnictwo w badaniach Zespołu Interakcji Roślin i Mikroorganizmami INOŚ pozwoliło mi skonkretyzować moje zainteresowania badawcze i stworzyło podstawy do dalszej pracy na temat roli mykobioty roślin z rodziny *Brassicaceae* i ich roli w przystosowaniu roślin do bytowania na terenach metalonośnych. Aktualnie badania są kontynuowane w laboratorium Interakcji Roślin z Mikroorganizmami Małopolskiego Centrum Biotechnologii UJ, w którym pełnię rolę kierownika. Najważniejszymi celami prowadzonych badań jest wyjaśnienie mechanizmu elongacji włośników. Przedmiotem szczególnego zainteresowania są grzybo-zależne mechanizmy indukcji wydłużania tych komórek. Wydaje się, że zagadnienie to ma zasadnicze znaczenie w zwiększeniu przystosowania roślin do wegetacji w trudnych środowiskach. Dodatkowo, tematyka prac zespołu koncentruje się na wyjaśnieniu mechanizmów warunkujących optymalizację dystrybucji metali w roślinach symbiotycznych (w obrębie organów i kompartmentacja komórkowa) oraz na oddziaływaniu endosymbiontów na metabolizm pierwotny gospodarza. Wyniki tych badań mogą przybliżyć nas do skuteczniejszego wykorzystywania mikroorganizmów w rolnictwie i remediacji terenów skażonych. Zatrudnienie w Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ zapewnia mi dostęp do nowoczesnej aparatury badawczej pozwalającej na realizację złożonych badań obejmujących zarówno hodowlę materiału jak i użycie zaawansowanych metod biologii molekularnej. Stanowi to istotny atut przy włączeniu naszej grupy w badania we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi. Obecnie współpracujemy z Uniwersytetem w Wiedniu (projekt bilateralny OEAD na lata 2018-2020), Swammerdam Institute for Life Science, Uniwersytetu w Amsterdamie, Holandia, Instytutem Nauk Agrobiologicznych w Galicji, Spanish, National Research Council, Santiago de Compostela w Hiszpanii oraz z Uniwersytetem Lorraine, INRA, Laboratorium Gleby i Środowiska, Nancy we Francja. Oczekujemy obecnie także na wyniki konkursu NAWA na współpracę bilateralną ze Słowacją.

Poza działalnością badawczą, od 2016 roku jestem członkiem redakcji czasopisma „Symbiosis" (Springer, NL). W trakcie swojej pracy podjąłem się ewaluacji prawie czterdziestu manuskryptów, z czego siedem zostało dopuszczonych do druku. W 2018 roku zostałem redaktorem tematycznym (tymczasowym) w wydawanym on-line „Frontiers in Microbiology" „Effects of Plant-Microbiome Interactions on Phyto-, Bio-remediation Capacity". Dodatkowo recenzowałem około czterdziestu publikacji w następujących periodykach naukowych: Symbiosis, Chemosphere, Environmental and Experimental Botany, Acta Botanica Cracoviensis, Applied Soil Ecology, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, Environmental Science and Pollution Research, Frontiers in Microbiology, Physiologia Plantarum i Plant and Soil.

Piotr Rozpądek

Literatura

Ali, H., Khan, E., and Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. Chemosphere 91, 869-881. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.

Bastias, D. A., Martínez-Ghersa, M. A., Ballaré, C. L., and Gundel, P. E. (2017). *Epichloë* Fungal Endophytes and Plant Defenses: Not Just Alkaloids. Trends Plant Sci. 22, 939-948. doi:10.1016/j.tplants.2017.08.005.

Baena-González E. and Hanson J. (2017) Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators. Curr Opin Plant Biol 35: 152-157 doi.org/10.1016/j.pbi.2016.12.004

Bhargava, A., Carmona, F. F., Bhargava, M., and Srivastava, S. (2012). Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. J. Environ. Manage. 105, 103-120. doi:10.1016/j.jenvman.2012.04.002.

Chhabra, S., and Dowling, D. N. (2017). "Endophyte-Promoted Nutrient Acquisition: Phosphorus and Iron," in Functional Importance of the Plant Microbiome (Cham: Springer International Publishing), 21-42. doi:10.1007/978-3-319-65897-1_3.

Christensen, M. J., Bennett, R. J., and Schmid, J. (2002). Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. Mycol res. 106, 93-106. doi.org/10.1017/S095375620100510X

Christensen, M. J., Zhang, X., and Scott, B. (2008). Regulation switching of *Epichloë typhina* within elongating perennial ryegrass leaves. Mycol. Res. 112, 1056-1062. doi:10.1016/j.mycres.2008.02.003.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., and López-Bucio, J. (2009). Trichoderma virens, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 149, 1579-1592. doi:10.1104/pp.108.130369.

Czarnoleski, M., Pawlik, K., Olejniczak, P., Kozłowski, J., and Lembicz, M. (2012). An endophytic fungus reduces herbivory in its recently colonised grass host: A food-choice experiment on common voles, weeping alkaligrass and *Epichloë typhina*. Plant Ecol. 213, 1049-1053. doi:10.1007/s11258-012-0064-y.

DalCorso, G., Manara, A., and Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. Metallomics 5, 1117. doi:10.1039/c3mt00038a.

Deng, Z., Zhang, R., Shi, Y., Hu, L., Tan, H., and Cao, L. (2013). Enhancement of phytoremediation of Cd- and Pb-contaminated soils by self-fusion of protoplasts from endophytic fungus *Mucor* sp. CBRF59. Chemosphere 91, 41-47. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.11.065.

Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D., et al. (2015). First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in

Field, K. J., Rimington, W. R., Bidartondo, M. I., Allinson, K. E., Beerling, D. J., Cameron, D. D., et al. (2016). Functional analysis of liverworts in dual symbiosis with Glomeromycota and Mucoromycotina fungi under a simulated Palaeozoic CO_2 decline. ISME J. 10, 1514-1526. doi:10.1038/ismej.2015.204.

Gupta, A., and Joia, J. (2016). Microbes as Potential Tool for Remediation of Heavy Metals: A Review. J. Microb. Biochem. Technol. 8, 364-372. doi:10.4172/1948-5948.1000310.

Harman, G. E., Petzoldt, R., Comis, A., and Chen, J. (2004). Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 94, 147-153. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.2.147.

Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R. T., Hacquard, S., Kracher, B., et al. (2016). Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. Cell 165, 464-474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028.

Hiruma, K., Kobae, Y., and Toju, H. (2018). Beneficial associations between Brassicaceae plants and fungal endophytes under nutrient-limiting conditions : evolutionary origins and host - symbiont molecular mechanisms. Curr. Opin. Plant Biol. 44, 145-154. doi:10.1016/j.pbi.2018.04.009.

Janoušková, M., Pavlíková, D., Macek, T., and Vosátka, M. (2005). Arbuscular mycorrhiza decreases cadmium phytoextraction by transgenic tobacco with inserted metallothionein. Plant Soil 272, 29-40. doi:10.1007/s11104-004-3847-7.

Johnson, L. J., De Bonth, A. C. M., Briggs, L. R., Caradus, J. R., Finch, S. C., Fleetwood, D. J., et al. (2013). The exploitation of *epichloae* endophytes for agricultural benefit. Fungal Divers. 60, 171-188. doi:10.1007/s13225-013-0239-4.

Kaschuk G., Kuyper T.W., Leffelaar P.A., Hungria M. & Giller K.E. (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? Soil Biology and Biochemistry. doi: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.03.005

Khan, A. R., Waqas, M., Ullah, I., Khan, A. L., Khan, M. A., Lee, I. J., et al. (2017). Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. Environ. Exp. Bot. 135, 126-135. doi:10.1016/j.envexpbot.2016.03.005.

Kidd, P. S., Bani, A., Benizri, E., Gonnelli, C., Hazotte, C., Kisser, J., et al. (2018). Developing Sustainable Agromining Systems in Agricultural Ultramafic Soils for Nickel Recovery. Front. Environ. Sci. 6, 44. doi:10.3389/fenvs.2018.00044.

Lahrmann, U., Strehmel, N., Langen, G., Frerigmann, H., Leson, L., Ding, Y., et al. (2015). Mutualistic root endophytism is not associated with the reduction of saprotrophic traits and requires a noncompromised plant innate immunity. New Phytol. 207, 841-857. doi:10.1111/nph.13411.

Marks, S., and Clay, K. (1996). Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. New Phytol. 133, 727-733. doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb01941.x.

Morse, L. J., Day, T. A., and Faeth, S. H. (2002). Effect of *Neotyphodium* endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona *fescue* under contrasting water availability regimes. Environ. Exp. Bot. 48, 257-268. doi:10.1016/S0098-8472(02)00042-4.

Nongbri, P. L., Vahabi, K., Mrozinska, A., Seebald, E., Sun, C., Sherameti, I., et al. (2012). Balancing defense and growth - Analyses of the beneficial symbiosis between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *Symbiosis* 58, 17-28. doi:10.1007/s13199-012-0209-8.

Rodriguez, R. J., White Jr., J. F., Arnold, Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytol 182, 314-330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.

Rozpądek, P., Domka, A., and Turnau, K. (2017). Integrating Genomics and Metagenomics into Community Analysis. Fungal Community Its Organ. Role Ecosyst., 419-432.

Rozpadek, P., Wezowicz, K., Stojakowska, A., Malarz, J., Surówka, E., Sobczyk, T., et al. (2014). Mycorrhizal fungi modulate phytochemical production and antioxidant activity of *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) under metal toxicity. Chemosphere 112, 217-224. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.04.023.

Ruytinx, J., Martino, E., Rozpądek, P., Daghino, S., Turnau, K., Colpaert, J., et al. (2016). Homeostasis of trace elements in mycorrhizal fungi. Mol. Mycorrhizal Symbiosis, 277-298. doi:10.1002/9781118951446.ch16.

Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. Physiol. Plant. 120, 21-26. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0222.x.

Scheibe, R., Reckmann, U., Hedrich, R., and Raschke, K. (1990). Malate Dehydrogenases in Guard Cells of Pisum sativum. Plant Physiol. 93, 1358-1364. doi:10.1104/pp.93.4.1358.

Schulz, B. (2006). "Mutualistic Interactions with Fungal Root Endophytes," in Microbial Root Endophytes (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 261-279. doi:10.1007/3-540-33526-9_15.

Schulz, B., and Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. Mycol. Res. 109, 661-686. doi:10.1017/S095375620500273X.

Shi, Y., Xie, H., Cao, L., Zhang, R., Xu, Z., Wang, Z., et al. (2017). Effects of Cd- and Pb-resistant endophytic fungi on growth and phytoextraction of *Brassica napus* in metal-contaminated soils. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 417-426. doi:10.1007/s11356-016-7693-y.

Spiering, M. J., Greer, D. H., and Schmid, J. (2006). Effects of the fungal endophyte, *Neotyphodium lolii*, on net photosynthesis and growth rates of perennial ryegrass (Lolium perenne) are independent of in planta endophyte concentration. Ann. Bot. 98, 379-387. doi:10.1093/aob/mcl108.

Stein, E., Molitor, A., Kogel, K. H., and Waller, F. (2008). Systemic resistance in *Arabidopsis*

conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. Plant Cell Physiol. 49, 1747-1751. doi:10.1093/pcp/pcn147.

van der Ent, A., Baker, A. J. M., Reeves, R. D., Pollard, A. J., and Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. Plant Soil 362, 319-334. doi:10.1007/s11104-012-1287-3.

Van Der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., and Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecol. Lett. 11, 296-310. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.

Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. New Phytol. 181, 759-776. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02748.x.

Waters,M.T., Gutjahr, C., Bennett, T., Nelson D. C. (2017) Strigolactone Signaling and Evolution Annual Review of Plant Biology Annu Rev Plant Biol 68, 291-322. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040925

Wężowicz, K., Rozpądek, P., and Turnau, K. (2017). Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. Mycorrhiza 27, 499-511. doi:10.1007/s00572-017-0768-x.

Zahoor, M., Irshad, M., Rahman, H., Qasim, M., Afridi, S. G., Qadir, M., et al. (2017). Alleviation of heavy metal toxicity and phytostimulation of *Brassica campestris* L. by endophytic Mucor sp. MHR-7. Ecotoxicol. Environ. Saf. 142, 139-149. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.04.005.

Zhou, Y., Li, X., Gao, Y., Liu, H., Gao, Y. B., van der Heijden, M. G. A., et al. (2018). Plant endophytes and arbuscular mycorrhizal fungi alter plant competition. Funct. Ecol. 32, 1168-1179. doi:10.1111/1365-2435.13084.