

## Autoreferat

### 1. Imię i nazwisko

Rafał Ważny

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Stopień naukowy: doktor nauk leśnych

Podmiot nadający stopień: Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Rok uzyskania: 2012

Tytuł rozprawy doktorskiej: Zróżnicowanie spektrum mikoryz siewek jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) w zagospodarowanych drzewostanach jodłowych naturalnego pochodzenia oraz przedplonach sosnowych i modrzewiowych w Leśnym Zakładzie Doświadczalnym w Krynicy. Promotor: Prof. dr hab. Stefan Kowalski

Stopień naukowy: magister inżynier leśnictwa

Podmiot nadający stopień: Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Leśny

Rok uzyskania: 2007

Tytuł pracy magisterskiej: Badania and wzrostem i rozwojem sadzonek *Pinus sylvestris* L. poddanych zabiegowi sterowanej mykoryzacji z grzybem *Rhizopogon roseolus* (Corda.) Th. M. Fries. w hodowli kontenerowej. Promotor: Prof. dr hab. Stefan Kowalski

### 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2014.11 – obecnie	<b>Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Małopolskie Centrum Biotechnologii;</b> adiunkt badawczy
2013.06 – 2014.10	<b>Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Małopolskie Centrum Biotechnologii;</b> adiunkt, ekspert ds. transferu technologii
2012.11 – 2013.06	<b>Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Nauk o Środowisku;</b> samodzielny biolog
2012.07 – 2013.01	<b>Instytut Badawczy Leśnictwa w Sękocinie Starym;</b> staż naukowy w ramach projektu pt. „Utworzenie dla obszaru Sudetów i Beskidu Zachodniego leśnego systemu informacji w zakresie monitoringu i oceny stanu lasu”
2008.10 – 2011.06	<b>Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie;</b> zajęcia dydaktyczne (ćwiczenia laboratoryjne i terenowe) dla studentów w ramach kursu „Fitopatologia leśna”

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**„Rola endofitów grzybowych w adaptacji roślin do środowiska”**

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. **Ważny R.\*** Jędrzejczyk R.J., Domka A., Pliszko A., Kosowicz W., Githae D., Rozpądek P.\*, 2023. **How does metal soil pollution change the plant mycobiome?** *Environmental Microbiology*, 1-18, doi: 10.1111/1462-2920.16392  
IF 2022: 5,476 ; punkty MNiSW<sub>2023</sub>: 140  
Liczba cytowań wg Web of science: 0, wg Scopus: 0
2. **Ważny R.\***, Rozpądek P., Domka A., Jędrzejczyk R.J., Nosek M., Hubalewska-Mazgaj M., Lichtscheidl I., Kidd P., Turnau K., 2021. The effect of endophytic fungi on growth and nickel accumulation in *Noccaea* hyperaccumulators. *Science of the Total Environment*, 768, 144666, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144666  
IF 2021: 10,753; punkty MNiSW<sub>2021</sub>: 200  
Liczba cytowań wg Web of science: 11, wg Scopus: 12
3. **Ważny R.\***, Rozpądek P., Jędrzejczyk R.J., Domka A., Nosek M., Kidd P., Turnau K., 2021. Phytohormone based biostimulant combined with plant growth promoting endophytic fungus enhances Ni phytoextraction of *Noccaea goesingensis*. *Science of the Total Environment*, 789, 147950, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147950  
IF 2021: 10,753; punkty MNiSW<sub>2021</sub>: 200  
Liczba cytowań wg Web of science: 5, wg Scopus: 5
4. **Ważny R.\***, Rozpądek P., Jędrzejczyk R.J., Śliwa M., Stojakowska A., Anielska T., Turnau K. 2018. Does co-inoculation of *Lactuca serriola* with endophytic and arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth in a polluted environment? *Mycorrhiza*, 28(3): 235-246, doi: 10.1007/s00572-018-0819-y  
IF 2018: 3,144; punkty MNiSW<sub>2019</sub>: 100 (35 pkt. wg punktacji z 2018 r.)  
Liczba cytowań wg Web of science: 29, wg Scopus: 29
5. **Ważny R.\***, Jędrzejczyk R.J., Rozpądek P., Domka A., Turnau K., 2022. Biotization of highbush blueberry with ericoid mycorrhizal and endophytic fungi improves plant growth and vitality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106:4775–4786, doi: 10.1007/s00253-022-12019-5  
IF 2021: 5,560; punkty MNiSW<sub>2022</sub>: 100  
Liczba cytowań wg Web of science: 6, wg Scopus: 7

**\* autor korespondencyjny;**

Sumaryczny IF: **35,686;**

Suma punktów MNiSW: **740**

### **4.3. Zwięzłe omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

#### ***Wstęp***

Istotnym celem każdego państwa jest rozwój gospodarczy, prowadzący do polepszenia standardu życia ludności. Efektem ubocznym tego rozwoju jest nadmierna eksploatacja zasobów naturalnych, skutkująca pogorszeniem stanu środowiska. To sprawia, że w ostatnich latach wyzwania podejmowane w związku z ochroną środowiska stają się równie istotne jak wyzwania gospodarcze. Tematyka minimalizowania negatywnych skutków oddziaływania człowieka na środowisko jest obecna na porządku dziennym zarówno w mediach, strategiach zrównoważonego rozwoju, jak i badaniach naukowych. Co więcej, rosnąca świadomość ekologiczna społeczeństwa przyczynia się do tego, że racjonalne użytkowanie i ochrona środowiska stanowią istotny element strategii rozwoju coraz większej liczby podmiotów gospodarczych. Powstała dychotomia, polegająca na chęci utrzymania wysokiego wzrostu gospodarczego z zachowaniem dobrego stanu środowiska naturalnego, otwiera przed światem biznesu i nauki nowe wyzwania. Współczesne oczekiwania stawiane nowym rozwiązaniom technologicznym to przede wszystkim minimalne obciążenia dla funkcjonujących w środowisku ekosystemów.

Jednym z głównych elementów funkcjonowania ekosystemów lądowych są rośliny. Są one podstawowymi producentami materii organicznej, niezbędnej do prawidłowego ich funkcjonowania. Rośliny, podobnie jak inne organizmy wyższe, już od wczesnych etapów ontogenezy tworzą związki symbiotyczne z mikroorganizmami, które, często niewidoczne, odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów. Symbioza została zdefiniowana w XIX wieku jako współżycie różnych gatunków organizmów (de Bary 1879). Obejmuje ona szerokie spektrum interakcji między gatunkami, ale najczęściej przybiera trzy główne formy: mutualizmu, komensalizmu i pasożytnictwa. Mutualizm jest symbiozą, w których obaj partnerzy osiągają korzyści z interakcji. Komensalizm objawia się korzyściami jednego z partnerów bez szkody dla drugiego. W sytuacji, kiedy jeden z partnerów osiąga korzyści kosztem drugiego, wówczas ta forma symbiozy jest definiowana jako pasożytnictwo. Typ symbiozy może ulegać zmianom w zależności od warunków towarzyszącym symbiontom (Johnson et al. 1997). Zrozumienie partnerstwa pomiędzy rośliną gospodarzem a jej mikrobiomem zostało zrewolucjonizowane przez technologie sekwencjonowania następnej generacji i nowoczesne techniki bioinformatyczne. Badania, wykorzystujące te technologie pokazują, że symbionty są kluczowymi graczami w przebiegu wielu procesów życiowych swoich gospodarzy (Berg et al. 2017; Compant et al. 2019). To spowodowało, że pojęcie symbiozy ewoluowało do pojęcia holobiontu, definiującego gospodarza i współżycie z nim symbionty jako unikalny organizm biologiczny (Gilbert et al. 2012; Rosenberg and Zilber-Rosenberg 2013). Zrozumienie symbiozy pomiędzy roślinami i mikroorganizmami pomaga zrozumieć przystosowanie roślin do bytowania w zmieniających się warunkach środowiska, a tym samym ewolucję holobiontów. Ta wiedza z kolei może być wykorzystana w zastosowaniach praktycznych, np. w bioremediacji, fitoekstrakcji cennych pierwiastków i rolnictwie.

Gatunek rośliny oraz warunki środowiskowe mogą determinować strukturę społeczności mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę (Borymski et al. 2018). Mikrobiota

może pełnić rolę wskaźnika biologicznego odzwierciedlającego zmiany szaty roślinnej, zmiany żyzności gleby czy obecność zanieczyszczeń (Schloter et al. 2018; Xiang et al. 2020). Dlatego opisanie zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających interesujące nas środowiska czy populacje roślin powinno stanowić ważny krok w badaniu i zrozumieniu procesów determinujących funkcjonowanie środowiska. Jedną z najlepiej opisanych grup mikroorganizmów o mutualistycznym charakterze symbiozy, wchodzących w interakcje z roślinami są grzyby mykoryzowe. Rozwój wielu gatunków roślin jest całkowicie uzależniony od obecności tej grupy grzybów (Brundrett and Cairney 2002). Mykoryza jest formą interakcji zachodzącą pomiędzy grzybami a korzeniami roślin i może przybierać różne formy w zależności od grupy roślin i grupy grzybów wchodzących w te interakcje (Brundrett 2004). Powszechność występowania tego zjawiska w warunkach naturalnych oraz jego konieczność dla optymalnego wzrostu wielu gatunków roślin od dawna kieruje uwagę naukowców na praktyczne wykorzystanie mykoryzy. Obecnie na skalę gospodarczą w leśnictwie, ogrodnictwie i rolnictwie z powodzeniem stosuje się biopreparaty na bazie grzybów mykoryzowych (Hamel and Planchette 2007; Kowalski 2007). Drugą grupą, której w ostatnich latach poświęcono dużo uwagi są endofity. Endofity to wszechobecne, zróżnicowane taksonomicznie mikroorganizmy (obejmujące grzyby oraz bakterie), które bytują wewnątrz rośliny (część nadziemna, korzenie) przez cały lub część swojego cyklu życiowego i nie wywołują objawów chorobowych (Wilson 1995). Interakcja roślin z endofitami może prowadzić do przyspieszenia wzrostu gospodarza (Varma et al. 1999; Soleimani et al. 2010) oraz chronić rośliny przed niekorzystnymi warunkami środowiska (Rodriguez et al. 2009). Symbioza z endofitami jest szczególnie ważna dla roślin niemykoryzowych (około 29% wszystkich gatunków roślin naczyniowych), w tym dla przedstawicieli rodziny *Brassicaceae* (van der Heijden et al. 2015).

Następująca w wyniku rozwoju społeczeństw degradacja środowiska dotyka nie tylko środowisk naturalnych, ale również środowisk już przekształconych działalnością człowieka. Działalność ta, związana m.in. z eksploatacją złóż naturalnych i intensywnym rolnictwem, może prowadzić do ograniczenia bioróżnorodności mikroorganizmów symbiotycznych w wielu środowiskach, co wpływa negatywnie na homeostazę roślin i ekosystemów (Pérez-Jaramillo et al. 2016). Pozytywne oddziaływanie mikrobioty roślinnej na pobieranie wody i składników pokarmowych przez gospodarza oraz jej zdolności do zwalczania patogenów były przedmiotem intensywnych badań, ze względu na możliwe zastosowanie w fitoremediacji i rolnictwie jako alternatywy dla tradycyjnych technik uprawy roślin (Siddiqui et al. 2008; Alori et al. 2017; Deng and Cao 2017; Pagano et al. 2017).

Mikroorganizmy symbiotyczne pełnią korzystną rolę w adaptacji roślin do środowiska (Hardoim et al. 2015). Rośliny zasiedlające środowiska zanieczyszczone metalami toksycznymi (TM) stosują dwie różne strategie adaptacji do toksyczności podłoża. Pierwsza strategia polega na akumulacji znacznych ilości TM w częściach nadziemnych, druga natomiast polega na unikaniu/wyłączaniu toksyczności metali (Baker 1981). W obu tych strategiach rośliny mogą być wspomagane przez endofity. Przykładowo, badania w których brałem udział, pokazują, że u *Arabidopsis arenosa* grzyby endofityczne *Mucor* sp. (Rozpądek et al. 2018a) i *Sporobolomyces ruberrimus* (Domka et al. 2023; Jędrzejczyk et al. 2023) pozytywnie oddziaływały na strategię unikania pobierania metali toksycznych. Rośliny akumulowały mniej

Zn i Fe wskazując, że grzyb zmniejsza nadmierne pobieranie metali przez roślinę. Natomiast u *Brassica juncea*, będącej hiperakumulatorem Ni i Cd, endofity *Trichoderma* sp. i *Aspergillus* sp. pozytywnie wpływały na akumulację metali. Translokacja Cd i Ni z korzenia do pędu oraz akumulacja metali były zwiększane przez te symbionty (Jiang et al. 2008). Pomimo postępu, jaki się dokonał w ostatnim czasie w tym obszarze badań (Gkarmiri et al. 2017; Shade et al. 2017; Pollock et al. 2018), skład i rola mikrobioty roślinnej są nadal słabo poznane.

W świetle przedstawionych problemów w opracowanym przeze mnie osiągnięciu naukowym skupiłem się na uzupełnieniu wiedzy na temat różnorodności i roli grzybów endofitycznych w przystosowaniu roślin do zmian zachodzących w ich środowiskach w trzech następujących aspektach:

1. Oddziaływanie metali toksycznych na zbiorowiska grzybów zasiedlających endosferę rośliny.
2. Rola endofitów grzybowych w procesie akumulacji metali przez hiperakumulatory.
3. Rola koinokulacji grzybami endofitycznymi i mykoryzowymi w adaptacji roślin do środowiska.

### ***Oddziaływanie metali toksycznych na zbiorowiska grzybów zasiedlających endosferę rośliny***

Pierwszemu zagadnieniu jest poświęcona publikacja pt. „**How does metal soil pollution change the plant mycobiome?**” W ostatnich dekadach, przemysł wydobywczy spowodował wzrost areału terenów marginalnych w wielu regionach świata. W tych środowiskach, różnorodność flory jest zwykle ograniczona do gatunków o wysokiej tolerancji na toksyczność metali (Reeves et al. 2018). Wiadomo bardzo niewiele na temat struktury zbiorowisk mikroorganizmów, w tym grzybów endofitycznych towarzyszących tym roślinom, pomimo tego, że adaptacja mikroorganizmów do metali toksycznych była wielokrotnie studiowana. Większość prac opisuje oddziaływanie metali na zbiorowiska mikroorganizmów zasiedlających glebę (Piotrowska-Seget et al. 2005; Chen et al. 2014), a w odniesieniu do endosfery są opisywane głównie bakterie, rzadziej grzyby (Sun et al. 2021; Li et al. 2022).

Celem moich badań była ocena oddziaływania metali toksycznych obecnych w podłożu na strukturę zbiorowisk grzybów endofitycznych w roślinie. Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modelowego pseudometalofita - *Arabidopsis arenosa*, zasiedlającego różne środowiska, w tym tereny marginalne, ubogie w nutrieny i zasobne w metale toksyczne. Populacja *A. arenosa* zasiedlająca hałdę Bolesław została porównana z populacją referencyjną, zasiedlającą niezanieczyszczone środowisko. W pierwszej kolejności scharakteryzowano właściwości gleby i wykonano inwentaryzację florystyczną. Następnie zidentyfikowano grzyby endofityczne zasiedlające korzenie i liście roślin oraz grzyby glebowe z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS – next generation sequencing). Dodatkowo z liści i korzeni roślin wyizolowano grzyby na podłoża mikrobiologiczne. Zmiany w różnorodności grzybów endofitycznych zaobserwowane u roślin występujących w środowisku zostały zweryfikowane w warunkach laboratoryjnych w doświadczeniu rekonstrukcyjnym, w którym konsorcjum grzybowe złożone z 23 szczepów grzybów endofitycznych zostało użyte do inokulacji *A. arenosa*. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach *in vitro* na podłożu

suplementowanym metalami toksycznymi. Wariant kontrolny stanowiły rośliny rosnące na podłożu pozbawionym metali. Mykobiomy tych roślin zidentyfikowałem z wykorzystaniem sekwencjonowania NGS. Analizę wyników NGS przeprowadziłem w środowisku QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology; docs.qiime2.org) oraz R (www.r-project.org).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziłem **ograniczający wpływ metali toksycznych na bioróżnorodność mykobioty gleby**. Liczba rodzajów grzybów w podłożu hałdowym spadła o 25%, przy czym niemalże wszystkie rodzaje grzybów zidentyfikowane w glebie skażonej występowały w glebie nieskażonej. Zmiany w liczbie taksonów grzybów glebowych znalazły odzwierciedlenie w strukturze zbiorowisk tych grzybów, która różniła się pomiędzy terenem skażonym i nieskażonym (PCoA, ANOSIM, Clustering). Metale toksyczne ograniczały udział procentowy taksonów z gromady *Basidiomycota*. Grzyby glebowe w obu miejscach były zdominowane przez należące do *Ascomycota* klasy: *Dothideomycetes* (75-78%) i *Sordariomycetes* (10%).

**Toksyczność metali nie ograniczyła liczby rodzajów grzybów endofitycznych w roślinie, natomiast spowodowała zmiany w strukturze ich zbiorowisk** już na poziomie gromady. Endosfera rośliny, podobnie jak gleba, była zdominowana przez *Ascomycota* (80-95%). Ograniczający wpływ metali na udział *Basidiomycota* był jeszcze bardziej wyraźny w endosferze roślin niż w glebie (korzenie – spadek z 12.9% do 4.5%, liście – z 12.9% do 3.1%). Klasa *Dothideomycetes* dominowała w liściach (kontrola 39%, TM 51%) i korzeniach (kontrola 39%, TM 20%), druga klasa *Sordariomycetes* stanowiła w liściach 40% (kontrola) i 26% (TM), a w korzeniach 29% (kontrola) i 28% (TM). Udział trzeciej klasy, *Agaricomycetes* spadł z 9% w korzeniach i 10% w liściach roślin populacji kontrolnej do 2% w korzeniach i 0.2% w liściach roślin populacji skażonej.

W badaniach wyizolowałem prawie 600 szczepów grzybów endofitycznych, które zidentyfikowałem do 87 gatunków, stosując sekwencjonowanie metodą Sangera regionu obejmującego jednocześnie ITS-LSU rDNA. Dzięki temu odczyty mogły być mapowane do sekwencji wzorcowych obejmujących fragmenty wykraczające poza pojedynczy marker, dając rzetelniejszy wynik identyfikacji gatunkowej. Uzyskana kolekcja endofitów pozwoliła na wykorzystanie wybranych szczepów w badaniach realizowanych przez ośrodki naukowe w Polsce, Austrii (Wydział Nauk Leśnych i Gleboznawczych, Instytut Badań Gleboznawczych, Uniwersytet Zasobów Naturalnych i Nauk Przyrodniczych, Tulln; Austriacki Instytut Technologiczny w Tulln) i Słowacji (Instytut Botaniki, Centrum Nauki o Roślinach i Różnorodności Biologicznej, Słowacka Akademia Nauk, Bratysława; Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Komeńskiego w Bratysławie), w badaniach aplikacyjnych (dwa zgłoszenie patentowe, których jestem współautorem) oraz w doświadczeniu rekonstrukcyjnym, przeprowadzonym w celu weryfikacji obserwacji środowiskowych. Aby potwierdzić, czy w warunkach laboratoryjnych metale toksyczne będą ograniczać udział *Agaricomycetes* (*Basidiomycota*) przygotowałem konsorcjum grzybowe złożone z 23 szczepów grzybów endofitycznych wyselekcjonowanych na podstawie dwóch kryteriów: 1) grzyby, których udział był ograniczony przez TM (w oparciu o wyniki NGS); 2) grzyby, które wyizolowano z endosfery roślin kontrolnych, a nie roślin TM. **W eksperymencie rekonstrukcyjnym wykazałem, że zbiorowisko grzybów zasiedlających rośliny nietraktowane TM było zbliżone do zbiorowiska grzybów występującego w inokulum.**

## **Metale toksyczne natomiast zmieniły udział taksonów dominujących w endosferze roślin i spowodowały spadek udziału przedstawicieli klasy *Agaricomycetes*.**

Aby odpowiedzieć na pytanie, czy ograniczenie liczebności *Agaricomycetes* było spowodowane bezpośrednim oddziaływaniem TM na wzrost grzyba testowałem wrażliwość szczepów użytych w doświadczeniu rekonstrukcyjnym na metale. Indeks tolerancji na metale był najniższy u dwóch (z trzech badanych) przedstawicieli *Agaricomycetes* – *Ceratobasidium* i *Verticillium*. Wzrost *Rhizoctonia endophytica* nie był natomiast hamowany przez metale obecne w podłożu. *Agaricomycetes* użyte w doświadczeniu rekonstrukcyjnym nie zostały zidentyfikowane zarówno w glebie skażonej, jak i nieskażonej. Wskazuje to, że trzy w.w. *Agaricomycetes* były zależne od ich roślin żywicielskich i że metale zdeponowane w środowisku prawdopodobnie nie były przyczyną ich stosunkowo niskiej liczebności w *A. arenosa* (mimo że ich TI był niski). Wyniki te dostarczają dowodów na to, że zmiany w strukturze zbiorowisk grzybów endofitycznych u roślin narażonych na ekspozycję TM są raczej wynikiem zmian w funkcjonowaniu holobiontów niż bezpośredniego wpływu metali na bioróżnorodność grzybów glebowych.

Wyniki prezentowane w tej pracy wskazują, że **toksyczność podłoża wpływa na strukturę mykobioty rośliny nie poprzez zmianę puli mikroorganizmów dostępnych w glebie, z której są rekrutowane symbionty grzybowe, ale najprawdopodobniej poprzez zmianę preferencji rośliny i grzybów względem siebie w relacjach symbiotycznych.**

### ***Rola endofitów grzybowych w procesie akumulacji metali przez hiperakumulatory***

Drugiemu zagadnieniu są poświęcone dwa artykuły naukowe pt. „**The effect of endophytic fungi on growth and nickel accumulation in *Noccaea hyperaccumulators***” oraz „**Phytohormone based biostimulant combined with plant growth promoting endophytic fungus enhances Ni phytoextraction of *Noccaea goesingensis***”.

W publikacji zatytułowanej „**The effect of endophytic fungi on growth and nickel accumulation in *Noccaea hyperaccumulators***” wykazałem korzystny wpływ grzybów endofitycznych na wzrost i akumulację metali toksycznych u przedstawicieli roślin z grupy hiperakumulatorów niklu. Rośliny te występują naturalnie na glebach serpentynitowych, zasobnych w metale takie, jak Ni i mają zdolność do akumulacji Ni w częściach nadziemnych w stężeniach kilkaset razy większych niż gatunki niehiperakumulujące (Robinson et al. 1997). Dzięki tej zdolności hiperakumulatory mogą mieć zastosowanie w **fitowydobyciu (określanym w literaturze anglojęzycznej terminem agromining)**, czyli odzyskiwaniu metali rzadkich ze środowiska. W Europie są to głównie przedstawiciele rodziny *Brassicaceae* (Cecchi et al. 2010). Dotychczas opisywana rola mikroorganizmów we wzroście roślin i hiperakumulacji Ni u tych roślin, dotyczyła głównie oddziaływania bakterii endofitycznych i glebowych (Benizri and Kidd 2018). Dostępność informacji na temat roli grzybów symbiotycznych w adaptacji roślin do serpentynitów jest ograniczona do grzybów mykoryzowych (Orłowska et al. 2011). Grzyby endofityczne w tym ujęciu nie były badane.

Cele mojej pracy były następujące: a) izolacja i identyfikacja endofitów grzybowych hiperakumulatorów Ni, b) selekcja grzybów, zdolnych do zwiększonej akumulacji Ni przez

roślinę, c) ocena roli, jaką pełnią endofity grzybowe w akumulacji Ni w roślinie, d) opisanie specyfiki interakcji roślina-mikroorganizm w aspekcie zdolności mikroorganizmu do zwiększania akumulacji Ni u rośliny będącej nierodzimy gospodarzem, e) określenie mechanizmów adaptacji rośliny do serpentynitów zależnych od mikroorganizmów w ujęciu zmian w transkryptomie rośliny.

W opisywanej przeze mnie pracy, z 3 gatunków hiperakumulatorów Ni (*N. caerulescens*, *N. goesingensis* oraz *Odontharrhena serpyllifolia*) wyizolowałem 87 szczepów grzybów endofitycznych, które zidentyfikowałem do 40 gatunków. Siedem z nich zwiększyło produkcję biomasy *N. caerulescens* (*Plectosphaerella cucumerina*, *Embellisia thlaspis*, *Septoria* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Cadophora luteo-olivacea* i *Phoma herbarum*), a sześć stymulowało roślinę do zwiększonej akumulacji Ni (określonej za pomocą atomowej spektrometrii absorpcyjnej, ASA) w korzeniach i częściach nadziemnych (*Embellisia thlaspis*, *Pyrenochaeta cava*, *Phomopsis columnaris*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria* sp.). Cztery gatunki grzybów zwiększały translokację Ni z korzeni do pędów: *P. columnaris*, *P. cucumerina*, *E. thlaspis* i *Amycosphaerella africana*, i jednocześnie powodowały obniżenie stężenia antocyjanów w liściach. To **świadczy o korzystnej roli endofitów grzybowych w ochronie roślin przed stresem metali toksycznych.**

*P. columnaris* był jedynym gatunkiem grzyba, który stwierdzono w endosferze wszystkich populacji roślin pochodzących z gleb zasobnych w Ni (serpentynitów). W pracy sprawdzono tolerancję różnych szczepów *P. columnaris* na Ni i inne metale toksyczne (Zn, Cd), co pozwoliło na weryfikację użyteczności tego szczepu w fitowydobyciu. Szczep pochodzący z serpentynitu okazał się wysoce odporny na metale, a jego tolerancja nie ograniczała się do Ni, ale również dotyczyła Zn i Cd, chociaż w porównaniu z innym szczepem *P. columnaris*, wyizolowanym z *Arabidopsis arenosa* ze składowiska odpadów pogórnictwa (Zn, Fe i Cd) była mniejsza. Wskazuje to, że adaptacja grzybów do toksyczności metali jest związana z aktywacją ogólnych mechanizmów związanych ze stresem metali ciężkich, a nie z mechanizmami związanymi z konkretnymi metalami.

Szczepy *P. columnaris* pochodzące z różnych populacji roślin zostały wykorzystane do zbadania, czy zwiększona akumulacja Ni w tych roślinach może zależeć od kompatybilności roślina – mikroorganizm. Okazało się, że szczepy *P. columnaris* wyizolowane z *N. caerulescens* i *N. goesingensis*, czyli populacji pochodzących z serpentynitów, zwiększały stężenie Ni tylko u swoich rodzimych gospodarzy. Natomiast u gospodarzy nierodzących nie powodowały zwiększonej akumulacji Ni, z wyjątkiem populacji *N. goesingensis* niepochodzącej z serpentynitu. U gospodarzy nierodzących dochodziło do zwiększenia biomasy roślin, co w sposób pośredni, przyczyniło się do zwiększenia akumulacji Ni w roślinie. Świadczy to o tym, że **obserwowany fenotyp rośliny jest zależny od szczepu grzyba i wymaga długoterminowej adaptacji rośliny i mikroorganizmu.**

Globalna analiza ekspresji genów, przy pomocy RNAseq, wykazała, że **zwiększona akumulacja Ni w roślinie była związana ze wzrostem ekspresji genów odpowiedzialnych za pobór metali oraz ochronę rośliny przed stresem.** W populacji roślin przystosowanej do Ni stwierdzono wzrost ekspresji genów IRT1 (IRON REGULATED TRANSPORTER 1),



IRT2 (IRON REGULATED TRANSPORTER 2) oraz ZIP5 (ZINC TRANSPORTER 5 PRECURSOR). IRT1 i IRT2 są transporterami Fe ze zmiennym powinowactwem do innych kationów metali dwuwartościowych w tym Ni (Korshunova et al. 1999; Nishida et al. 2011); ZIP5 bierze udział w transporcie błonowym jonów metali (Zn). Żadne doniesienia nie potwierdzają jego roli w transporcie Ni, ale nie można wykluczyć jego udziału w homeostazie Ni.

Zdolność roślin do hiperakumulacji Ni jest wykorzystywana w fitowydobywaniu. Ta technologia pozwala na pozyskiwanie metali bez szkodliwego wpływu na środowisko i rozwój rolnictwa wśród społeczności zamieszkujących tereny metalonośne (Chaney et al. 2018). Od kilku lat prowadzone są badania nad wydajnością tego procesu poprzez m.in. uprawę roślin motylkowych razem z hiperakumulatorami (Saad et al. 2018), inokulację roślin bakteriami (Benizri and Kidd 2018) lub grzybami mykoryzowymi (Turnau and Mesjasz-Przybyłowicz 2003) oraz stosowanie fitohormonów (Cabello-Conejo et al. 2014). Przedstawione przeze mnie badania potwierdziły przydatność wybranych szczepów grzybów endofitycznych w zwiększonej akumulacji Ni u hiperakumulatorów i zostały przeznaczone do doświadczeń polowych na serpentynitowych powierzchniach doświadczalnych w Basadre (Hiszpania) prowadzonych przez Zespół Biochemii Gleby Instytutu Badań Agrobiologicznych Galicji (Hiszpania).

W kolejnym artykule zatytułowanym „**Phytohormone based biostimulant combined with plant growth promoting endophytic fungus enhances Ni phytoextraction of *Noccaea goesingensis***” zweryfikowałem potencjał wyselekcjonowanego w poprzedniej pracy grzyba endofitycznego *Phomopsis columnaris* w połączeniu z biostymulatorem Kelpak (naturalny wyciąg z alg morskich *Ecklonia maxima* stosowany powszechnie na rynku do zwiększania plonu i wspomagania wzrostu roślin w uprawach) w promocji fitoekstrakcji Ni przez *N. goesingensis*. Dotychczasowe doniesienia wskazywały na zwiększoną akumulację Ni u hiperakumulatorów po zastosowaniu tego biostymulatora (Cabello-Conejo et al. 2014).

W pierwszej kolejności określiłem jak biostymulator Kelpak suplementowany do podłoża (w stężeniach 0, 0.2, 0.5, 1, 2 i 4%) i Ni suplementowany do podłoża (w formie 150  $\mu\text{M}$   $\text{NiSO}_4$ ) oddziałują na wzrost grzybni *P. columnaris*. Stwierdziłem, że Ni każdorazowo ograniczał rozwój grzybni, natomiast Kelpak wspomagał wzrost grzybni przy stężeniu 0.2% i 0.5% jedynie w podłożu pozbawionym dodatku Ni.

Następnie zbadałem odpowiedź wzrostową rośliny i akumulację Ni w roślinach inokulowanych endofitem, traktowanych biostymulatorem oraz traktowanych jednocześnie w.w. czynnikami. Pozytywną odpowiedź wzrostową zaobserwowałem u roślin inokulowanych *P. columnaris* (wzrost świeżej biomasy o 61%) oraz roślin jednocześnie inokulowanych i traktowanych biostymulatorem (wzrost świeżej biomasy o 78%). Sam biostymulator nie wspomagał wzrostu *N. goesingensis*. Analiza cech biometrycznych roślin wykazała, że poprawa biomasy była głównie determinowana liczbą oraz długością liści i powierzchnią liści. Zastosowanie obu czynników oddziaływało pozytywnie na rozwój systemu korzeniowego (określony za pomocą oprogramowania WinRhizo). Łączna długość korzeni oraz objętość systemu korzeniowego była większa o odpowiednio 44% i 55% w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Stężenie Ni w częściach nadziemnych nie różniło się pomiędzy obiektami badawczymi. Oznacza to, że *P. columnaris* oraz biostymulator Kelpak nie pobudzały roślin do pobierania większej ilości Ni, co z punktu widzenia fitowydobycia Ni nie jest wynikiem zadowalającym. Natomiast, dzięki istotnemu zwiększeniu biomasy roślin spowodowanemu inokulacją *P. columnaris* oraz jednoczesnym traktowaniem *P. columnaris* i Kelpak, stwierdzono wzrost ogólnego plonu Ni w roślinie o odpowiednio 48% i 69%. Wskazuje to, że endofit może zwiększać akumulację Ni pośrednio poprzez stymulację produkcji biomasy i w konsekwencji zwiększenie zawartości Ni w roślinie. W tym badaniu *N. goesingensis* został zainokulowany swoim nienatywnym symbiontem endofitycznym, co potwierdziło obserwacje opisane w poprzednim artykule.

W pracy wykazano również **oddziaływanie endofita z rośliną**. Używając znakowanego GFP szczepu *P. columnaris* i barwienia histochemicznego połączonego z mikroskopią świetlną, uwidoczniono grzyba wewnątrz korzeni i pędów roślin. W celu prześledzenia rozwoju grzyba *in planta* i oceny wpływu stosowania biostymulatorów na rozwój grzybni opracowałem protokół pozwalający oznaczyć ilość DNA grzybowego *P. columnaris* (*tef1 $\alpha$* ) w roślinie za pomocą techniki *qPCR*. Dzięki tej analizie wykazałem, że po zastosowaniu biostymulatora liczebność *P. columnaris* w liściach roślin wzrosła prawie 5-krotnie.

Zaprezentowane wyniki badań potwierdzają przydatność ***P. columnaris* w pośrednim oddziaływaniu na proces akumulacji Ni poprzez aktywację wzrostu biomasy rośliny**. Badania wykazały, że sam grzyb oraz połączone działanie dwóch czynników (Kelpak i grzyb endofityczny) może znacząco poprawić wzrost roślin, a tym samym akumulację Ni przez *N. goesingensis*. Rośliny traktowane obydwoma biostymulatorami wykazywały najlepsze cechy biometryczne (biomasa, parametry liści) spośród badanych zabiegów. Przedstawione wyniki są krokiem w kierunku usprawnienia procesu fitowydobycia Ni.

Należy nadmienić, że technologia umożliwiająca odzyskiwanie Ni z roślin uprawianych na serpentynitach została już opracowana przez zespół naukowy z Uniwersytetu w Lorraine (Francja) i jest testowana z wykorzystaniem hiperakumulatorów uprawianych na powierzchniach doświadczalnych w Hiszpanii, Austrii, Albanii i Grecji (Kidd et al. 2018). Przykładowo, w Albanii serpentynity stanowią aż 11% powierzchni kraju. Biomasa hiperakumulatora *Alyssum murale*, uprawianego na poletkach doświadczalnych w tym kraju osiągnęła 9 ton na hektar, co pozwoliło uzyskać plon Ni w wysokości 105 kg (Bani et al. 2015). Są to tereny o niskiej przydatności w produkcji rolnej. Fitowydobycie Ni w tych terenach mogłoby przynieść korzyści w postaci 1) większego zysku ekonomicznego dla rolników w porównaniu z uprawą konwencjonalną, 2) oczyszczania gleb z metali, 3) ograniczenia tradycyjnych, nieprzyjaznych dla środowiska metod wydobycia Ni (van der Ent et al. 2015).

### ***Rola koinokulacji grzybami endofitycznymi i mykoryzowymi w adaptacji roślin do środowiska***

Ostatniemu zagadnieniu są poświęcone dwa kolejne artykuły naukowe pt. „**Does co-inoculation of *Lactuca serriola* with endophytic and arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth in a polluted environment?**” oraz “**Biotization of highbush**

## **blueberry with ericoid mycorrhizal and endophytic fungi improves plant growth and vitality”.**

Najlepiej opisaną grupą mikroorganizmów towarzyszących roślinie w adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych, spowodowanych zmianami klimatycznymi i antropopresją, są grzyby mykoryzowe (Bothe et al. 2010). W badaniach opisujących te interakcje, rośliny są zwykle inokulowane pojedynczym szczepem grzyba. W naturalnych warunkach natomiast powszechnym zjawiskiem jest obecność na jednym systemie korzeniowym struktur mykoryzowych tworzonych przez kilka gatunków grzybów. Mając na uwadze różne funkcje fizjologiczno-żywniowe i ochronne, jakie może pełnić każdy z tych gatunków, można sądzić, że im większa liczba symbiontów tym większe zdolności adaptacyjne roślin do środowiska. Badania, w których jako modelu używa się jednocześnie kilka grup mikroorganizmów do inokulacji roślin są rzadkością. Są one zwykle ograniczone do koinokulacji z wykorzystaniem *Rhizobium* i bakterii promujących wzrost roślin (PGPB – plant growth promoting bacteria) (Remans et al. 2008; Ahmad et al. 2011), grzybów ektomykoryzowych i bakterii je wspomagających (MHB – mycorrhizal helper bacteria) (Frey-Klett et al. 2007) czy arbuskularnych grzybów mykoryzowych i bakterii (Liu et al. 2012; Bona et al. 2016). Jednoczesna interakcja roślin z grzybami mykoryzowymi i endofitycznymi jest tematem słabo zbadanym, a wyniki dotychczasowych badań są niejednoznaczne, wykazują bowiem, że koinokulacja może wpływać zarówno pozytywnie lub negatywnie na wzrost roślin w porównaniu z inokulacją pojedynczymi szczepami. Okazuje się, że kluczowy jest odpowiedni dobór partnerów do szczepionek wielogatunkowych. Gdy dominacja w kolonizacji systemu korzeniowego jednego symbionta jest wysoka, rozwój drugiego symbionta może być wyraźnie ograniczony (Goodwin 1992). Z tych powodów podjęto próbę zbadania tego zagadnienia. W tym celu wybrano dwie grupy grzybów mykoryzowych: arbuskularne grzyby mykoryzowe (ang. arbuscular mycorrhizal fungi - AMF) oraz grzyby erikoidalne (ang. ericoid mycorrhiza - EM).

W artykule pt. „**Does co-inoculation of *Lactuca serriola* with endophytic and arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth in a polluted environment?**” opisałem oddziaływanie inokulacji i koinokulacji *L. serriola* arbuskularnymi grzybami mykoryzowymi, *Rhizoglossum intraradices* oraz grzybami endofitycznymi, *Mucor* sp. oraz *Trichoderma asperellum* na wzrost i witalność rośliny, akumulację metali toksycznych i produkcję metabolitów wtórnych.

*L. serriola* jest przykładem rośliny pionierskiej, zasiedlającej ubogie w wodę i nutrieny środowiska (Gallardo et al. 1996; Lebeda et al. 2004), w tym tereny hałdowe (Turnau et al. 2012). W warunkach laboratoryjnych odpowiedź wzrostowa rośliny była najsilniejsza po zastosowaniu grzybów mykoryzowych, niezależnie od obecności bądź braku metali toksycznych w podłożu. Ponadto, stężenie flawonoidów było zmniejszone, co sugeruje osłabienie reakcji na stres u roślin inokulowanych AMF. W przypadku koinokulacji odpowiedź wzrostowa rośliny była zróżnicowana. Koinokulacja AMF i *Mucor* sp. skutkowałą wzrostem biomasy roślin w środowisku skażonym metalami toksycznymi, natomiast koinokulacja AMF i *Trichoderma asperellum* – w środowisku nieskażonym. Ponadto koinokulacja AMF i *Mucor* wpłynęła pozytywnie na akumulację Zn w liściach i korzeniach. Kolejną korzyścią wynikającą z koinokulacji z udziałem endofita *Mucor* sp. była zwiększona kolonizacja korzeni rośliny

przez grzyby arbuskularne. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że **w warunkach skażenia podłoża metalami toksycznymi, korzystne oddziaływanie grzybów endofitycznych nie jest uniwersalne i zależy od gatunku grzyba.**

*L. serriola* zaliczana jest do grupy roślin, realizujących strategię unikania akumulacji metali (Cobb et al. 2000). W opisywanym artykule grzyby mykoryzowe nie oddziaływały na proces akumulacji metali toksycznych w roślinie, inokulacja z wykorzystaniem *Mucor* sp. obniżała ich stężenie, natomiast koinokulacja tymi gatunkami grzybów skutkowała wzrostem stężenia Zn w korzeniach roślin. Wyniki te pokazują, że **strategia rośliny w procesie adaptacji do środowiska skażonego metalami toksycznymi, może być modyfikowana przez grzyby symbiotyczne i jest zależna od efektu synergistycznego zachodzącego pomiędzy poszczególnymi gatunkami grzybów.**

Utrzymanie symbiozy z wieloma gatunkami mikroorganizmów to potencjalnie zwiększone koszty ponoszone przez roślinę. Jednak w świetle przedstawionych badań, koinokulacja rekompensuje te koszty i jest bardziej korzystna dla rośliny niż inokulacja pojedynczymi gatunkami grzybów. Wyniki tych badań mogą mieć zastosowanie w praktyce np. w bioremediacji terenów skażonych.

Rozwinięciem zagadnienia koinokulacji jest kolejny artykuł, zatytułowany **“Biotization of highbush blueberry with ericoid mycorrhizal and endophytic fungi improves plant growth and vitality”**. W artykule opisałem efekt koinokulacji rośliny użytkowej kolejną grupą grzybów mykoryzowych – grzybów erikoidalnych z grzybami endofitycznymi. Rośliną modelową była borówka wysoka (*Vaccinium corymbosum*), której areal, w ostatnich latach, wzrasta bardzo dynamicznie w wielu krajach na świecie (www.fao.org). Polska plasuje się w czołówce europejskich producentów owoców borówki wysokiej. Zintensyfikowana produkcja i związane z nią nawożenie upraw i stosowanie środków ochrony roślin prowadzą do zaburzenia symbiozy z mikroorganizmami towarzyszącymi roślinie i zmian w środowisku. Dlatego konieczne jest ulepszanie istniejących i poszukiwanie nowych, korzystnych dla środowiska metod produkcji roślin. Jedną z nich jest biotyżacja, która polega na inokulacji roślin odpowiednio wyselekcjonowanymi mikroorganizmami symbiotycznymi, które promują wzrost roślin i tolerancję na stres (Gianinazzi et al. 2003; Gollotte et al. 2009).

Borówka wysoka tworzy symbiozę z grzybami erikoidalnymi, takimi jak *Rhizoscyphus ericae* i *Oidioidendron* spp. (Jansa and Vosátka 2000; Fehrer et al. 2019) oraz grzybami endofitycznymi z rodzajów: *Anteaglonium*, *Penicillium* *Dothidea*, *Fellozymba* (Hamim et al. 2017; Nguyen et al. 2021; Wu et al. 2021). Prace opisujące wspomaganie wzrostu tego gatunku rośliny są głównie ograniczone do jednego gatunku/szczepu mikroorganizmu. Stosowanie kilku gatunków jednocześnie jest, podobnie jak w przypadku poprzedniego modelu, rzadkością, a jeśli ma miejsce, to dotyczy innych grup mikroorganizmów, np. grzybów erikoidalnych i saprotroficznych (Vohník et al. 2012).

Wyniki badań mojej poprzedniej pracy, wskazujące na korzystniejsze oddziaływanie koinokulacji niż inokulacji pojedynczymi szczepami grzybów na wzrost roślin oraz synergistyczne oddziaływanie tych grzybów, wykorzystano jako myśl przewodnią do opracowania technologii biotyżacji borówki wysokiej. Opracowanie tej technologii

obejmowało trzy etapy: 1) izolację grzybów erikoidalnych z korzeni włosowatych roślin borówki wysokiej; 2) selekcję komponentów konsorcjum; 3) weryfikację technologii na skalę półprzemysłową – na początkowym etapie produkcji materiału sadzeniowego i w momencie przesadzania starszych roślin (2-letnie) do większych doniczek (w celu weryfikacji, czy można efektywnie biotyzować starsze rośliny).

Z korzeni włosowatych borówki wyizolowałem 39 szczepów grzybów, które zidentyfikowałem (na podstawie sekwencji nukleotydów regionu ITS rDNA) do 13 gatunków. Najczęściej izolowanymi gatunkami były *Hymenoscyphus* sp. i *Oidiodendron maius*. W celu wyselekcjonowania grzybów do szczepionki wielogatunkowej, wybrano szczepy należące do 9 gatunków i przygotowano szczepionki jednogatunkowe, którymi zainokulowano ukorzenione zrazy borówki amerykańskiej. Po 3 miesiącach, na podstawie parametrów wzrostowych roślin wyselekcjonowano 3 gatunki grzybów erikoidalnych: *O. maius*, *Phialocephala fortinii* i *Hymenoscyphus* sp. do stworzenia szczepionki wielogatunkowej.

W następnym eksperymencie sprawdzono, czy użycie kilku gatunków grzybów jest korzystniejsze dla rośliny niż użycie jednego. Zastosowanie szczepionki złożonej z trzech gatunków grzybów spowodowało wzrost roślin nawet o 34% w porównaniu z pojedynczymi szczepami. Dodatkowo, do szczepionki włączono grzyb endofityczny *Xylaria* sp., który jest znany z korzystnego wpływu na kolonizację mykoryzową roślin (Wężowicz et al. 2017). Zastosowanie *Xylaria* sp. wzmocniło jeszcze bardziej efekt wzrostowy obserwowany przy zastosowaniu 3 szczepów grzybów erikoidalnych jednocześnie.

Tak wyselekcjonowana szczepionka złożona z 4 gatunków *O. maius*, *Phialocephala fortinii*, *Hymenoscyphus* sp. i *Xylaria* sp. była testowana w trzecim etapie prac na skalę półprzemysłową we współpracy z przedsiębiorstwem produkującym materiał sadzeniowy. Eksperymenty przeprowadzono w warunkach szklarniowych. Rośliny zostały włączone w cykl produkcyjny materiału sadzeniowego stosowany w przedsiębiorstwie. Inokulacja borówki szczepionką wielogatunkową spowodowała zwiększenie biomasy roślin 1-roczych dochodzące do 33% i zwiększenie powierzchni liścia o 61%, a roślin starszych, odpowiednio o 62% i 100% w porównaniu z roślinami nieinokulowanymi. Zastosowanie biotyzacji nie zwiększyło poziomu metabolitów wtórnych w liściach roślin, ale wpłynęło pozytywnie na witalność roślin, określoną na podstawie wydajności fotosyntezy.

Wyniki tej pracy wskazują, że **koinokulacja borówki wysokiej grzybami mykoryzowymi i endofitycznymi jest korzystniejsza niż inokulacja tylko grzybami mykoryzowymi**. Biotyzacja borówki wysokiej grzybami erikoidalnymi i endofitycznymi zwiększyła biomasę i witalność roślin na etapie produkcji materiału sadzeniowego w warunkach szklarniowych. Rośliny mogą być biotyzowane, nie tylko na początkowym etapie rozwoju, w momencie przenoszenia ukorzenionych zrazów z kultur *in vitro* do podłoża torfowego, ale również na późniejszych etapach rozwoju – w momencie przenoszenia roślin do większych doniczek. To zwiększa możliwości zastosowania tej technologii w praktyce. Zaproponowana w pracy technologia biotyzacji borówki wysokiej została opatentowana w Urzędzie Patentowym RP (Pat. 238335) oraz zgłoszona do PCT (The Patent Cooperation Treaty) i EPO (European Patent Organization). Za pośrednictwem Centrum Transferu

Technologii Uniwersytetu Jagiellońskiego CITTRU prowadzone są rozmowy z producentami owoców borówki wysokiej, zainteresowanymi komercjalizacją tej technologii.

### **Podsumowanie**

Podsumowując, prace wchodzące w skład niniejszego osiągnięcia naukowego wskazują na pozytywną rolę grzybów endofitycznych w adaptacji roślin do środowiska i wnoszą nową wiedzę w zakresie interakcji roślin z mikroorganizmami. W przedstawionych pracach wykazałem, że:

- toksyczność podłoża zmienia strukturę mykobioty rośliny. Wpływ ten zaznacza się nie poprzez zmianę puli mikroorganizmów dostępnych w glebie, z której są rekrutowane symbionty grzybowe, ale najprawdopodobniej poprzez zmianę preferencji rośliny i grzybów względem siebie w relacjach symbiotycznych;
- toksyczność podłoża ma ograniczający wpływ na bioróżnorodność mykobioty gleby;
- w warunkach skażenia podłoża metalami toksycznymi, korzystne oddziaływanie grzybów endofitycznych na roślinę nie jest uniwersalne i zależy od gatunku grzyba;
- obserwowany fenotyp rośliny jest zależny od szczepu grzyba i wymaga długoterminowej adaptacji rośliny i mikroorganizmu. Szczepy *P. columnaris* wyizolowane z populacji roślin, pochodzących z serpentynitów, zwiększały stężenie Ni tylko u swoich rodzimych gospodarzy. U gospodarzy nierodzimych nie powodowały zwiększonej akumulacji Ni, ale powodowały zwiększenie biomasy rośliny, co w sposób pośredni, przyczyniło się do zwiększenia akumulacji Ni w roślinie;
- grzyby endofityczne mają potencjał w zastosowaniach praktycznych w kierunku usprawnienia procesu fitoekstrakcji Ni (agromining);
- koinokulacja roślin kilkoma szczepami grzybów charakteryzuje się korzystniejszym oddziaływaniem na wzrost roślin niż inokulacja pojedynczymi szczepami grzybów;
- strategia rośliny w procesie adaptacji do środowiska skażonego metalami toksycznymi, może być modyfikowana przez grzyby symbiotyczne i jest zależna od efektu synergistycznego zachodzącego pomiędzy grzybami mykoryzowymi i endofitycznymi, użytymi do koinokulacji (grzyby mykoryzowe nie oddziaływały na proces akumulacji metali toksycznych w roślinie, inokulacja z wykorzystaniem endofita obniżała ich stężenie, natomiast koinokulacja skutkowała wzrostem stężenia Zn w korzeniach roślin).

### **Plany badawcze na najbliższe lata**

Podczas realizacji badań w ramach omówionych wyżej publikacji zaobserwowałem, że w warunkach toksyczności metali populacja *A. arenosa* pochodząca z gleby niezanieczyszczonej metalami toksycznymi wykazywała istotnie lepszy wzrost niż populacja przystosowana do TM. Gdy ta druga populacja została zaszczepiona endofitami pochodzącymi z nasion, negatywny efekt metali toksycznych został zniwelowany. Wyniki te wskazywały, że mikroorganizmy wyizolowane z nasion roślin rosnących w środowisku nieskażonym mogą być korzystne dla gospodarza w warunkach toksyczności metali. Pozwoliło to wysunąć hipotezę, że utrata oporności rośliny na metale toksyczne ma związek z mikrobiomem nasion. Hipoteza ta stała się myślą przewodnią projektu

zatytułowanego „Czy utrata oporności na metale toksyczne przez roślinę jest związana z mikrobiomem nasion?”, który złożyłem w ramach konkursu NCN OPUS22. Projekt otrzymał finansowanie w roku 2022, co naturalnie wytyczyło tematykę badań, które będę prowadził w ciągu najbliższych czterech lat.

Głównym celem projektu jest opisanie, w jaki sposób toksyczne metale (TM) obecne w podłożu wpływają na bioróżnorodność mikrobioty nasion. W projekcie zostaną zbadane następujące problemy badawcze: 1) opis zmian w mikrobiomie nasion spowodowanych toksycznością metali oraz znaczenie tych zmian w adaptacji roślin; 2) ocena wpływu toksyczności metali na wertykalną transmisję mikroorganizmów; 3) opisanie mechanizmów, dzięki którym mikrobiom nasion zwiększa tolerancję roślin na metale toksyczne, ze szczególnym uwzględnieniem pozyskiwania i dystrybucji metali i składników pokarmowych.

Ponadto planuję w niedalekiej przyszłości zająć się zagadnieniami 1) oddziaływania różnych czynników środowiskowych na mikrobiotę roślin (wyniki wstępne do przygotowania projektu zgromadziłem w trakcie realizacji projektu POB BioS, opisanego w dalszej części autoreferatu) oraz 2) różnorodności bakterii zasiedlających strzępki grzybów endofitycznych (które posiadam w kolekcji) i opisaniem roli, jaką pełnią w życiu grzyba oraz rośliny.

## **5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

Studia doktoranckie odbyłem w Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie w latach 2007-2012. W trakcie studiów doktoranckich poznałem metody klasyfikacji i identyfikacji ektomykoryz drzew leśnych. Swoją wiedzę w tym zakresie wzbogaciłem podczas 3-tygodniowego (1-19.02.2010) stażu naukowego w Instytucie Dendrologii Polskiej Akademii Nauk w Kórniku pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Rudawskiej i dr hab. Tomasza Leskiego nt. „Molekularne metody identyfikacji ektomykoryz”. Poznane techniki laboratoryjne zostały wykorzystane w badaniach, które wykonałem w ramach dysertacji pod kierownictwem Prof. dr hab. Stefana Kowalskiego. Wyniki tych badań zostały opublikowane w dwóch pracach (Ważny 2014; Ważny i Kowalski 2017).

Po uzyskaniu stopnia doktora odbyłem 7-miesięczny staż naukowy w latach 2012-2013 (01.07.2012-31.01.2013) w Instytucie Badawczym Leśnictwa w Sękocinie Starym. W tym czasie zajmowałem się analizą ektomykoryz i patogenów drzew leśnych z obszaru Sudetów i Beskidu Zachodniego w projekcie pt. „Utworzenie dla obszaru Sudetów i Beskidu Zachodniego leśnego systemu informacji w zakresie monitoringu i oceny stanu lasu”. Zgromadzone przeze mnie wyniki badań zostały włączone do leśnego systemu informacji w zakresie monitoringu i stanu zdrowotnego lasu.

Pod koniec 2012 roku zostałem zatrudniony w Instytucie Nauk o Środowisku na Wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w zespole Interakcji Roślin z Mikroorganizmami kierowanym przez Prof. dr hab. Katarzynę Turnau. W tym czasie rozpocząłem badania nt. roli grzybów endofitycznych w przystosowaniu roślin do

środowisk skażonych metalami toksycznymi w ramach projektu pt. „Endofity jako nowe narzędzie w fitoremediacji” (Projekt MAESTRO; PI: Prof. dr hab. Katarzyna Turnau).

W lipcu 2013 roku rozpocząłem pracę w Małopolskim Centrum Biotechnologii (MCB) Uniwersytetu Jagiellońskiego w Ośrodku Bioremediacji, kierowanym przez Prof. dr hab. Katarzynę Turnau. W pierwszym roku mojej działalności w MCB byłem ekspertem ds. transferu technologii w Ośrodku Bioremediacji MCB, zaangażowanym jednocześnie w realizację wspomnianego wyżej projektu. Od listopada 2014 roku moja praca skupiała się wyłącznie na działalności naukowej. Jestem współautorem 6 publikacji (w jednej autorem pierwszym i korespondencyjnym) przygotowanych w ramach realizacji w.w. projektu MAESTRO (Rozpądek et al. 2014, 2015, 2017, 2018b; Domka et al. 2018; Ważny et al. 2018).

W roku 2013 odbyłem tygodniowe szkolenie (2-6.12.2013) w ramach akcji EU COST nt. “Charakterystyka aktywnych biologicznie metabolitów wtórnych u grzybów endofitycznych” na Wydziale Leków Mikrobiologicznych (Helmholtz-Centrum Badań nad Zakażeniami, Braunschweig, Niemcy).

W latach 2016-2018 byłem wykonawcą w projekcie „Rozwój rolniczego pozyskiwania Ni na terenach ultramaficznych Europy” (Projekt FACCE SURPLUS, PI: Prof. dr hab. Katarzyna Turnau), w ramach którego nawiązałem współpracę z Prof. Petrą Kidd (Instytut Badań Agrobiologicznych Galicji (IIAG) Hiszpańskiej Krajowej Rady ds. Badań Naukowych (CSIC), Santiago de Compostela, Hiszpania). W ramach tej współpracy odbyłem dwutygodniowy staż naukowy w 2015 r. (13-26.06.2015) w Zakładzie Biochemii Gleby w.w. instytutu w ramach projektu: “Application of nickel hyperaccumulating plants in phytomining processes”, finansowanego przez Hiszpańską Krajową Radę ds. Badań Naukowych (CSIC). Dzięki tej współpracy powstały trzy publikacje, z których w dwóch jestem autorem pierwszym i korespondencyjnym (Kidd et al. 2018; Ważny et al. 2021a, b).

Równolegle w latach 2016-2018 byłem zaangażowany w realizację projektu „Opracowanie technologii biotyzacji w komercyjnej, ekologicznej produkcji owoców jagodowych” (Projekt TANGO1; PI: Prof. dr hab. Katarzyna Turnau). Ta praca zaowocowała przygotowaniem patentu krajowego i dwoma zgłoszeniami międzynarodowymi (PCT, EPO) oraz publikacji nt. technologii biotyzacji borówki wysokiej, w której jestem autorem wiodącym (Turnau et al. 2021; Ważny et al. 2022).

W latach 2018-2022 prowadziłem badania nt. wpływu metali toksycznych na mykobiotę rośliny i gleby w ramach projektu „Rola grzybów endofitycznych w odporności *Arabidopsis arenosa* na wysoką zawartości metali toksycznych” (Projekt OPUS14; PI: Dr hab. Piotr Rozpądek, Prof. UJ). Jestem współautorem trzech publikacji wykonanych w ramach tego projektu (Domka et al. 2023, Jędrzejczyk et al. 2023, Ważny et al. 2023). W jednej z nich jestem autorem wiodącym.

Obecnie jestem kierownikiem projektu OPUS22 oraz wykonawcą w trzech innych projektach OPUS. Jeden z nich (OPUS17: Mechanizmy oddziaływania roślin z grzybami endofitycznymi. Oddziaływanie endosymbionta na gospodarkę fosforanową rośliny; PI: Dr hab. Piotr Rozpądek, Prof. UJ) jest realizowany w miejscu mojego zatrudnienia, w Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ w Grupie Interakcji Roślin z Mikroorganizmami, kierowanej przez dr hab. Piotra Rozpądkę, Prof. UJ. W projekcie tym badam, dlaczego



szczypty należące do tego samego gatunku bakterii endofitycznych charakteryzuje zróżnicowana odpowiedź na obecność fosforanów w podłożu. Pozostałe dwa projekty są realizowane w Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, co umożliwia mi współpracę z naukowcami z jednostek zewnętrznych (OPUS20: Drewno martwych drzew jako mikrobiologiczne miejsca aktywne (hotspots) w górskich glebach leśnych (PI: Prof. dr hab. inż. Ewa Błońska) oraz OPUS21: Krzewy w kształtowaniu bioróżnorodności gleb drzewostanów sosnowych strefy umiarkowanej (PI: Dr hab. Jarosław Lasota, prof. UR)). Moje zaangażowanie w realizację tych projektów polega na identyfikacji mikrobioty zasiedlającej glebę oraz drewno z wykorzystaniem technik NGS. Współpraca ta zaowocowała dwiema wspólnymi publikacjami (Małek et al. 2021, Lasota et al., w recenzji).

Od 2015 roku współpracuję z Akademią Sztuk Pięknych w Krakowie, prowadząc konsultacje dla studentów, a od 2019 roku do chwili obecnej kurs Mikrobiologii (obejmujący wykłady, ćwiczenia i konwersatoria) dla studentów I roku oraz konsultacje dla dyplomantów na Wydziale Konserwacji i Renowacji Dzieł Sztuki. W ramach tej współpracy powstały dwie publikacje naukowe, których jestem współautorem, nt. biodeterioracji obiektów zabytkowych (Kwiatkowska et al. 2016; Turnau et al. 2020).

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

**Osiągnięcia dydaktyczne.** Ze względu na specyfikę pracy w Małopolskim Centrum Biotechnologii jako ośrodka badawczym, zajęcia dydaktyczne ze studentami w formie kursów podstawowych lub uzupełniających nie wchodzą w zakres moich obowiązków. Niemniej jednak, byłem dotychczas zaangażowany w następujące formy zajęć dydaktycznych:

- Zajęcia dydaktyczne dla studentów I roku oraz konsultacje dla dyplomantów z przedmiotu Mikrobiologia; Akademia Sztuk Pięknych w Krakowie, Wydział Konserwacji i Restauracji Dzieł Sztuki; rok akademicki 2018/2019, 2019/2020, 2020/21, 2021/22; 2022/23;
- Opiekun stażu naukowego doktorantów (2 osoby); 2022-2023;
- Opiekun naukowy praktyk dla studentów kierunków biotechnologicznych w Małopolskim Centrum Biotechnologii; (6 osób); 2022;
- Recenzje prac licencjackich (3 osoby); 2015;
- Współprowadzenie zajęć laboratoryjnych dla studentów kursu „Ecology of fungi” (INOS UJ); 2014-2016.

### **Osiągnięcia organizacyjne:**

- Konferencja międzynarodowa: „Exo- & endogeneous signalling” w ramach akcji COST FA1206 & FA1103; Kraków, 2014, członek komitetu organizacyjnego;
- Konferencja międzynarodowa: „Challenges of biotechnology in 21st century”; Kraków, 2014, członek komitetu organizacyjnego;
- Komisja Dyscyplinarna dla Nauczycieli Akademickich na kadencję 2016-2020 – zastępca członka komisji;

- Zespół powołany do opracowania Planu Funkcjonalno-Użytkowego dla planowanej rozbudowy budynku MCB - ekspert w zakresie organizacji laboratoriów biologii roślin; 2020;
- Członek Senatu Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w grupie „Przedstawiciele nauczycieli akademickich zatrudnionych na stanowiskach innych niż profesora lub profesora uczelni” na kadencję 2020-2024.

#### **Osiągnięcia popularyzujące naukę:**

- Prowadzenie cyklicznych warsztatów dla młodzieży szkolnej w zakresie mikrobiologii środowiskowej w Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ; lata 2018-2020;
- Udział w II Powiatowym Sympozjum Murawowym w Centrum Promocji Obszarów Natura 2000 w Pstroszycach; 21.06.2021 r.

#### **7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

W swojej działalności naukowej byłem lub jestem wykonawcą w dziewięciu krajowych projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju. Dwa z tych projektów były współfinansowane w ramach programów międzynarodowych ERA-NET oraz NAWA. Od lipca 2022 roku kieruję projektem NCN OPUS22 nt. „Czy utrata oporności na metale toksyczne przez roślinę jest związana z mikrobiomem nasion?” W ramach tego projektu badam kolejne aspekty interakcji roślin z mikroorganizmami.

W latach 2021-22 kierowałem projektem nt. ”Mikrobiom roślin muraw kserotermicznych Wyżyny Miechowskiej chronionych programem Natura 2000” finansowanym ze środków programu POB BioS Uniwersytetu Jagiellońskiego. W czasie przygotowania i realizacji tego projektu współpracowałem z Regionalną Dyрекcją Ochrony Środowiska w Krakowie. Celem projektu było wykonanie wstępnych analiz niezbędnych do opisu zależności pomiędzy środowiskiem, bioróżnorodnością roślin i bioróżnorodnością mikroorganizmów zasiedlających murawy kserotermiczne. Analizę mikrobiomu bakteryjnego i grzybowego gleby i korzeni przeprowadziłem dla 3 gatunków roślin *Anemone sylvestris*, *Salvia pratensis* i *Orchis militaris*. Wyniki sekwencjonowania amplikonów wykazały, że zbiorowiska bakterii zasiedlających korzenie roślin są odmienne od zbiorowisk bakterii zasiedlających glebę. Nie wykazano różnic w mikrobiomie korzeni w zależności od miejsca zbioru rośliny. To wskazuje, że mikrobiom korzeni badanych roślin, zasiedlających murawy kserotermiczne, chronione w ramach programu Natura 2000, jest kształtowany głównie przez gatunek rośliny, a w mniejszym stopniu przez środowisko. Uzyskane wyniki badań zostały wykorzystane jako badania wstępne do przygotowywanego projektu nt. oddziaływania różnych czynników środowiskowych na mikrobiotę roślin.

Jestem autorem lub współautorem 28 artykułów w czasopismach naukowych (w tym 23 artykułów o zasięgu międzynarodowym z listy filadelfijskiej), 3 krajowych i 2 międzynarodowych zgłoszeń patentowych oraz 1 patentu krajowego.

Uzyskane przeze mnie wyniki badań zostały zaprezentowane na 35 konferencjach zagranicznych i 2 krajowych. W jedenastu z nich brałem czynny udział, głosząc 5 referatów i prezentując 6 posterów. Dwukrotnie otrzymałem wyróżnienie: w roku 2017 za poster "Endophytic fungal mycobiota in hyperaccumulating *Thlaspi*" zaprezentowany na konferencji: The 9th International Conference on Serpentine (Tirana, Albania) oraz w roku 2022 za wystąpienie nt.: "Jak metale toksyczne zmieniają mykobiom rośliny?" zaprezentowane na VI. Ogólnopolskim sympozjum mikrobiologicznym "Metagenomy różnych środowisk" (Puławy, Polska).

Współpracowałem z sektorem gospodarki, realizując 8 projektów badawczych dla 7 przedsiębiorstw. W 2 projektach pełniłem funkcję kierownika, w pozostałych funkcję wykonawcy. Projekty, którymi kierowałem były realizowane na zlecenie dużych podmiotów gospodarczych takich jak Zakłady Chemiczne Siarkopol czy PGL Lasy Państwowe. W pierwszym przypadku badałem możliwość zastosowania bakterii glebowych jako komponentu nawozów mineralnych na bazie siarki stosowanych w rolnictwie, w drugim natomiast weryfikowałem czystość mikrobiologiczną biopreparatów na bazie grzybów mykoryzowych z rodzaju *Suillus* testowanych do zastosowań w leśnictwie. Ponadto odbyłem 6-miesięczny staż w przedsiębiorstwie w ramach projektu „Innowacyjny Transfer” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego, polegający na opracowaniu szczepionek mykoryzowych dla roślin stosowanych w rekultywacji terenów zanieczyszczonych przez przemysł.

W swojej karierze zawodowej przygotowałem 31 recenzji manuskryptów dla 20 czasopism o zasięgu międzynarodowym, takich jak np. Symbiosis, Environmental Microbiology, Science of the Total Environment, Environmental Pollution, Fungal Ecology, Mycorrhiza czy Journal of Hazardous Materials oraz 3 recenzje prac licencjackich.

Za dotychczasowe osiągnięcia naukowe otrzymałem nagrodę Rektora 3 stopnia w 2019 roku i nagrodę Rektora 1 stopnia w 2022 roku.

Podsumowanie danych bibliometrycznych na podstawie baz danych Scopus i Web of Science przedstawiłem w tabeli 1.

**Tabela 1. Informacje bibliometryczne na podstawie baz danych Scopus i Web of Science z dnia 02.05.2023**

Parametr	Scopus	Web of Science
Liczba publikacji	23	23
Liczba cytowań	473	415
Liczba cytowań bez autocytacji	429	371
Indeks Hirscha	12	12
Impact factor (IF)	118,423	
Punkty MNiSW	2960	

## Literatura:

- Ahmad M, Zahir ZA, Asghar HN, Asghar M (2011) Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol* 57:578–589. <https://doi.org/10.1139/W11-044>
- Alori ET, Glick BR, Babalola OO (2017) Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol* 8:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Baker AJM (1981) Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr* 3:643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- Bani A, Echevarria G, Sulçe S, Morel JL (2015) Improving the Agronomy of *Alyssum murale* for Extensive Phytomining: A Five-Year Field Study. *Int J Phytoremediation* 17:117–127. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.862204>
- Benizri E, Kidd PS (2018) The Role of the Rhizosphere and Microbes Associated with Hyperaccumulator Plants in Metal Accumulation. In: *Agromining: Farming for Metals*. pp 157–188
- Berg G, Köberl M, Rybakova D, et al (2017) Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiol Ecol* 93:1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix050>
- Bona E, Cantamessa S, Massa N, et al (2016) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0727-y>
- Borymski S, Cycon M, Beckmann M, et al (2018) Plant species and heavy metals affect biodiversity of microbial communities associated with metal-tolerant plants in metalliferous soils. *Front Microbiol* 9:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01425>
- Bothe H, Turnau K, Regvar M (2010) The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in protecting endangered plants and habitats. *Mycorrhiza* 20:445–457. <https://doi.org/10.1007/s00572-010-0332-4>
- Brundrett M (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:473–495. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>
- Brundrett MC, Cairney JWG (2002) Chapter 5 ECTOMYCORRHIZAS IN PLANT COMMUNITIES. *B Microorg Plant Conserv Biodiversity* 105–150
- Cabello-Conejo MI, Prieto-Fernández A, Kidd PS (2014) Exogenous treatments with phytohormones can improve growth and nickel yield of hyperaccumulating plants. *Sci Total Environ* 494–495:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.102>
- Cecchi L, Gabbriellini R, Arnetoli M, et al (2010) Evolutionary lineages of nickel hyperaccumulation and systematics in European *Alyseae* (Brassicaceae): evidence from nrDNA sequence data. *Ann Bot* 106:751–767. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq162>
- Chaney RL, Baker AJM, Morel JL (2018) The Long Road to Developing Agromining/ Phytomining. In: *Agromining: Farming for Metals*. pp 1–17
- Chen J, He F, Zhang X, et al (2014) Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil. 87:164–181. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12212>
- Cobb GP, Sands K, Waters M, et al (2000) Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. *Environ Toxicol Chem* 19:600–607. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190311>
- Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res* 19:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- de Bary A (1879) Die Erscheinung Der Symbiose. *Die Erscheinung der Symbiose* 5–30. <https://doi.org/10.1515/9783111471839-002>
- Deng Z, Cao L (2017) Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Chemosphere* 168:1100–1106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.097>
- Domka A, Jędrzejczyk R, Ważny R, et al (2023) Endophytic yeast protect plants against metal toxicity by inhibiting plant metal uptake through an ethylene-dependent mechanism. *Plant Cell Environ* 268–287. <https://doi.org/10.1111/pce.14473>
- Domka AM, Rozpądek P, Ważny R, Turnau K (2018) *Mucor* sp.- an endophyte of Brassicaceae capable of surviving in toxic metal-rich sites. *J Basic Microbiol*. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800406>
- Fehrer J, Réblová M, Bambasová V, Vohník M (2019) The root-symbiotic *Rhizoscyphus ericae* aggregate and *Hyaloscypha* (Leotiomycetes) are congeneric: Phylogenetic and experimental evidence. *Stud Mycol* 92:195–225. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.10.004>
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007) The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176:22–36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x>
- Gallardo M, Jackson LE, Thompson RB (1996) Shoot and root physiological responses to localized zones of soil moisture in cultivated and wild lettuce (*Lactuca* spp.). *Plant, Cell Environ* 19:1169–1178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00432.x>
- Gianinazzi S, Oubaha L, Chahbandar M, et al (2003) Biotization of microplants for improved performance. In: *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp 165–172

- Gilbert SF, Sapp J, Tauber AI (2012) A symbiotic view of life: We have never been individuals. *Q Rev Biol* 87:325–341. <https://doi.org/10.1086/668166>
- Gkarmiri K, Mahmood S, Ekblad A, et al (2017) Identifying the active microbiome associated with roots and rhizosphere soil of oilseed rape. *Appl Environ Microbiol* 83:1–14
- Gollotte A, Secco B, Mercy L, et al (2009) Raspberry breeding and biotisation for increasing plant stress tolerance and antioxidant activity. In: *Acta Horticulturae*. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp 145–150
- Goodwin J (1992) The role of mycorrhizal fungi in competitive interactions among native bunchgrasses and alien weeds: a review and synthesis. *Northwest Sci* 66:251–260
- Hamel C, Planchette C (2007) Mycorrhizae in crop production
- Hamim A, Miché L, Douaik A, et al (2017) Diversity of fungal assemblages in roots of Ericaceae in two Mediterranean contrasting ecosystems. *Comptes Rendus - Biol* 340:226–237. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.02.003>
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, et al (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:293–320. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>
- Jansa J, Vosátka M (2000) In vitro and post vitro inoculation of micropropagated Rhododendrons with ericoid mycorrhizal fungi. *Appl Soil Ecol* 15:125–136. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00088-3)
- Jędrzejczyk RJ., Gustab M, Ważny R, et al (2023) Iron inactivation by *Sporobolomyces ruberrimus* and its potential role in plant metal stress protection . An in vitro study. *Sci Total Environ* 870:161887. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161887>
- Jiang M, Cao L, Zhang R (2008) Effects of Acacia (*Acacia auriculaeformis* A. Cunn)-associated fungi on mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) growth in Cd- and Ni-contaminated soils. *Lett Appl Microbiol* 47:561–565. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02454.x>
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997) Functioning of Mycorrhizal Associations Along the Mutualism-Parasitism Continuum. *New Phytol* 135:575–586
- Kidd PS, Bani A, Benizri E, et al (2018) Developing sustainable agromining systems in agricultural ultramafic soils for nickel recovery. *Front Environ Sci* 6:. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00044>
- Korshunova YO, Eide D, Gregg Clark W (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* 40:37–44
- Kowalski S (2007) Ektomikoryzy: nowe biotechnologie w polskim szkółkarstwie leśnym. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych
- Kwiatkowska M, Ważny R, Turnau K, Wójcik A (2016) Fungi as deterioration agents of historic glass plate negatives of Brandys family collection. *Int Biodeterior Biodegrad* 115:133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.002>
- Lebeda A, Dolezalová I, Feráková V, Astley D (2004) Geographical Distribution of Wild *Lactuca* Species (Asteraceae, Lactuceae). *Bot Rev* 70:328–356. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2004\)070\[0328:GDOWLS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2004)070[0328:GDOWLS]2.0.CO;2)
- Li K, Wang C, Ow DW (2022) Root microbiome changes associated with cadmium exposure and/or overexpression of a transgene that reduces Cd content in rice. *Ecotoxicol Environ Saf* 237:113530. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113530>
- Liu R, Dai M, Wu X, et al (2012) Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. *Mycorrhiza* 22:289–296. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0397-8>
- Małek S, Ważny R, Błońska E, et al (2021) Soil fungal diversity and biological activity as indicators of fertilization strategies in a forest ecosystem after spruce disintegration in the Karpaty Mountains. *Sci Total Environ* 751:. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142335>
- Nguyen MP, Lehosmaa K, Martz F, et al (2021) Host species shape the community structure of culturable endophytes in fruits of wild berry species (*Vaccinium myrtillus* L., *Empetrum nigrum* L. And *Vaccinium vitis-idaea* L.). *FEMS Microbiol Ecol* 97:1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab097>
- Nishida S, Tsuzuki C, Kato A, et al (2011) AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 52:1433–1442. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr089>
- Orłowska E, Przybyłowicz W, Orłowski D, et al (2011) The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environ Pollut* 159:3730–3738. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.008>
- Pagano MC, Correa EJA, Duarte NF, et al (2017) Advances in Eco-Efficient Agriculture : The Plant-Soil Mycobiome. 1–12. <https://doi.org/10.3390/agriculture7020014>
- Pérez-Jaramillo JE, Mendes R, Raaijmakers JM (2016) Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Mol Biol* 90:635–644. <https://doi.org/10.1007/s11103-015->

- Piotrowska-Seget Z, Cycoń M, Kozdrój J (2005) Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl Soil Ecol* 28:237–246. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.08.001>
- Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T, Watson M (2018) The madness of microbiome: Attempting to find consensus ‘best practice’ for 16S microbiome studies. *Appl Environ Microbiol* 84:. <https://doi.org/10.1128/AEM.02627-17>
- Reeves RD, Ent A Van Der, Baker AJM (2018) Global distribution and ecology of hyperaccumulator plants. In: van der Ent A, Echevarria G, Baker AJM, Morel JL (eds) *Agromining: Farming for Metals*. Springer, Cham, pp 75–92
- Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, et al (2008) Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* 312:25–37. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9606-4>
- Robinson BH, Brooks RR, Howes AW, et al (1997) The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *J Geochemical Explor* 60:115–126. [https://doi.org/10.1016/S0375-6742\(97\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0375-6742(97)00036-8)
- Rodriguez RJ, White JF, Arnold a E, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182:314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2013) The hologenome concept: Human, animal and plant microbiota
- Rozpądek P, Domka A, Ważny R, et al (2017) How does the endophytic fungus *Mucor* sp. improve *Arabidopsis arenosa* vegetation in the degraded environment of a mine dump?
- Rozpądek P, Domka A, Ważny R, et al (2018a) How does the endophytic fungus *Mucor* sp. improve *Arabidopsis arenosa* vegetation in the degraded environment of a mine dump? *Environ Exp Bot* 147:31–42. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.009>
- Rozpądek P, Domka AM, Nosek M, et al (2018b) The role of strigolactone in the cross-talk between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Mucor* sp. *Front Microbiol* 9:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00441>
- Rozpądek P, Wężowicz K, Nosek M, et al (2015) The fungal endophyte *Epichloë typhina* improves photosynthesis efficiency of its host orchard grass (*Dactylis glomerata*). *Planta* 242:. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2337-x>
- Rozpądek P, Wężowicz K, Stojakowska A, et al (2014) Mycorrhizal fungi modulate phytochemical production and antioxidant activity of *Cichorium intybus* L. (Asteraceae) under metal toxicity. *Chemosphere* 112:. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.023>
- Saad RF, Kobaissi A, Echevarria G, et al (2018) Influence of new agromining cropping systems on soil bacterial diversity and the physico-chemical characteristics of an ultramafic soil. *Sci Total Environ* 645:380–392. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.106>
- Schlöter M, Nannipieri P, Sørensen SJ, van Elsas JD (2018) Microbial indicators for soil quality. *Biol Fertil Soils* 54:1–10. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3>
- Shade A, Jacques MA, Barret M (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr Opin Microbiol* 37:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.010>
- Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (2008) *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*. Springer
- Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, et al (2010) Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81:1084–1090. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.034>
- Sun X, Song B, Xu R, et al (2021) Root-associated ( rhizosphere and endosphere ) microbiomes of the *Miscanthus sinensis* and their response to the heavy metal contamination. *J Environ Sci* 104:387–398. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.12.019>
- Turnau K, Gawroński S, Ryszka P, Zook D (2012) Mycorrhizal-Based Phytostabilization of Zn–Pb Tailings: Lessons from the Trzebieńka Mining Works (Southern Poland). In: Kothe E, Varma A (eds) *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils, Soil Biology*. pp 327–348
- Turnau K, Jędrzejczyk RJ, Ważny R, et al (2020) Microbes of XVI century Arrases of Krakow Royal Castle. *Microbiol Res* 238:. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126485>
- Turnau K, Mesjasz-Przybyłowicz J (2003) Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* 13:185–190. <https://doi.org/10.1007/s00572-002-0213-6>
- Turnau K, Ważny R, Rozpądek P (2021) Szczepionka, sposób przygotowania szczepionki oraz sposób biotyżacji borówki amerykańskiej
- van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, et al (2015) Agromining: Farming for metals in the future? *Environ Sci Technol* 49:4773–4780. <https://doi.org/10.1021/es506031u>
- van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytol*. 205:1406–1423

- Varma A, Savita Verma, Sudha, et al (1999) Piriformospora indica, a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. *Appl Environ Microbiol* 65:2741–2744
- Vohník M, Sadowsky JJ, Lukešová T, et al (2012) Inoculation with a ligninolytic basidiomycete, but not root symbiotic ascomycetes, positively affects growth of highbush blueberry (*Ericaceae*) grown in a pine litter substrate: Ligninolytic basidiomycete enhances growth of blueberry: Ligninolytic basidiom. *Plant Soil* 355:341–352. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1106-2>
- Ważny R (2014) Ectomycorrhizal communities associated with silver fir seedlings (*Abies alba* Mill.) differ largely in mature silver fir stands and in Scots pine forecrops. *Ann For Sci* 71:801–810. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0378-0>
- Ważny R., Jędrzejczyk R.J., Domka A., Pliszko A., Kosowicz W., Githae D. et al. (2023) How does metal soil pollution change the plant mycobiome? *Environmental Microbiology*, 1–18. Available from: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16392>
- Ważny R, Jędrzejczyk RJ, Rozpądek P, et al (2022) Biotization of highbush blueberry with ericoid mycorrhizal and endophytic fungi improves plant growth and vitality. *Appl Microbiol Biotechnol* 4775–4786. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12019-5>
- Ważny R, Kowalski S (2017) Ectomycorrhizal fungal communities of silver-fir seedlings regenerating in fir stands and larch forecrops. *Trees - Struct Funct* 31:. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1518-y>
- Ważny R, Rozpądek P, Domka A, et al (2021a) The effect of endophytic fungi on growth and nickel accumulation in *Noccaea* hyperaccumulators. *Sci Total Environ* 768:. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144666>
- Ważny R, Rozpądek P, Jędrzejczyk RJ, et al (2018) Does co-inoculation of *Lactuca serriola* with endophytic and arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth in a polluted environment? *Mycorrhiza*. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0819-y>
- Ważny R, Rozpądek P, Jędrzejczyk RJ, et al (2021b) Phytohormone based biostimulant combined with plant growth promoting endophytic fungus enhances Ni phytoextraction of *Noccaea goesingensis*. *Sci Total Environ* 789:. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147950>
- Wężowicz K, Rozpądek P, Turnau K (2017) Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. *Mycorrhiza* 27:1–13
- Wilson D (1995) Endophyte - the evolution of a term , and clarification of its use and definition. *OIKOS* 73:274–276
- Wu F-L, Li Y, Tian W, et al (2021) A novel dark septate fungal endophyte positively affected blueberry growth and changed the expression of plant genes involved in phytohormone and flavonoid biosynthesis. *Tree Physiol* 40:1080–1094. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/TPAA047>
- Xiang Y, Dong Y, Zhao S, et al (2020) Microbial Distribution and Diversity of Soil Around a Manganese Mine Area. *Water Air Soil Pollut* 231:. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04878-3>

.....  
(podpis wnioskodawcy)